

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*на правах рукописи*

**Кихай Татьяна Фёдоровна**

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

1.4.9. Биоорганическая химия

Научные руководители:

д.х.н., профессор Готтих Марина Борисовна

к.х.н. Агапкина Юлия Юрьевна

Москва – 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СОДЕРЖАНИЕ.....</b>	<b>2</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>8</b>
Актуальность темы исследования .....	8
Цель и задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	10
Теоретическая и практическая значимость .....	10
Методология и методы исследования .....	10
Личный вклад автора .....	11
Степень достоверности результатов .....	11
Объект исследования .....	11
Предмет исследования.....	11
Положения, выносимые на защиту .....	12
Публикации и апробация результатов .....	12
Структура и объем .....	12
<b>II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: “Роль клеточных белков человека на ранних стадиях репликации ВИЧ-1” .....</b>	<b>13</b>
II. 1. Характеристика ВИЧ-1 .....	13
II. 1. 1. Структура вириона ВИЧ-1 .....	13
II. 1. 2. Строение генома ВИЧ-1 .....	15
II. 1. 3. Жизненный цикл ВИЧ-1.....	16
II. 2. Ранние стадии репликации ВИЧ-1 и участвующие в них клеточные белки .....	19
II. 2. 1. Слияние и проникновение.....	19
II. 2. Организация gp120 и gp41 .....	21
II. 2. 3. Роль белка p17 в ранних этапах репликации ВИЧ-1 .....	25
II. 2. 4. Импорт капсида в ядро .....	29
Ингибиторы сборки капсида .....	34
II. 2. 5. Обратная транскрипция.....	35
II. 2. 5. 1. Строение ОТ ВИЧ-1.....	35
II. 2. 5. 2. Процесс обратной транскрипции .....	37
II. 2. 5. 3. Партнеры ОТ ВИЧ-1 .....	39

II. 2. 6. Интеграция.....	41
II. 2. 6. 1. Строение ИН ВИЧ-1 .....	41
II. 2. 6. 2. Процесс интеграции.....	43
II. 2. 7. Постинтеграционная репарация .....	45
II. 3. Роль белков SFPQ и NONO в жизненном цикле ВИЧ-1 .....	45
<b>II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>52</b>
III.1. Буферные растворы.....	52
III. 2. Олигонуклеотиды.....	53
III. 3. Плазмидные конструкции .....	57
III. 4. Получение и очистка рекомбинантных белков.....	59
III. 5. Метод соосаждения белков .....	61
III. 6. Анализ обмена субъединиц ИН .....	62
III. 7. Метод «пептидного фишинга» .....	62
III. 8. Культивирование эукариотических клеточных линий.....	62
III. 9. Трансфекция эукариотических клеток.....	62
III. 10. Определение активности люциферазы светлячка.....	63
III. 11. Сборка вируса .....	64
III.12. Трансдукция клеток .....	64
III. 13. Определение эффективности репарации NHEJ.....	64
III. 14. Вестерн-блот анализ .....	65
III. 15. Количественный ПЦР .....	65
III. 16. Получение радиоактивно меченных субстратов ИН и TAR-РНК.....	68
III. 17. Определение каталитической активности ИН .....	68
III. 18. Анализ взаимодействия ИН с ДНК-субстратом и TAR-РНК методом торможения в геле .....	69
<b>IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>71</b>
IV.1. Анализ влияния белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 .....	71
IV.2. Взаимодействия белков SFPQ и NONO с интегразой и обратной транскриптазой.....	74
IV. 3. Поиск аминокислотных остатков интегразы ВИЧ-1, важных для взаимодействия с SFPQ .....	75
IV. 4. Анализ функциональной активности точечных мутантов ИН.....	81

IV. 5. Поиск аминокислотных остатков SFPQ, участвующих во взаимодействии с ИН ВИЧ-1 .....	87
IV. 6. Выяснение механизма влияния SFPQ на интеграцию и постинтеграционную репарацию.....	90
<b>V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>96</b>
<b>VI. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>97</b>
<b>VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>98</b>
<b>VIII. ПРИЛОЖЕНИЕ .....</b>	<b>117</b>



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВААРТ – Высокоактивная антиретровирусная терапия;

ВИЧ-1 – Вирус иммунодефицита человека первого типа;

ГКГС – Главный комплекс гистосовместимости;

ИН – Интеграза ВИЧ-1;

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид;

кДНК – комплементарная ДНК;

мРНК – матричная РНК;

ОТ – Обратная транскриптаза;

ПААГ – Полиакриламидный гель;

ПИК – Прединтеграционный комплекс;

ПИР – Постинтеграционная репарация;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СПИД – синдрома приобретенного иммунодефицита

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан;

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия;

Alu – Семейство повторяющихся последовательностей в геноме человека;

АРОВЕС3G – Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G;

АТМ – Ataxia telangiectasia mutated (белок-сенсор повреждений ДНК);

СА – капсидный белок (p24);

ССD – каталитический коровый домен интегразы;

CPSF6 – Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6 (фактор расщепления и специфичности полиаденилирования 6);

CTD – С-концевой домен интегразы;

DBHS – Drosophila Behavior Human Splicing (семейство белков, включающее SFPQ/NONO);

DNA-PK – DNA-dependent protein kinase; ДНК-зависимая протеинкиназа;

eEF1 – Эукариотические факторы элонгации трансляции;

FEZ1 – Белок фасцикуляции и удлинения zeta 1;

FG-мотивы – Фенилаланин-глициновые повторы в нуклеопоринах;

GST – glutathione S-transferase, глутатион-S-трансфераза;

HEPES – N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-этансульфоная кислота;

LEDGF – lens epithelium-derived growth factor, фактор роста эпителия хрусталика;

LTR – Long Terminal Repeat, длинные концевые повторы;

LDLR - рецепторы липопротеинов низкой плотности

MA – матриксный белок, p17;

NHEJ – non-homologous end joining, нехомологичное объединение концов;

NONO – Non-POU domain-containing octamer-binding protein, октамер-связывающий белок, не содержащий домена POU;

NOPS – домен NonA/paraspeckle (в белках DBHS);

NTD – N-концевой домен интегразы;

NUP – нуклеопорин;

PBS – Primer binding site (сайт связывания праймера);

PMSF – фенилметилсульфонил фторид (phenylmethanesulfonyl fluoride);

PPT – Polypurine tract (полипуриновый тракт);

RRE – Rev response element, элемент Rev ответа;

SDS – Sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия;

SFPQ – Splicing factor, proline- and glutamine-rich, фактор сплайсинга, пролин и глутамин богатый;

siРНК – малая интерферирующая РНК;

TAR – Трансактивируемый регуляторный элемент;

TNPO3 – Транспортин 3 (Transportin 3);

VSV-G – Гликопротеин G вируса везикулярного стоматита;

# **1. ВВЕДЕНИЕ**

## **Актуальность темы исследования**

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

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

В литературе описано участие в репликации ВИЧ-1 клеточных белков SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich) и NONO (Non-POU domain-containing octamer-binding protein), являющихся ключевыми компонентами ядерных белково-нуклеиновых комплексов – параспеклов. Эти белки участвуют в

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

### **Цель и задачи исследования**

Целью работы является определение роли клеточных белков SFPQ и NONO в регуляции ранних стадий репликативного цикла ВИЧ-1, включая обратную транскрипцию, интеграцию и постинтеграционную репарацию.

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

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

### **Научная новизна**

В результате выполнения диссертационной работы была впервые детально охарактеризована роль белков SFPQ и NONO в регуляции ранних стадий репликации ВИЧ-1. Установлено, что белок NONO не взаимодействует с вирусными ферментами и не влияет ни на одну из ранних стадий, в то время как белок SFPQ связывается с ИН и является положительным фактором интеграции и постинтеграционной репарации (ПИР). Определены аминокислотные остатки ИН и SFPQ, важные для их взаимодействия. Показано, что связывание ИН с SFPQ важно для процесса интеграции, но не влияет на ПИР. Проведенное исследование позволило предложить комплекс белков ИН и SFPQ в качестве новой потенциальной мишени для разработки противовирусных препаратов.

### **Теоретическая и практическая значимость**

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

### **Методология и методы исследования**

Все исследования проводили на клеточной культуре НЕК 293Т (клетки эмбриональной почки). Повышение внутриклеточного уровня белков достигалось с помощью кальций-фосфатной трансфекции плазмид, понижение – с использованием малых интерферирующих РНК (siРНК), доставленных методом липофекции. В работе использовали псевдовирусные частицы с геном люциферазы светлячка в качестве репортера под контролем вирусного LTR-промотора. Оценку эффективности каждой из начальных стадий производили с помощью количественной ПЦР, детектируя различные формы вирусной ДНК: тотальную (для анализа обратной транскрипции), интегрированную (для оценки

интеграции) и репарированную (для изучения постинтеграционной репарации). Для получения генетических конструкций использовали стандартные методы клонирования, ПЦР, сайт-направленного мутагенеза. Рекомбинантные белки SFPQ, NONO, ОТ и ИН получали в клетках *E. coli*, белки очищали с помощью аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Способность белков связываться друг с другом анализировали методом соосаждения на глутатион-агарозе.

### **Личный вклад автора**

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

### **Степень достоверности результатов**

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

### **Объект исследования**

Молекулярные механизмы участия клеточных белков в ранних стадиях репликации вируса иммунодефицита человека 1 типа.

### **Предмет исследования**

Клеточный белок SFPQ и его роль в репликации ВИЧ-1, а именно его участие в интеграции и постинтеграционной репарации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Клеточный белок SFPQ является положительным фактором репликации ВИЧ, белок NONO не оказывает влияние на ранние стадии репликации ВИЧ-1.
2. SFPQ влияет на стадию интеграции и ПИР и не влияет на стадию обратной транскрипции.
3. SFPQ воздействует на процесс интеграции за счет его связывания с ИН.
4. Во взаимодействии SFPQ с ИН ВИЧ-1 участвуют аминокислотные остатки V165/R166 и R187 каталитического домена ИН и мотивы R<sup>19</sup>GGGGGR<sup>25</sup>GG и R<sup>236</sup>GGGGGR<sup>242</sup>GG из N-концевого домена SFPQ.
5. Остаток R187 важен для формирования правильной структуры ИН, необходимой на всех этапах ее функциональной активности, замена I182A снижает эффективность интеграции, а замена K188A - обратной транскрипции.

### **Публикации и апробация результатов**

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

### **Структура и объем**

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



## **II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: “Роль клеточных белков человека на ранних стадиях репликации ВИЧ-1”**

### **II. 1. Характеристика ВИЧ-1**

Согласно существующей классификации, вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) принадлежит к роду лентивирусов (*Lentivirus*), входящему в семейство ретровирусов (*Retroviridae*) [5]. Геном ВИЧ-1, как и у прочих представителей данного семейства, состоит из одноцепочечной молекулы (+)РНК, на матрице которой вирусный фермент обратная транскриптаза (ОТ) синтезирует ДНК-копию геномной РНК вируса [5]. Образовавшаяся кДНК в составе прединтеграционного комплекса (ПИК) проникает в ядро клетки, где другой вирусный фермент интегразы (ИН) обеспечивает ее встраивание в хозяйскую хромосому [6, 7]. Процесс интеграции вирусной ДНК представляет собой критически важный этап, без которого невозможны последующая экспрессия вирусных генов и репликация вируса. В дальнейшем мы подробнее разберем строение вириона ВИЧ-1 и основные стадии его жизненного цикла.

#### **II. 1. 1. Структура вириона ВИЧ-1**

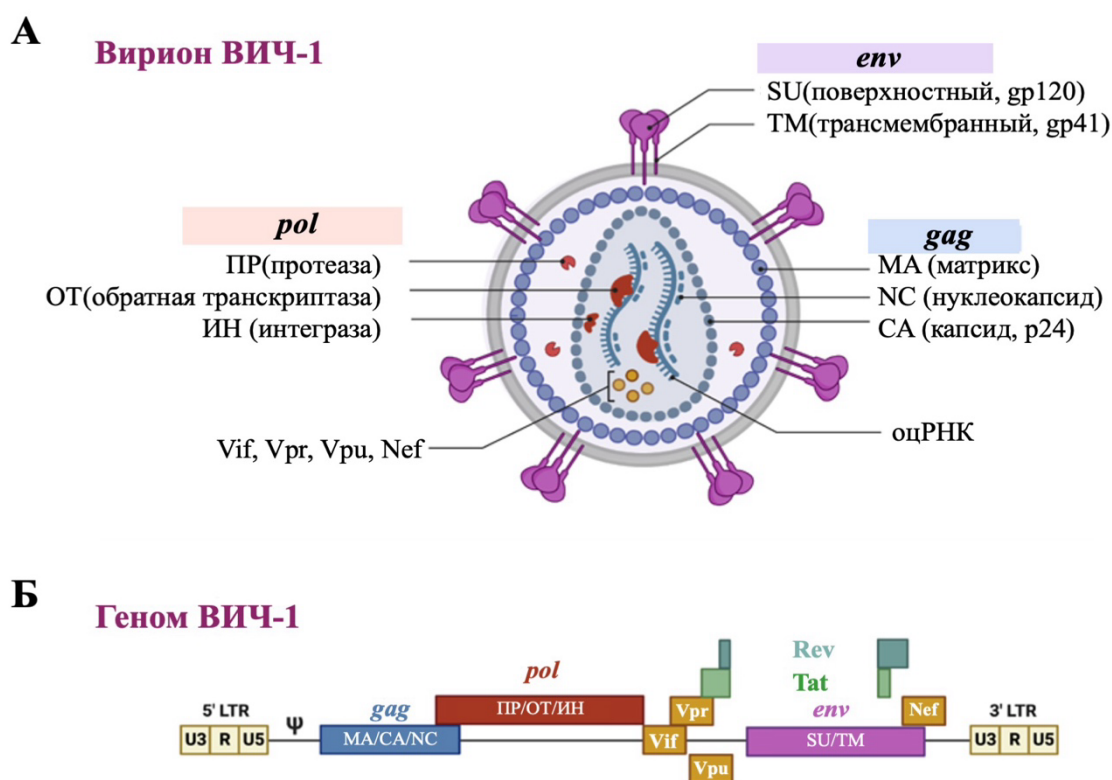
Вирусная частица имеет сферическую форму с размером около 100 нм в диаметре. Внешняя оболочка вириона сформирована липидной мембраной, содержащей вирусные гликопротеины gp41 и gp120 – поверхностные элементы, выполняющие критическую функцию в процессе первичного взаимодействия с клеточными рецепторами (Рисунок 1, А [8]) [5].

Непосредственно под внешней мембраной располагается матриксный слой, который формируется матриксным белком p17 (МА). Этот матриксный слой окружает внутренний капсид вируса, обладающий геометрией усеченного конуса и построенный из капсидного белка p24 (СА) [5].

Внутреннее содержимое капсида включает в себя целый набор компонентов, необходимых для реализации вирусного жизненного цикла. Здесь локализуются ключевые ферменты, обеспечивающие репликацию вирусного генома, а также различные регуляторные белки [9]. Кроме того, в капсиде присутствуют две

идентичные молекулы геномной РНК, которые формируют комплекс с нуклеокапсидным белком р7 [9]. Эта РНК выполняет роль матрицы при синтезе ДНК-копии генома, который катализируется вирусной ОТ [10].

Образованная в ходе обратной транскрипции вирусная ДНК характеризуется наличием идентичных регуляторных последовательностей на обоих концах – длинных концевых повторов (LTR). Эти элементы играют важнейшую роль в процессе интеграции вирусного генома в геном клетки-хозяина и распознаются ИН – вирусным ферментом, катализирующим процесс интеграции вирусной кДНК в геном хозяина [7].



**Рисунок 1.** Схематичное строение вириона (А, адаптировано из [8]) и генома ВИЧ-1 (Б) (адаптировано из [11]). *env*, *pol*, *gag* – гены, кодирующие соответствующие белки, указанные под названием генов: *pol* (протеазу (ПР), обратную транскриптазу (ОТ), интегразу (ИН), *env* (поверхностный gp120, трансмембранный gp41), *gag* (матрикс (МА, p17), NC(нуклеокапсид), капсид (СА, p24)

В области 5'LTR располагается вирусный промотор, дополненный множеством регуляторных последовательностей, которые принимают участие в

процессе транскрипции. Геном ВИЧ-1 содержит девять генов, обеспечивающих синтез пятнадцати функционально значимых белков (Рисунок 1, Б [11]).

### II. 1. 2. Строение генома ВИЧ-1

Ген *group-specific antigen (gag)* отвечает за кодирование аминокислотных последовательностей структурных элементов вириона. К их числу относятся капсидный белок p24, матриксный белок p17, а также нуклеокапсидный белок p7. Следующий за ним ген *pol* кодирует ключевые вирусные ферменты, формируя ферментативный аппарат вируса: протеазу, обратную транскриптазу и интегразу. Третий из основных генов, *env (envelope)*, обеспечивает синтез двух гликопротеинов, которые образуют суперструктуру оболочки: это поверхностный gp120 и трансмембранный gp4 (Рисунок 1, Б) [12].

Помимо структурных генов, вирусный геном содержит гены, кодирующие регуляторные белки: Tat, Rev, Nef, Vpr, Vif. Функция белка Tat заключается в связывании со шпильчатой структурой TAR (Trans-Activation Response element) на 5'-конце вирусной РНК, что активирует процесс элонгации транскрипции, инициируемой с LTR-промотора [13]. Белок Rev, взаимодействуя с элементом RRE (Rev Response Element) в мРНК гена *env*, обеспечивает экспорт несплайсированных вирусных мРНК из ядра в цитоплазму, тем самым регулируя переход от синтеза регуляторных белков к производству структурных компонентов вириона [14]. Белок Nef усиливает экспрессию на поверхности зараженных клеток молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I и II классов, а также активирует Т-лимфоциты. Данный механизм позволяет вирусу избегать распознавания CD4<sup>+</sup> Т-хелперами и другими Т-лимфоцитами, а также препятствует реинфекции клетки [11]. Действие белка Vpr направлено на индукцию деградации клеточного рецептора CD4, которая осуществляется через систему протеасомного распада [15]. Белок Vpr играет роль в регулировании транскрипции вирусной РНК и необходим для транспорта прединтеграционного комплекса (ПИК) сквозь ядерную мембрану [16]. Что касается белка Vif, то его

ключевая функция заключается в нейтрализации клеточного белка APOBEC3G путем контроля его деградации [17]]; данный клеточный фактор способен индуцировать дезаминирование вновь синтезированной цепи вирусной кДНК. Штаммы ВИЧ-1 с дефектом гена *vif* демонстрируют неспособность к репликации в определенных клеточных культурах: хотя процесс проникновения в клетки и инициация обратной транскрипции возможны, завершение данного процесса оказывается невозможным.

### II. 1. 3. Жизненный цикл ВИЧ-1

В жизненном цикле ВИЧ-1 можно выделить два основных временных этапа (Рисунок 2 [18]). Ранняя фаза начинается с момента проникновения вирусной частицы в клетку и завершается интеграцией вирусной ДНК в геном хозяина и репарацией возникающих в ходе этого процесса повреждений ДНК. Поздняя фаза характеризуется экспрессией вирусных генов, последующей модификацией вирусных белков и сборкой новых вирионов.

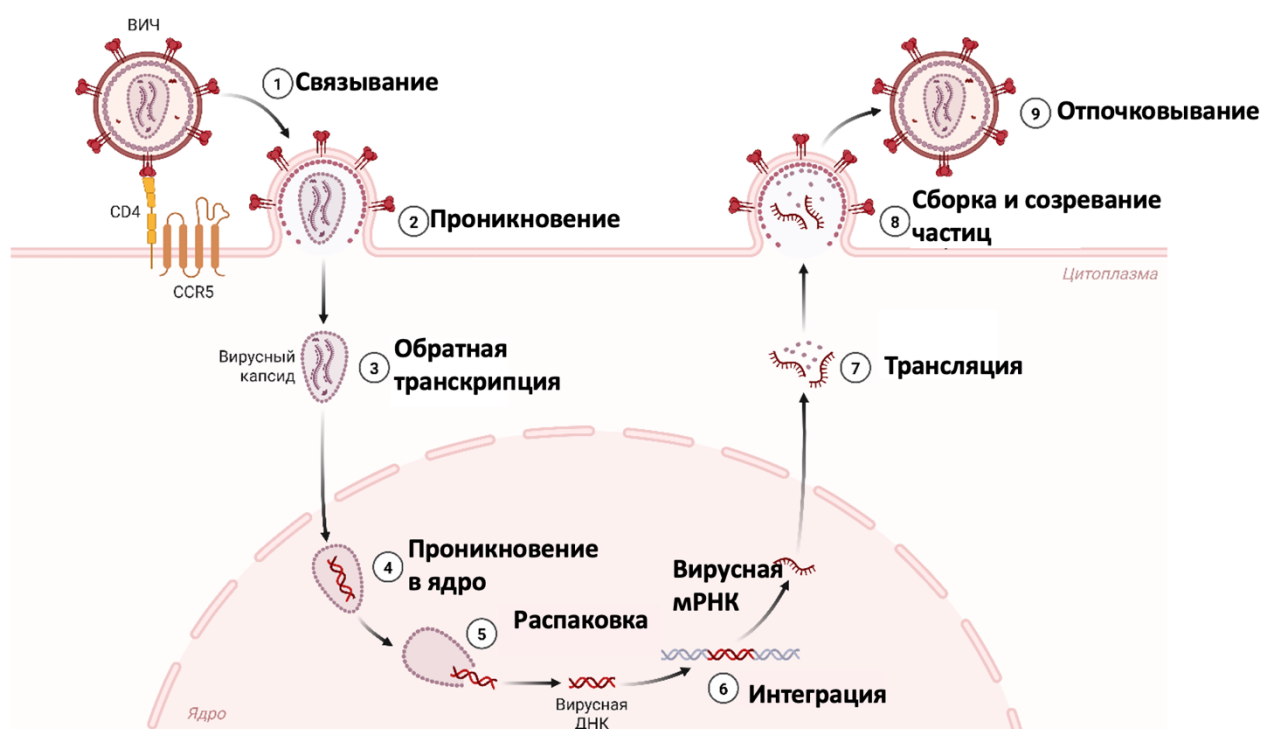


Рисунок 2. Жизненный цикл ВИЧ-1. На основе [18].

Начальный этап репликативного процесса характеризуется специфическим взаимодействием вирусных частиц с клеточными рецепторами на поверхности иммунных клеток, что приводит к последующему слиянию мембран. Вирус преимущественно инфицирует неделящиеся клетки иммунной системы, включая CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты и макрофаги, которые экспрессируют гены корецепторов CCR5 или CXCR4 [18].

После успешного проникновения в цитоплазму клетки вирус инициирует процесс обратной транскрипции, катализируемый вирусной ОТ. Данный процесс завершается образованием двуцепочечной ДНК-копии вирусной РНК [10].

На следующем этапе происходит формирование ПИК, включающего двуцепочечную кДНК, ОТ, ИН, р24 и Vpr [19]. В состав ПИК также интегрируются различные клеточные компоненты, например, LEDGF (фактор роста эпителия хрусталика) [17] и Ku70 [20]. После 3'-процессинга вирусной ДНК, катализируемого ИН, ПИК транспортируется через ядерные поры в ядро клетки, где ИН катализирует встраивание вирусной кДНК в хромосомный аппарат клетки-хозяина, формируя провирусную ДНК.

Запуск процесса транскрипции вирусных генов обеспечивается клеточной РНК-полимеразой II, которая инициирует синтез РНК с промотора, локализованного в области 5'-концевого длинного терминального повтора (5'LTR). Регуляция этого процесса происходит при участии комплекса клеточных транскрипционных факторов, которые связываются с определенными участками 5'LTR [21]. Ключевым активатором транскрипции выступает вирусный белок Tat, обеспечивающий переход от инициации к элонгации [22]. В этом процессе участвуют различные клеточные белки, а также идентифицируются новые потенциальные регуляторы с пока не полностью изученными механизмами действия.

Синтезированная с провирусной ДНК молекула РНК может подвергаться полному или частичному сплайсингу. Синтез регуляторных белков Tat, Nef и Rev происходит с полностью сплайсированных мРНК, которые экспортируются из

ядерного пространства в цитоплазму посредством клеточных транспортных факторов [23]. С частично сплайсированных матричных РНК осуществляется производство белков Vif, Vpr и Vpu [23]. Транспорт несплайсированных и частично сплайсированных транскриптов через ядерную мембрану опосредован вирусным регуляторным белком Rev. Его функция заключается в связывании со структурным элементом RRE (Rev response element), локализованным в пределах мРНК гена *env*. Присутствие RRE-элемента является отличительной чертой именно несплайсированных и частично сплайсированных форм РНК, которые выполняют роль матриц для биосинтеза структурных компонентов вириона. Полноразмерный несплайсированный транскрипт функционирует как геномная РНК для новых вирионов, что определяет ключевую роль белка Rev в переключении синтеза с регуляторных на структурные белки [24].

В цитоплазме происходит синтез структурных белков вируса. Белки, кодируемые геном *gag*, синтезируются в форме полипептида-предшественника p55 (Gag), который впоследствии процессируется вирусной протеазой на p24, p17, p6 и p7 [9]. С генов *gag* и *pol*, который кодирует ферменты ОТ, протеазу и ИН, синтезируется полипептид-предшественник GagPol, процессинг которого также катализируется вирусной протеазой [25]. Соотношение количеств синтезируемых Gag к GagPol составляет 20:1 [6]. Клеточные протеазы расщепляют предшественник белка оболочки Env [9].

На последующих этапах происходит транспорт вирусных белков и геномной РНК к месту сборки, после чего осуществляется упаковка компонентов и формирование новых вирионов.

Заключительная стадия характеризуется отпочковыванием вирионов и их созреванием, сопровождающимся процессингом вирусных полипротеинов Gag и GagPol под воздействием вирусной протеазы [9].

В процессе репликации ВИЧ-1 активно эксплуатирует клеточные ресурсы, однако многие белки, участвующие в этом процессе, остаются недостаточно изученными. Клетка обладает механизмами, ограничивающими репликацию

вируса, включая белки APOBEC3G [17], tetherin [26], TRIM5 [27], с которыми вирус ведет активную борьбу.

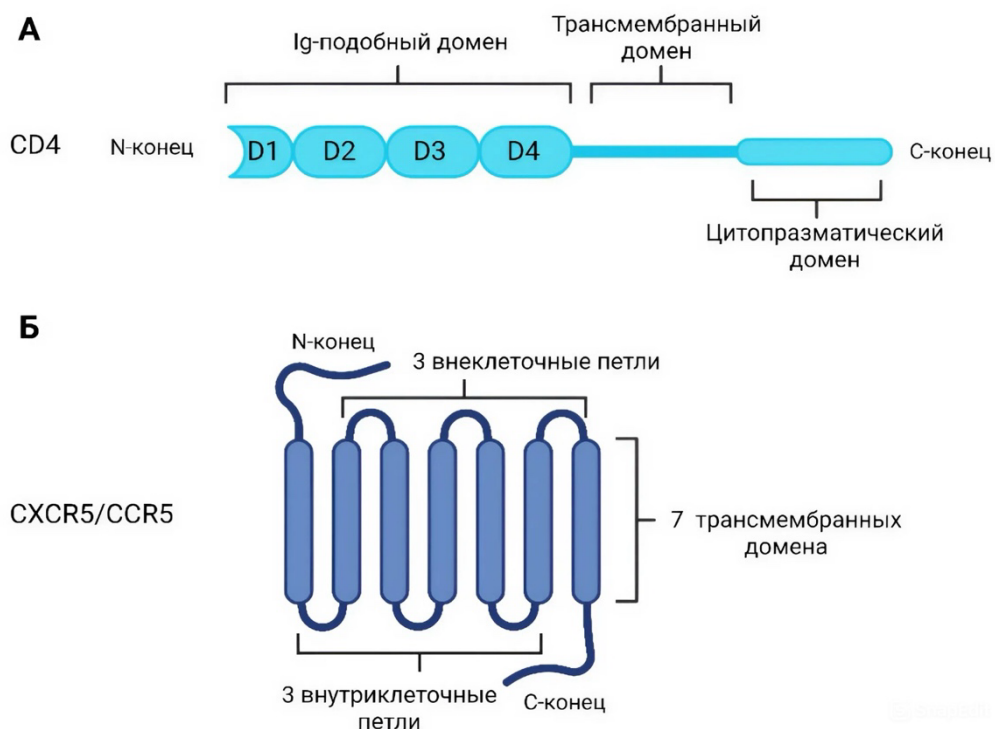
В данном обзоре литературы особое внимание будет уделено детальному анализу ранних стадии репликации ВИЧ-1, а именно слиянию и проникновению, обратной транскрипции и доставке ПИК в ядро, а также репарации повреждений в клеточном геноме, возникающих в результате интеграции в него кДНК вируса. Основное внимание будет сосредоточено на анализе данных о роли клеточных и вирусных белков в регуляции процессов, перечисленных выше, и особенностях их взаимодействия.

## **II. 2. Ранние стадии репликации ВИЧ-1 и участвующие в них клеточные белки**

### **II. 2. 1. Слияние и проникновение**

Слияние вирусной частицы с клеткой начинается с взаимодействия находящегося на поверхности вириона гликопротеина gp120 с клеточным рецептором CD4 и корецептором CCR5 или CXCR4 на поверхности CD4<sup>+</sup> клеток, в первую очередь Т-лимфоцитов [28].

Молекула белка CD4 обладает сложной доменной структурой, (Рисунок 3, А), включающей шесть функционально различных участков. Первые четыре домена на N-конце белка (D1–D4) обладают выраженной гомологией с молекулами иммуноглобулинов (Ig) [29]. При этом пятый домен выполняет роль трансмембранного сегмента, обеспечивающего закрепление молекулы в клеточной мембране. Завершает структурную организацию белка шестой домен на С-конце, локализованный в цитоплазме клетки и выполняющий важные сигнальные функции [29].



**Рисунок 3.** Схематичная доменная структура CD4(A) рецепторов и хемокиновых рецепторов (CCR5/CXCR4(B)).

Рецептор CD4 функционирует в кооперации с хемокиновыми рецепторами CCR5 и CXCR4, формируя сигнальный комплекс на поверхности клетки. Структурная организация данного рецептора (Рисунок 3, Б) характеризуется наличием мультидоменной архитектуры, включающей следующие функциональные элементы: N-концевой домен, расположенный вне клетки и участвующий в первичных взаимодействиях с лигандами; семь трансмембранных спиральных доменов, формирующих характерную  $\alpha$ -спиральную структуру; три внеклеточные петли, выступающие в роли структурных элементов межмолекулярного взаимодействия; три внутриклеточные петли, обеспечивающие передачу сигнала внутрь клетки; C-концевой домен, локализованный в цитоплазме и участвующий в сигнальных каскадах [30].

Такая сложная доменная организация обеспечивает выполнение рецептором CD4 его многофункциональных задач в процессе взаимодействия с различными вирусными и клеточными компонентами [31].



## II. 2. Организация gp120 и gp41

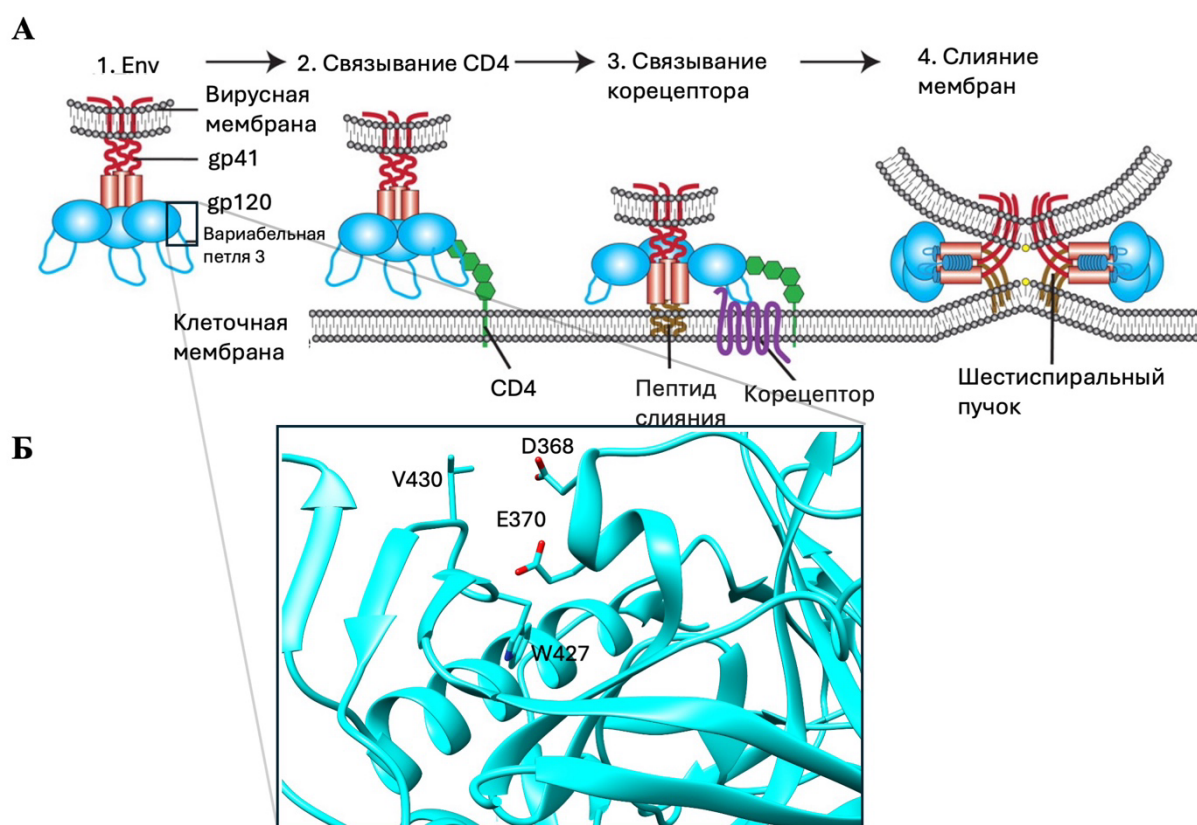
Белки gp120 и gp41 синтезируются в виде единого предшественника — gp160, который подвергается протеолитическому расщеплению клеточной протеазой (фурин) в аппарате Гольджи [32].

Белок gp120 состоит из пяти консервативных доменов (C1–C5) и пяти переменных петель (V1–V5). Консервативные домены обеспечивают стабильность структуры и участвуют в связывании с клеточными рецепторами, тогда как переменные петли, особенно V3, играют ключевую роль в уклонении от иммунного ответа. Маскировка от иммунного ответа достигается с помощью интенсивного гликозилирования, преимущественно в переменных петлях [32].

Белок gp41 представляет собой трансмембранный белок, состоящий из трех основных доменов: внеклеточный домен, содержащий N-концевую спираль (N-HR) и C-концевую спираль (C-HR), которые формируют шестиспиральный пучок (6-HB) в процессе слияния мембран; трансмембранный домен, обеспечивающий закрепление gp41 в липидной мембране вириона; цитоплазматический домен, участвует в сборке вирионов и взаимодействии с клеточными белками [33].

Белки gp120 и gp41 образуют тримеры на поверхности вириона. Каждый тример состоит из трех молекул gp120, связанных с тремя молекулами gp41. Такая организация обеспечивает стабильность оболочки вириона и эффективное взаимодействие с клеточными рецепторами. Согласно структурным исследованиям [34, 35], взаимодействие gp120 ВИЧ-1 с рецептором CD4 опосредовано доменом D1 CD4, в котором выделено 22 ключевых аминокислотных остатка, расположенных в CDR2-подобном регионе (аминокислоты 25–64) [36]. Среди них важную роль играют положительно заряженные остатки K29, K35, K46, R59 и гидрофобный F43. Со стороны gp120 основное взаимодействие происходит через переменные домены V1/V2 и остатки D368, E370, W427 и V430 (Рисунок 4, А, Б). Механизм связывания включает образование гидрофобной полости на gp120, куда входит остаток F43 CD4, окруженный заряженными остатками. При этом остаток R59 CD4 формирует

водородные связи с D368 gp120, а F43 взаимодействует с полостью, образованной остатками D368 и V430 gp120. Эти взаимодействия вызывают конформационные изменения в gp120, обнажая петлю V3, что необходимо для последующего связывания с корецепторами (CCR5 или CXCR4) (Рисунок 4, А) [37, 38].



**Рисунок 4.** А) Стадия слияния ВИЧ-1 с CD4 рецептором и CCR5 корецептором. Переведена с [37]; Б) Участок gp120 на стыке переменных V1/V2 доменов и основные аминокислотные остатки, которые участвуют во взаимодействии с CD4. PDB ID: 4JZW.

Современные данные подтверждают, что многостадийный процесс взаимодействия ВИЧ с клеткой, критически важный для проникновения вируса, является ключевой мишенью для разработки терапевтических стратегий, среди которых основное направление – ингибиторы, блокирующие связывание белка оболочки gp120 с клеточным рецептором CD4. К ним относятся низкомолекулярные ингибиторы CD4ms, пептидные ингибиторы, имитирующие

домен CD4 (CD4-mimetic peptides), и моноклональные антитела, нацеленные на определенные домены CD4; все эти типы подробно описаны в обзоре [39].

Эволюция вируса характеризуется постоянным накоплением мутаций, в том числе в ключевых участках его оболочки. Это приводит к изменению структуры сайта связывания с CD4-рецептором на поверхности иммунных клеток и, как следствие, к снижению чувствительности вируса к терапевтическим средствам. Яркой иллюстрацией этой проблемы стала мутация в штамме вируса CRF01\_AE, которая приводит к появлению гистидина в позиции 375 вместо серина (S375H.). Этот штамм демонстрирует выраженную устойчивость к терапии [40]. Интересно при этом, что замена H375T приводит к тому, что вирус становится чувствительным к терапии [40].

Ключ к пониманию этого различия лежит в размере аминокислоты в позиции 375, которая формирует стенку гидрофобной полости в составе gp120. Остаток F43 рецептора CD4 входит в эту полость, обеспечивая связывание. Гистидин в штамме CRF01\_AE (H375) является объемной аминокислотой и частично заполняет полость, создавая стерическое препятствие для глубокого проникновения низкомолекулярных ингибиторов CD4mc, которые должны блокировать этот сайт связывания [41]. Это же стабилизирует белок оболочки вируса в конформации, менее восприимчивой к таким препаратам. Напротив, замена H375 на треонин (H375T) оптимально перестраивает полость: треонин достаточно мал, чтобы не мешать связыванию, но его метильная группа формирует дополнительные выгодные взаимодействия с молекулой ингибитора. Более того, считается, что T375 эффективнее, чем S375, вытесняет молекулы воды из полости, что также способствует лучшему связыванию лекарственных средств [39, 41]. Таким образом, тип штамма и его конкретные мутации напрямую влияют на эффективность терапии, что делает генотипирование важным инструментом для персонализированного выбора лечения.

Следующим этапом слияния является взаимодействие петли V3 gp120 с корецепторами CCR5 или CXCR4, которое опосредовано ключевыми

аминокислотными остатками на поверхности этих рецепторов. В случае CCR5 критическую роль играют такие остатки, как E283 и D276 [42], в то время как для CXCR4 выявили важность остатков D97, Y116, D182, E288 и других (в основном расположенных во второй внеклеточной петле и трансмембранных доменах) [43].

Согласно общепринятой модели [44, 45], механизм взаимодействия включает несколько типов связей: электростатические взаимодействия, при которых положительно заряженные остатки (например, R315) в кончике петли V3 связываются с отрицательно заряженными остатками E283 (CCR5) [42] или D171 (CXCR4); гидрофобные взаимодействия между остатками I323 (V3) и Y89 (CCR5) или Y116 (CXCR4); а также образование водородных связей, например, с участием остатка G312 (V3) [44, 45].

Структурные исследования показывают, что V3 имеет вытянутую конформацию, что позволяет его консервативному кончику "достигать" второй внеклеточной петли корцептора, в то время как его основание взаимодействует с другими областями (например, N-концом) [46]. После обнажения петли V3 и её связывания с корцепторами CCR5 или CXCR4 взаимодействия, описанные выше, вызывают значительные конформационные изменения и перестройку доменов gp120 (C1–C5 и петель V1/V2), что приводит к экспозиции и активации пептида слияния gp41 [47].

В gp41 N-концевая спираль (N-HR, с остатками W628, I635, L645) внедряется в мембрану клетки, а С-концевая спираль (С-HR, с остатками R579, E584, L588) остается связанной с мембраной вируса, формируя стабильный шестиспиральный пучок (6-НВ) [47]. Этот пучок действует как "молекулярная пружина", сближая мембраны вируса и клетки. Этот процесс сопровождается образованием водородных связей (например, между R579 С-HR и E584 N-HR) и гидрофобных взаимодействий (например, между L645 N-HR и L588 С-HR), что обеспечивает стабильность структуры. В результате сближения мембран вируса и клетки до критического расстояния (около 1–2 нм) происходит дестабилизация липидных

бислосов, что приводит к образованию поры слияния [47]. Через эту пору вирусный геном проникает в цитоплазму клетки, завершая процесс слияния.

Стоит упомянуть, что пептидные ингибиторы слияния (например, энфувиртид), нацеленные на гидрофобный карман gp41 и блокирующие образование 6-НВ, были одобрены для клинического применения [48]. Однако из-за высокой мутагенности вируса (например, мутация G36D в gp41) и неудобства терапии (необходимость подкожных инъекций) их использование ограничено, что стимулирует поиск новых модификаций [49, 50]. Более успешной стратегией стало применение антагонистов корецепторов, в частности одобренного антагониста CCR5 маравирока [50], в то время как антагонисты CXCR4 (например, плерикафор) для терапии ВИЧ остаются в стадии исследований. Перспективным направлением является также разработка моноклональных антител, нацеленных на CCR5, таких как леронлимаб (PRO 140), которые показали высокую эффективность в клинических испытаниях [51, 52, 53].

### **II. 2. 3. Роль белка p17 в ранних этапах репликации ВИЧ-1**

После слияния вирусной оболочки ВИЧ-1 с мембраной клетки-хозяина белки оболочки gp120 и gp41 остаются встроенными в клеточную мембрану, что может способствовать распространению вируса за счет межклеточных контактов [54] и активации иммунных сигнальных путей [55, 56].

После слияния от внутренней поверхности вирусной мембраны отделяется и мигрирует в цитоплазму матриксный белок p17 (MA). Этот белок, состоящий из 132 аминокислот и образующийся в результате протеолиза предшественника Gag, играет ключевую роль в структурной организации вириона [57.].

Белок p17 обладает уникальной структурной организацией. Его глобулярный домен образован пятью  $\alpha$ -спиралями, которые соединены короткими петлями и формируют компактную третичную структуру [58]. Его N-концевой домен (аминокислоты 1–30) содержит миристоилированный остаток глицина (G2), обеспечивающий связывание с мембраной клетки хозяина на поздних стадиях сборки вириона, а основной домен (аминокислоты 30–100) формирует  $\alpha$ -спирали,

взаимодействующие с капсидным белком (p24) для поддержания структурной целостности вириона [59]. С-концевая область белка является гибкой и неструктурированной [58].

Электростатические взаимодействия основных остатков p17 (K30, K32) с фосфолипидами мембраны, такими как PI(4,5)P2 (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат), критически важны для направленного транспорта вирусных компонентов к мембране и сборки новых частиц [60, 61]. Мутации этих остатков (K30E/K32E) приводят к нарушению эффективной сборки и высвобождения частиц, а также к перенаправлению к мультивезикулярному компартменту вместо плазматической мембраны [61].

Фосфолипид PI(4,5)P2 связывается с консервативной расщелиной на поверхности p17, консервативная структурная особенность  $\beta$ -II–V расщелина (названо по аналогии с инсулином), это не  $\beta$ -лист, а поверхностная гидрофобная и основная бороздка, образованная в основном петлевыми регионами и концами  $\alpha$ -спиралей. Её формируют такие остатки, как L21, R22, K27, Y29, H33, W36 и S77, которые создают идеальный карман для связывания гидрофобной цепи и отрицательно заряженной головной группы липида PI(4,5)P2 и способствует экспонированию миристоильной группы, действуя как прямой мембранный «якорь» и «триггер» миристоильного переключателя [60]. ЯМР-исследования показали, что p17 может принимать конформации с экспонированной и секвестрированной миристоильной группой [60]. Третичные структуры белка в обоих состояниях очень похожи, при этом секвестрированная миристоильная группа занимает полость, которая требует лишь незначительных конформационных корректировок для вставки. Экспонирование миристата сопряжено с тримеризацией, при этом миристоильная группа секвестрирована в мономере и экспонирована в тримере [60].

В понимании функций матричного белка p17 ВИЧ-1 произошел значительный сдвиг парадигмы. Исторически центральная роль в ядерном транспорте ПИК отводилась классическим сигналам ядерной локализации (NLS)

в составе p17 [62]. Действительно, p17 содержит два кластера основных аминокислот, функционирующих как NLS: N-концевой NLS (а.а. 25-33, последовательность GKKKYKLN) и С-концевой NLS (а.а. 111-115, последовательность KSKKK) [62, 63]. Считалось, что эти сигналы, взаимодействуя с клеточными импортинами (например, импортином- $\alpha$ ), являются главными детерминантами для проникновения ПИК в ядро неделящихся клеток.

Однако последующие исследования показали, что эта модель неполна. Мутации в этих NLS-доменах (например, замена K26T и K27T) не блокировали ядерный импорт ДНК полностью, хотя и могли снижать инфекционность [64]. Важно, что мутации именно этих лизиновых остатков (K26K27) (например, замена на аланин), существенно снижала инфекционность, не затрагивая напрямую ядерный импорт, но блокируя последующий этап — интеграцию вирусной ДНК в геном хозяина [65, 66]. Это указало на то, что ядерный транспорт ВИЧ-1 является многофакторным процессом, в котором могут принимать участие другие вирусные компоненты ПИК, такие как белок Vpr, обладающий собственным NLS и интегразой [67, 68].

Параллельно было установлено, что критически важные для ранних стадий функции p17 сосредоточены в его С-концевой области и регулируются через посттрансляционные модификации, в частности фосфорилирование по остаткам серина. Ключевыми сайтами фосфорилирования, влияющими на инфекционность, являются S9, S67, S72 и S77 [67]. Эти остатки расположены на поверхности p17, обращенной к мембране. Фосфорилирование, осуществляемое клеточными киназами, упакованными в вирион (например, протеинкиназой А), действует как молекулярный переключатель: добавление отрицательно заряженных фосфатных групп нейтрализует положительный заряд основного домена p17 [66, 69]. Это ослабляет электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными головками фосфолипидов на внутренней стороне липидного бислоя вирусной мембраны. В результате происходит отсоединение

p17 от мембраны после слияния с клеткой-мишенью – ключевой шаг для разборки вирусного капсида и активации комплекса обратной транскрипции [70].

Это свидетельствует о том, что С-конец p17, функции которого регулируются фосфорилированием, важен не для транспорта ПИК, а для подготовки вирусного комплекса к успешной интеграции, вероятно, через обеспечение правильного конформационного состояния ПИК и его защиты от клеточных факторов рестрикции.

Матриксный белок p17 ВИЧ-1 взаимодействует с кальмодулином (CaM) – универсальным внутриклеточным кальций-связывающим белком. За связывание белка p17 с CaM отвечает уникальный составной мотив связывания (bipartite motif) в пределах аминокислотных остатков 8–43 N-концевой области p17 [71]. Критическую роль играют гидрофобные остатки W16 и I19, которые погружаются в гидрофобный карман С-концевого домена CaM, а также L31, I34 и V35, взаимодействующие с N-концевым доменом CaM. Стабилизация комплекса обеспечивается электростатическими взаимодействиями, в частности, солевыми мостиками между K15 p17 и E120 CaM, а также K30 p17 и E47 CaM [72]. Важной особенностью является то, что связывание сопровождается масштабными конформационными изменениями p17, приводящими к экспозиции миристоильной группы, которая, однако, не участвует непосредственно во взаимодействии с CaM [72].

N-концевой домен p17 избирательно связывается с определенными клеточными транспортными РНК (тРНК), такими как тРНК<sup>Lys3</sup> и тРНК<sup>GlyGCC</sup> [73]. Кристаллографический анализ комплекса p17 с тРНК<sup>Lys3</sup> показал, что специфичность связывания обеспечивается аминокислотными остатками p17 W36, K32, которые распознают характерную трехмерную структуру изгиба («локтя») тРНК [74]. Интересно, что сродство p17 к тРНК<sup>Lys3</sup> примерно в 20 раз выше, чем к мембранам, обогащенным фосфоинозитидом PIP2 [73]. Более того, связывание тРНК физически блокирует присоединение p17 к мембранам. Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействие с тРНК и мембраной является



конкурирующим процессом, и их взаимное влияние играет ключевую роль в регуляции сборки вирусных частиц [73, 74].

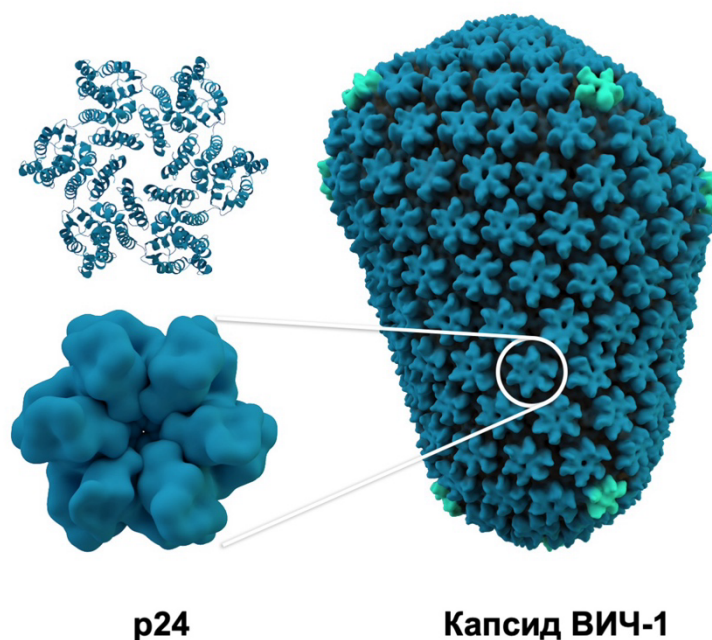
p17 взаимодействует с НОЗ – гистидил-тРНК синтетазой (HARS2) [75]. Это взаимодействие было продемонстрировано в дрожжевой двугибридной системе и подтверждено коиммунопреципитацией в трансфицированных клетках. Взаимодействие нарушается при замене двух лизиновых остатков в позициях 26 и 27 p17 на треонин [75]. При сверхэкспрессии в клетках, продуцирующих ВИЧ-1, НОЗ инкорпорируется в вирионы дикого типа, но не в те, которые содержат мутантный вариант p17 с заменой лизинов. Соответственно, сверхэкспрессия НОЗ в клетках-продуцентах вируса повышает инфекционность частиц ВИЧ-1 дикого типа, но не p17 (KK26/27AA) [75].

Взаимодействия p17 с клеточными компонентами на различных стадиях репликации служат множественным функциональным целям. Связывание с тРНК может контролировать субклеточное распределение основного структурного белка вируса, препятствуя сигналу локализации у мембраны. Взаимодействие с PIP2 обеспечивает специфическое нацеливание на плазматическую мембрану, в то время как связывание с кальмодулином может регулировать конформационные изменения, необходимые для различных этапов репликации.

#### **II. 2. 4. Импорт капсида в ядро**

В литературе есть три основные гипотезы о том, как происходит раскрытие капсида ВИЧ-1 [76,77]. В первой, капсид вируса распадается практически сразу после слияния мембран вируса и клетки и попадания в цитоплазму [78, 79, 80]. Во второй, разрушение капсида начинается, когда ядро вируса взаимодействует с ядерным поровым комплексом (NPC). В третьей, интактный капсид вируса проходит через NPC и затем распадается в ядре [81, 82, 83, 84]. Пока нет единого мнения о том, как именно происходит раскрытие капсида ВИЧ-1. Однако в настоящее время считается, что третья модель самая достоверная, поскольку она подтверждается данными криоэлектронной томографии и корреляционной световой и электронной микроскопии (CLEM) [85, 86].

Капсид ВИЧ-1 представляет собой структуру типа усеченного конуса, состоящую приблизительно из 250 гексамеров и 12 пентамеров вирусного капсидного белка р24 (СА) (Рисунок 5 [87]). Этот белок – важнейший элемент структуры ВИЧ-1: его строение и основные домены определяют, как вирус собирается, насколько он стабилен и способен заражать клетки. Белок содержит N-концевой домен, состоящий из  $\beta$ -шпильки и семи  $\alpha$ -спиралей (Н1–Н7) [88]. Гексамерные структуры капсида образуются именно за счет взаимодействия N-концевых доменов шести субъединиц, которые формируют внутреннее ядро капсида [89, 90]. В центре этого кольцеобразного ядра образуется пора. Важнейшим структурным элементом, формирующим эту пору, является N-концевая  $\beta$ -шпилька (остатки 1-13) каждого мономера р24 [90]. Именно эти шесть  $\beta$ -шпилек, собранные вместе, и образуют характерную структуру в центре гексамера. В этой области расположены критически важные положительно заряженные остатки (включая аргинины), которые формируют электростатический барьер [90].



**Рисунок 5.** Структура капсида ВИЧ-1 (тип усеченного конуса) (справа), состоящая из 250 гексамеров (слева, обозначены темно зеленым) и 12 пентамеров (светлозеленый в структуре капсида) р24. Переведено с [87].

Шесть С-концевых доменов (CTD), каждый из которых включает четыре  $\alpha$ -спирали (H8–H11) образуют внешнее кольцо гексамера, которое обладает значительной подвижностью относительно внутреннего NTD-ядра. Гексамеры в капсидной решётке соединяются между собой исключительно через димеризацию CTD-CTD доменов соседних гексамеров. Ключевую роль в этом процессе димеризации играют гидрофобные взаимодействия, в том числе с участием остатков W184 и M185 в спирали H9 [90]. CTD p24 также содержит консервативную последовательность (остатки 153–172), важную для сборки капсида [90].

Для того чтобы добраться до ядра клетки и обеспечить проникновение ПИК в ядро, ВИЧ-1 использует многие клеточные белки.

Так, фасцикулярный и удлиняющий белок дзета 1 (FEZ1) - многофункциональный адаптер кинезина-1 - связывается с p24 ВИЧ-1, позволяя капсиду регулировать свою подвижность [91]. Отрицательно заряженные полиглутаматные участки в FEZ1 связываются с кольцом положительно заряженных остатков аргинина в центральной поре капсидного гексамера, облегчая перемещение входящего вирусного капсида в ядро клетки [91]. Кроме того, ВИЧ-1 также использует киназу 2 (MARK2) для фосфорилирования остатка серина 58 (S58) FEZ1, который играет решающую роль в контроле транспорта к ядру на основе кинезина-1 [92, 93]. Хотя кинезин-1 обычно перемещает белковые комплексы от центра клетки к периферии, капсид-ассоциированный FEZ1 позволяет ВИЧ-1 контролировать перемещение к ядру для эффективной инфекции. Вскоре после открытия FEZ1 было обнаружено, что двухкаудальный D-грузовой адаптер 2 (BICD2) действует как специфичный для капсида ВИЧ-1 адаптер для динеин-опосредованной подвижности входящего вирусного ядра [94, 95]

Многие нуклеопорины (Nup, например, NUP214, NUP98, NUP35, NUP135 и NUPL2) взаимодействуют с p24 ВИЧ-1, влияя на проникновение капсида в ядро и интеграцию вирусной кДНК. Это взаимодействие основано на том, что

специальные FG-мотивы нуклеопоринов (короткие повторяющиеся последовательности аминокислот фенилаланина и глицина), образующие внутри ядерной поры барьер, связываются со специфической гидрофобной полостью на поверхности p24, условно обозначаемой по позиции ключевой аминокислоты как N57 [96, 97, 98, 99]. Вирусный капсид, используя эту полость как «молекулярную отмычку», имитирует клеточные механизмы ядерного импорта: гидрофобная полость, образованная совокупностью гидрофобных аминокислот вокруг позиции N57 (например, A88, P90, V91) служит идеальным карманом для связывания с FG-повторами, что позволяет вирусу эффективно преодолевать избирательный барьер ядерной поры и доставлять свой генетический материал в ядро клетки-хозяина. Уточним, что N57 образует специфичные и прочные водородные связи с атомами пептидного остова FG-повтора.

Например, NUP358 (RANBP2) связывается с p24 через свой циклофилин-подобный домен, катализируя цис-транс изомеризацию пептидной связи G89-P90 в p24, что стабилизирует капсид и регулирует его взаимодействие с другими компонентами комплекса ядерной поры. Мутация P90A в p24 нарушает взаимодействие p24 с NUP358 [100]. NUP153 и NUP98 также взаимодействуют с p24 через FG-мотивы, облегчая ядерный импорт. Мутация N74D в p24 изменяет паттерн интеграции вируса, перенаправляя вирусную ДНК в регионы генома, расположенных вокруг центромеры [100]. Взаимодействия вирусного капсида с ядерной порой зависят от клеточного контекста: в неделящихся клетках капсид использует NPC-зависимый путь, тогда как при митозе вирус проникает через разрушенную ядерную оболочку [101, 102]

Циклофилин А (CypA), клеточная пропил-изомераза, связывается с открытой петлей в N-концевом домене p24 (аминокислоты 85–93), стабилизируя капсид и модулируя его взаимодействие с NPC [103]. Ингибирование CypA циклоспорином (CsA) нарушает взаимодействие капсида с NUP358 и транспортным белком TNPO3, но не влияет на связывание с другими Nup.

Интересно, что мутация Р90А в р24 также нарушает его связывание с СурА, что указывает на кооперативность этих факторов [103].

CPSF6 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6) – это клеточный белок, первоначально известный своей ролью в процессинге 3'-конца мРНК в ядре [104]. Связываясь с р24, CPSF6 способствует его продвижению к ядерной поре по системе микротрубочек, поэтому снижение уровня полноразмерного CPSF6 может нарушить нормальный ядерный импорт вируса и выбор сайтов интеграции [105]. Важно при этом, что преждевременное или избыточное связывание CPSF6 с р24 нарушает способность капсида доставлять вирусный геном в ядро клетки. Однако СурА может защищать капсид ВИЧ от преждевременного связывания с CPSF6 [106]. Суперэкспрессия укороченной формы белка, CPSF6-358, лишенной С-концевого сигнала ядерной локализации, в цитоплазме инфицированной клетки приводит к мощному подавлению вирусной инфекции [107]. Механизм рестрикции заключается в прочном связывании CPSF6-358 с капсидом ВИЧ-1, которое препятствуя связыванию капсида с полноразмерным CPSF6, нарушает транспорт капсида в ядро (поскольку не имеющий NLS CPSF6-358 не может такой транспорт обеспечить), а кроме того, приводит к разрушению капсида в цитоплазме. Ключевым участком взаимодействия со стороны CPSF6 является короткий FG-мотив (Phe316-Gly317) [107], который встраивается в консервативный гидрофобный карман вокруг N57 в р24. Мутации в этом кармане, такие как N74D или A77V, полностью нарушают это взаимодействие вирусного и клеточного белка и делают вирус невосприимчивым к действию усеченной формы белка CPSF6 (CPSF6-358) [107].

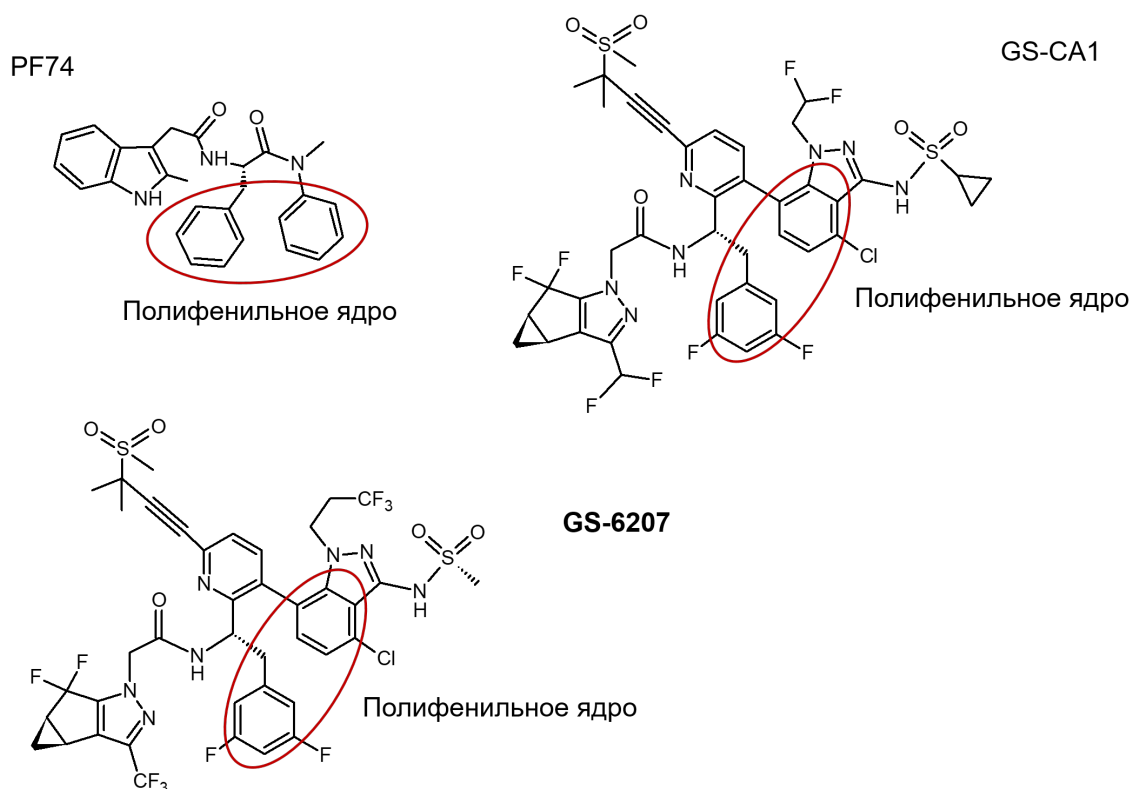
Белок Sec24C, компонент COPII-везикул, критически важен для стабильности капсида. Снижение уровня Sec24C в клетке приводит к дестабилизации вирусного капсида, что негативно сказывается на процессах обратной транскрипции, ядерного импорта и общей инфекционности вирусных частиц [108]. Кристаллографические исследования подтвердили прямое связывание Sec24C с р24. Он связывается с р24 через FG-мотив (аминокислоты 228–242), причем

гидрофобный карман p24 (карман вокруг N57) взаимодействует с F236 в Sec24C [108].

### **Ингибиторы сборки капсида**

Учитывая важность правильной структуры капсида и его взаимодействий с белками клетки для всего жизненного цикла ВИЧ-1, в последнее время активно разрабатываются соединения, способные нарушать процессы сборки и разборки капсида. Эти ингибиторы нацелены главным образом на специфический карман, расположенный в межузбъединичном интерфейсе NTD-CTD. Пионером среди этой группы соединений выступило вещество PF74 (Рисунок 6). В результате его целенаправленной оптимизации были получены усовершенствованные представители серии GS-CA – GS-CA1 и GS-6207 (ленакапавир) (Рисунок 6). Хотя они сохраняют ключевой функциональный мотив PF74, их фармакологический профиль отличается повышенной мощностью и длительностью воздействия [109]. Связывание ингибиторов в указанном сайте существенно повышает стабильность капсида, препятствуя его разборке в ядре клетки, а также конкурентно вытесняет клеточные белки CPSF6 и Nup153, которые в норме взаимодействуют с этим же карманом. Таким образом, данные соединения разрывают жизненно важные для вируса контакты с клеточными факторами, блокируя проникновение капсида через ядерную пору [110].

В 2022 году был зарегистрирован новый препарат для АРВТ на основе ленакапавира – Sunlenca, отличающийся выдающейся эффективностью в пикомолярном диапазоне. Как первопроходец в своем классе, он обладает длительным действием с периодом полувыведения до 12 дней (при введении перорально) и 12 недель (при подкожном введении) [111]. Это позволяет применять его в составе инъекционной терапии с интервалом до 6 месяцев или пероральной с еженедельным приемом, что упрощает схему лечения.



**Рисунок 6.** Структуры ингибиторов разборки капсида ВИЧ-1.

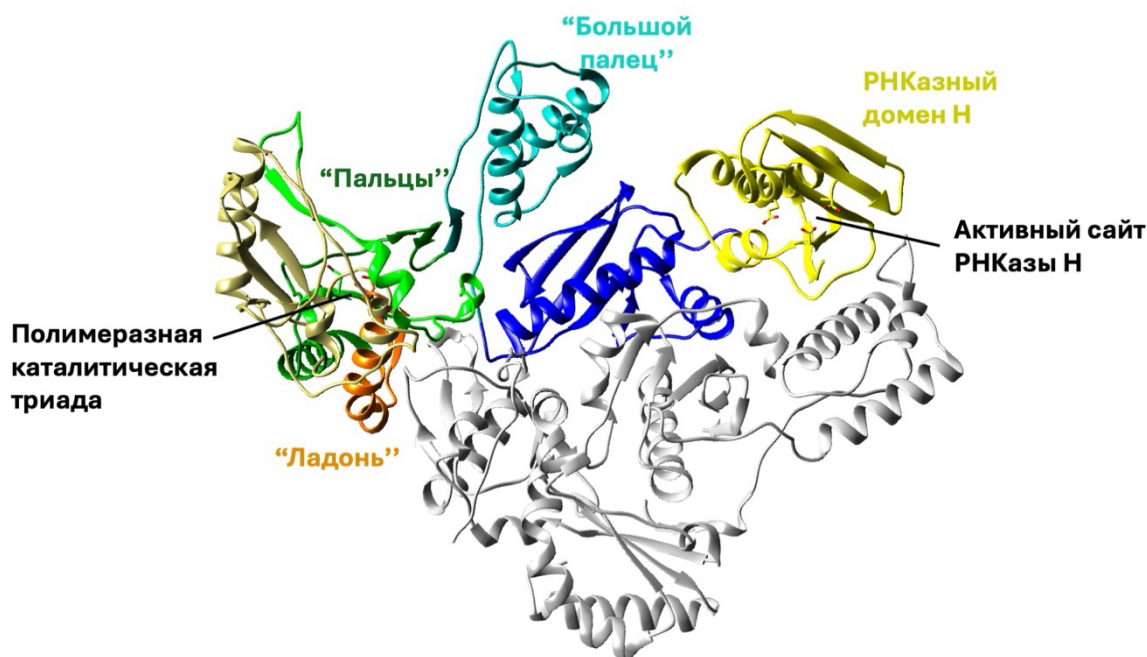
Клинические и доклинические исследования показали, что аминокислотные замены Q67H и N74D, а также двойная мутация Q67H/N74D в белке p24 приводят к развитию устойчивости ВИЧ к ленакапавиру [112, 113]. Хотя ленакапавир и показывает прекрасные результаты по ингибированию вируса, использовать его в качестве монотерапии нельзя, поскольку есть риск возникновения вирусной резистентности.

## II. 2. 5. Обратная транскрипция

### II. 2. 5. 1. Строение ОТ ВИЧ-1

ОТ ВИЧ-1 представляет собой гетеродимер из субъединиц p66 и p51, которые образуются при расщеплении предшественника GagPol вирусной протеазой. Субъединица p66 (66 кДа) содержит все каталитические домены, а p51 (51 кДа) играет структурную роль, стабилизируя комплекс [114] (Рисунок 7).

В структуре субъединицы р66 ОТ (Рисунок 7) выделяют несколько основных доменов. Обратно-транскриптазный домен, необходимый для РНК- и ДНК-зависимой ДНК-полимеразной активности (1-320 а. о.), содержит основные мотивы "пальцы" (fingers) (1-82, 118-155 а. о.) для связывания ДНК/РНК, а также "ладонь" (palm) (86-117, 156-236 а. о.), которая включает каталитическую триаду



**Рисунок 7.** Доменная организация обратной транскриптазы ВИЧ-1 (PDB ID: 7SLR). Цветовое кодирование: субъединица р51 - серый. Домены субъединицы р66: субдомен "пальцы" (fingers) полимеразного домена - светло-зеленый, субдомен "ладонь" (palm) полимеразного домена - оранжевый, субдомен "большой палец" (thumb) полимеразного домена - голубой, РНКазы Н домен - желтый, соединительный домен (connection domain) - синий.

D110-D185-D186, координирующую ионы  $Mg^{2+}$  для присоединения нуклеотидов, а также "большой палец" (thumb) (237–318 а. о.) для стабилизации дуплекса ДНК-праймер/матрица [115]. Домен РНКазы Н, расположенный в С-концевой области (427-560 а. о.), выполняет функцию деградации РНК в гибридах РНК-ДНК после синтеза (-) цепи ДНК. Этот домен содержит консервативный мотив D443-E478-D498-D549, связывающий  $Mg^{2+}$  [115]. Полимеразный и РНКазный домены р66 связаны соединительным доменом (319–426 а. о.), обеспечивающим гибкость



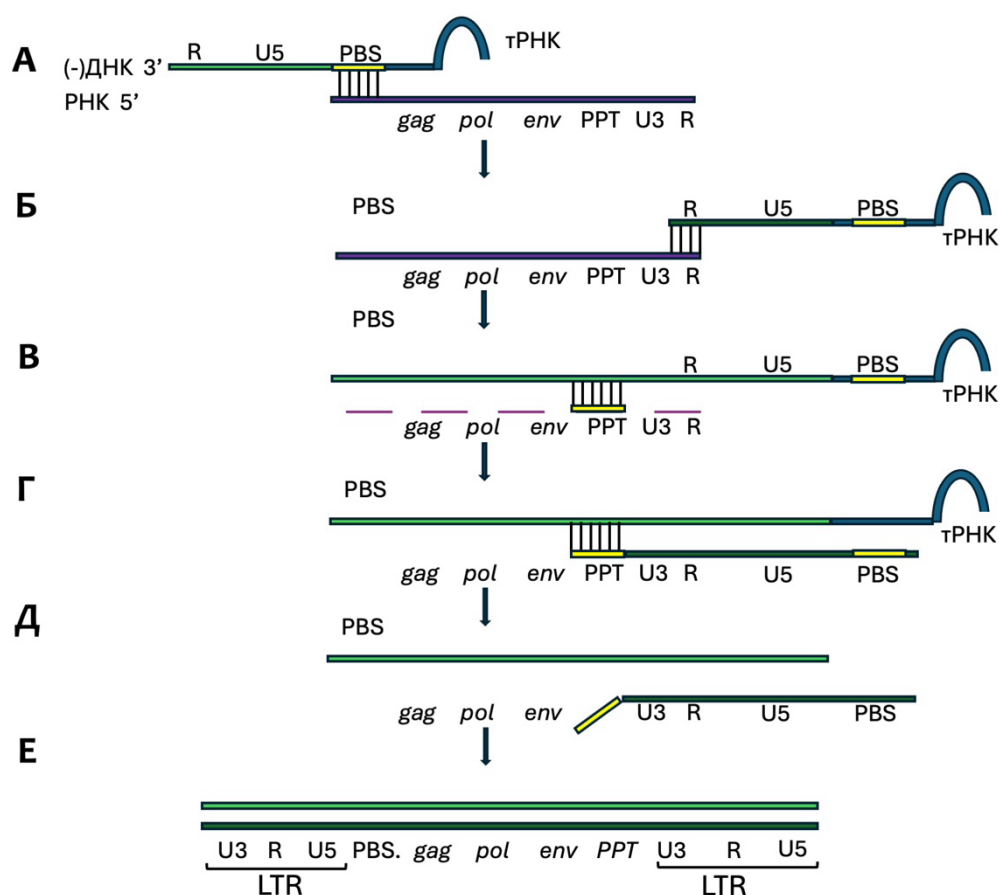
структуры для переключения между активностями. Мутации в данной области нарушают процессивность синтеза ДНК.

Субъединица р51 повторяет структуру р66 в участке 1–440 а.о., но из-за иной пространственной укладки не имеет каталитической активности. Её роль заключается в стабилизации р66 и формировании "канала" для связывания ДНК/РНК матрицы [116].

## **II. 2. 5. 2. Процесс обратной транскрипции**

Инициирование обратной транскрипции ВИЧ-1 обусловлено комплементарным связыванием клеточной тРНК<sup>Lys3</sup> с праймер-связывающим участком (PBS) вирусного генома [117]. На первом этапе ОТ катализирует элонгацию праймера, синтезируя минус-цепь ДНК, комплементарную регионам U5 и R (прямой терминальный повтор). Далее РНКазный домен ОТ гидролизует транскрибированные участки РНК-матрицы (5'-U5/R) (Рисунок 8, А). Синтезированный фрагмент (-)ДНК транслоцируется к 3'-концу вирусной РНК, гибридизуясь с комплементарной R-областью (Рисунок 8, Б). На заключительной стадии (Рисунок 8, В) ОТ завершает синтез полноразмерной (-)ДНК, а РНКазы Н деградируют оставшуюся матричную РНК, сохраняя полипуриновый тракт (РРТ) для инициации синтеза (+)ДНК [10].

Инициирование синтеза плюс-цепи ДНК опосредовано коротким полипуриновым трактом (РРТ) вирусной РНК, выполняющим функцию праймера (Рисунок 8, Г) [10]. Последующая элиминация тРНК-праймера катализируется РНКазой Н, после чего новосинтезированный фрагмент (+)ДНК транслоцируется к 5'-концу минус-цепи. Комплементарное связывание праймер-связывающих участков (PBS) противоположных цепей (Рисунок 8, Д) обеспечивает завершение синтеза двуцепочечной вирусной кДНК, структурно идентичной исходному РНК-геному. Сформированная кДНК далее подвергается интеграции в геном клетки-хозяина [118].



**Рисунок 8.** Процесс обратной транскрипции. А) Связывание праймера тРНК<sup>Lys3</sup> и синтез “–” цепи ДНК (зеленым); Б) Скачок нового фрагмента ДНК на 3’-конец РНК; В) Синтез ДНК и разрушение вирусной РНК; Г) С использованием неразрушенного фрагмента РНК (PPT) в качестве праймера начинается синтез второй цепи ДНК. Д, Е) Участок PBS “перепрыгивает” на 3’-конец РНК и продолжается синтез уже второй цепи вирусной ДНК. Адаптировано с [10].

Помимо интегрированного провируса, на ранних стадиях инфекции обнаруживаются высокие уровни неинтегрированных форм вирусной ДНК (линейной и кольцевой, включая эписомы 1-LTR и 2-LTR). Хотя интеграция долго позиционировалась как обязательный этап жизненного цикла ретровирусов, а кольцевые ДНК-формы, как биологически инертные конечные продукты [119], современные исследования с мутантами интегразы и репортерными конструкциями подтвердили их способность к ограниченной транскрипционной активности некоторых генов недостаточной для продуктивной инфекции [120,121].

Одно из последних исследований впервые демонстрирует генерацию инфекционного вирусного потомства ВИЧ-1 из неинтегрированных 1-LTR-эписом, минуя классический путь интеграции в геном хозяина, используя амплификацию кольцевой ДНК в трансфицированных клетках [122].

Ингибиторы обратной транскриптазы (ИТ), подразделяющиеся на нуклеозидные (НИОТ) и нуклеозидные (ННИОТ), стали первым и основным классом антиретровирусных препаратов. Механизм действия НИОТ основан на их структурном сходстве с естественными субстратами фермента. Ключевое отличие заключается в отсутствии 3'-гидроксильной группы в углеводном фрагменте нуклеозида. Данная модификация приводит к тому, что включение такого ингибитора в растущую ДНК-цепь вызывает необратимую остановку синтеза, выполняя роль терминатора роста цепи. В отличие от них, ННИОТ являются аллостерическими ингибиторами и связываются со специфическим гидрофобным участком ОТ, расположенным вблизи ее каталитического центра. Это взаимодействие вызывает конформационные изменения в структуре фермента, что приводит к прямому ингибированию реакции полимеризации. Подробный анализ современных представителей данного класса, их фармакологических свойств и клинического применения представлен в соответствующих обзорах литературы [123, 124].

### **II. 2. 5. 3. Партнеры ОТ ВИЧ-1**

Для ОТ ВИЧ-1 идентифицировано лишь ограниченное число клеточных партнеров. Вероятно, это обусловлено тем, что процесс обратной транскрипции протекает внутри вирусного капсида, что существенно ограничивает возможность взаимодействия ОТ с клеточными белками на этапе транскрипции вирусного генома. Тем не менее, существует ряд клеточных белков, которые могут участвовать в этом процессе.

Эукариотические факторы элонгации трансляции eEF1A и eEF1G играют неожиданную роль в стабилизации комплекса обратной транскрипции ВИЧ-1.

Данный комплекс состоит из вирусной РНК, ОТ, интегразы, нуклеокапсидного белка p7, p17, Vpr, а также тРНК-праймера и некоторого количества клеточных белков [10].

С помощью иммуноприцепитации за антитела к белкам eEF1A и eEF1G удалось выявить их связывание с субъединицей p51 ОТ и интегразой. Эксперименты показали, что при снижении уровня eEF1A/eEF1G с помощью siRNA эффективность обратной транскрипции резко падает, и количество вирусной ДНК сокращается. Ученые предполагают, что эти белки не только стабилизируют комплекс в цитоплазме, но и способствуют его транспорту к ядру, обеспечивая своевременное завершение синтеза вирусной ДНК [125]. Чуть позднее обнаружили, что eEF1A взаимодействует с 5'UTR геномной РНК ВИЧ-1. Это взаимодействие важно для позднего этапа синтеза ДНК при обратной транскрипции [126].

Исследователи идентифицировали новый класс соединений – производные оксазол-бензолсульфонамида (C7, C8, C9), которые ингибируют репликацию ВИЧ-1 через уникальный механизм [127]. Эти соединения связываются непосредственно с вирусной ОТ, но не подавляют её ферментативную активность *in vitro*. Вместо этого они нарушают взаимодействие ОТ с клеточным фактором eEF1A, что приводит к подавлению обратной транскрипции в клетках. Важно, что соединения активны против штаммов ВИЧ-1, устойчивых к стандартным ненуклеозидным ингибиторам ОТ (например, с мутациями K103N и Y181C), что открывает перспективы для разработки препаратов нового класса, нацеленных на белок-белковые взаимодействия [127].

цАМФ-зависимая протеинкиназа А упакована в вирионы ВИЧ-1 и действует как кофактор для обратной транскрипции. В вирусах с пониженной активностью данного фермента нарушен синтез кДНК, несмотря на нормальную ферментативную активность ОТ. Вероятно, протеинкиназа А фосфорилирует вирусные или клеточные компоненты, усиливая функцию ОТ и ранние события после проникновения [128].

Установлено, что белок АКАР149 взаимодействует с ОТ ВИЧ-1 как в дрожжевой двугибридной системе, так и в клетках человека [129]. Сайт связывания АКАР149 находится в домене РНКазы Н ОТ. Подавление экспрессии АКАР149 в инфицированных ВИЧ-1 клетках, значительно замедляет вирусную репликацию на этапе обратной транскрипции [129]. Мутантная форма ОТ с заменой глицина на аргинин в положении 462 (G462R) в домене РНКазы Н, хотя и сохраняла значительную ферментативную активность *in vitro* (как полимеразную, так и нуклеазную), но не могла эффективно осуществлять обратную транскрипцию в инфицированных клетках [129]. Количественный анализ в дрожжевой двухгибридной системе показал, что мутация G462R в ОТ снижает эффективность её связывания с АКАР149 на 67%, что прямо подтверждает важность именно этого молекулярного взаимодействия [129].

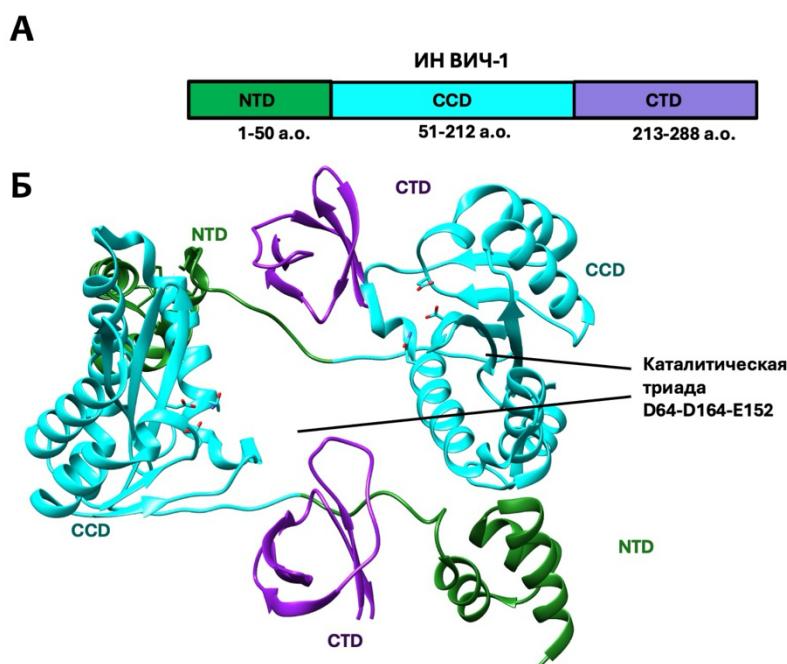
## **II. 2. 6. Интеграция**

### **II. 2. 6. 1. Строение ИН ВИЧ-1**

Мономер интегразы ВИЧ-1 (ИН) (белок массой 32 кДа) состоит из трех доменов:

- 1) N-концевой домен (NTD, 1-50 а.о.) (Рисунок 9, А, Б) содержит мотив цинковый палец типа ННСС (Н16-Н17-С40-С43), стабилизированный ионом  $Zn^{2+}$ . Данный домен участвует в мультимеризации ИН (формирование димеров и тетрамеров), кооперативном связывании ДНК, регуляции каталитической активности [7].
- 2) Каталитический домен (CCD, 51-212 а.о.) (Рисунок 9, А, Б). Структура данного домена имеет РНКазо-Н-подобную укладку, в его активном центре находится мотив DDE (D64-D116-E152). Данный домен ответственен за 3'-процессинг: отщепление динуклеотида GT с 3'-концов вирусной ДНК, а также перенос цепи – встраивание процессированной ДНК в геном хозяина [7].

3) С-концевой домен (CTD, 213-288 а.о.) (Рисунок 9, А, Б) образует структуру SH3-подобного  $\beta$ -бочонка и отвечает за неспецифическое связывание клеточной ДНК, предпочитая однако АТ-богатые регионы [7].



**Рисунок 9.** Строение димера ИН ВИЧ-1 на основе [7]. А) Общая схема доменной организации ИН ВИЧ-1; Б) Третичная структура ИН ВИЧ-1 (ID 2b4j), темно-зеленым обозначен – NTD, голубым обозначен – CCD, фиолетовым обозначен – CTD.

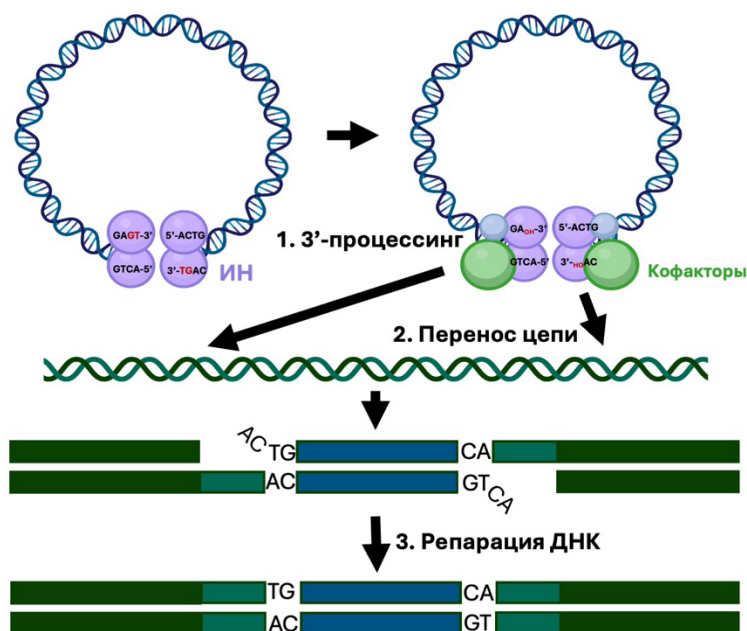
ИН функционирует в олигомерном состоянии. Точная структура полноразмерной ИН ВИЧ-1 в составе преинтеграционного комплекса (ПИК) остается не до конца установленной из-за трудностей в ее кристаллизации. На основании данных, полученных для интеграз других ретровирусов, а также результатов биохимических и биофизических исследований (таких как анализ с помощью малых углов рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) и электронной микроскопии), предполагается, что активной формой ИН ВИЧ-1 является мультимер [130]. Основными предлагаемыми моделями являются тетрамер, димер тетрамеров или димер октамеров, где мультимеризация необходима для кооперативного связывания с двумя концами вирусной ДНК и последующего выполнения двухступенчатой реакции интеграции [131].

## **II. 2. 6. 2. Процесс интеграции**

Процесс интеграции начинается с того, что ИН связывается с консервативными последовательностями, расположенными в составе LTR на концах обратно транскрибированной вирусной кДНК, тем самым образуя нуклеопротеиновый комплекс, который составляет основной компонент ПИК [132]. В составе этого комплекса ИН катализирует две последовательные реакции: 3'-процессинг, который заключается в удалении 3'-концевых динуклеотидов GT с обоих концов вирусной кДНК (Рисунок 10), и перенос цепи, который происходит после дополнительного связывания ИН клеточной ДНК и приводит к ковалентному встраиванию процессированной вирусной кДНК в ДНК клетки-хозяина [7].

Клеточные факторы, участвующие в интеграции ВИЧ-1, в данном обзоре рассматриваться не будут, поскольку они подробно представлены в недавно опубликованном обзоре на эту тему: [1].

Первыми эффективно подавляющими процесс интеграции оказались ингибиторы стадии переноса цепи (ИПЦИ). Связываясь с комплексом ИН и вирусной ДНК, они блокируют ключевую стадию встраивания вирусного генома в геном клетки. Их механизм основан на хелатировании ионов магния в активном центре фермента. К ИПЦИ первого поколения (ралтегравир, элвитегравир) достаточно быстро развивается устойчивость. Препараты второго поколения (долутегравир, биктегравир) имеют усовершенствованную химическую структуру, что обеспечивает им более высокий генетический барьер, и устойчивость вируса к ним встречается очень редко [133].



**Рисунок 10.** Схема процессов интеграции и репарации ВИЧ-1: 1) 3'-процессинг, 2) перенос цепи и 3) постинтеграционная репарации.

Кроме того, на разных стадиях клинических и доклинических испытаний находятся ингибиторы взаимодействия ИН с клеточным белком LEDGF/p75 (Lens Epithelium Derived Growth Factor) – LEDGINs [134]. LEDGF/p75 связывается с ИН ВИЧ-1 и направляет прединтеграционный комплекс к активно транскрибируемым регионам хроматина [135]. Связывание LEDGINs с ИН нарушает ее взаимодействие с LEDGF/p75, а также влияет на ее мультемеризацию, приводя к образованию функционально неактивных мультимеров. В результате такого комбинированного действия LEDGINs влияют как на ранние, так и на поздние стадии репликации ВИЧ-1. Как конкуренты LEDGF/p75 в связывании с ИН, они сильно снижают эффективность интеграции, а влияя на мультимерную структуру ИН, они нарушают ее взаимодействие с вирусной РНК на стадии формирования новых вирионов. В результате образуются дефектные вирионы, неспособные осуществлять обратную транскрипцию при заражении новых клеток [136].



## **II. 2. 7. Постинтеграционная репарация**

В результате интеграции в геноме инфицированной клетки образуются 5-ти нуклеотидные одноцепочечные участки ДНК с обеих сторон от встроенной кДНК вируса (провируса) и на 5'-концах вирусной ДНК остаются неспаренные динуклеотиды (Рисунок 10) [137]. Репарация этих повреждений осуществляется клеточными белками [20, 138]. На данный момент известно об участии некоторых белков из системы репарации двуцепочечных разрывов ДНК по пути нехомологичного соединения концов (NHEJ) в постинтеграционной репарации, однако нельзя исключать альтернативные пути репарации.

Постинтеграционная репарация (ПИР) ВИЧ-1 инициируется рекрутированием сенсорных киназ DNA-PK и ATM к сайтам повреждений ДНК, образованных при интеграции провируса [20]. Ключевой этап - прямое связывание ИН ВИЧ-1 с белком Ku70 (субъединицей DNA-PK), что формирует якорный комплекс, обеспечивающий активацию обеих киназ [20]. Установлен регион связывания белков Ku70 и ИН, а именно аминокислотные остатки E212 и L213 в ИН [139] и I72, S73 и I76 со стороны Ku70 [140].

Знание структуры сайта связывания позволило предложить первые ингибиторы взаимодействия ИН и Ku70, названные KuINins [141]. Надо отметить, что это принципиально новый класс ингибиторов, блокирующих репликацию вируса за счет ингибирования ПИР.

Последующая активация DNA-PKcs и ATM запускает сигнальный каскад: фосфорилирование гистона  $\gamma$ H2AX и киназы CHK2, что сближает ПИР с процессом репарации двуцепочечных разрывов ДНК [142]. Однако до сих пор не выявлены все участники ПИР ВИЧ-1 и не известен точный механизм данного процесса.

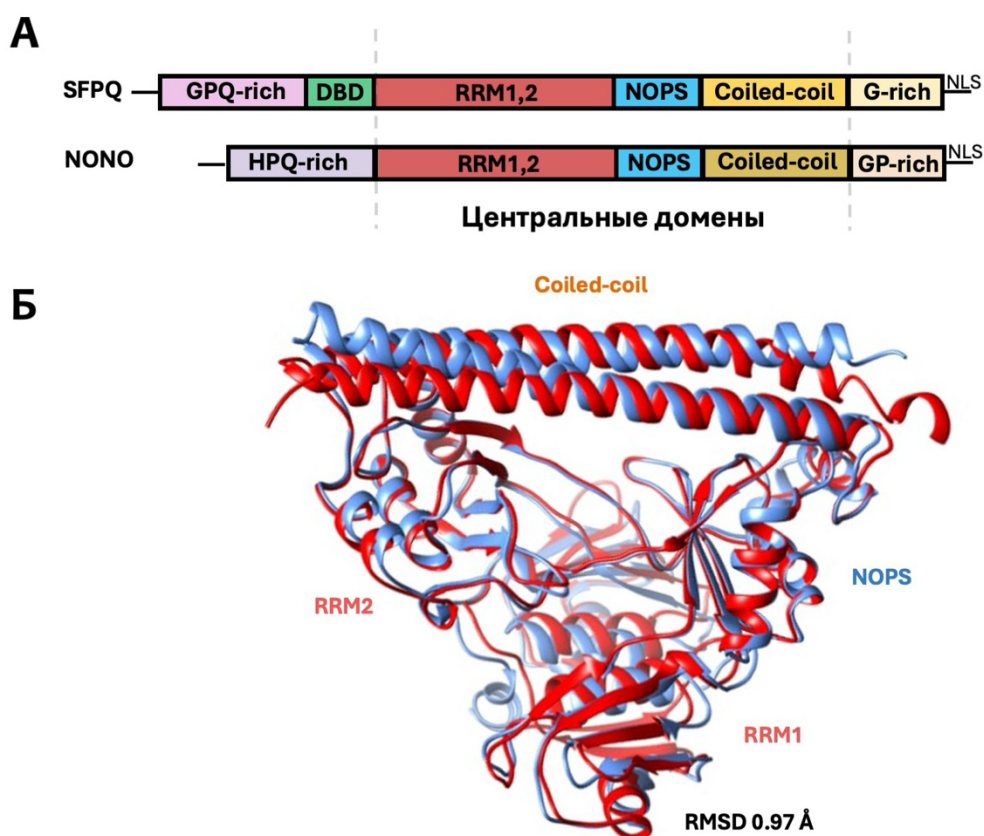
## **II. 3. Роль белков SFPQ и NONO в жизненном цикле ВИЧ-1**

Клеточные белки SFPQ и NONO представлены в литературе как потенциальные участники репликации ВИЧ-1, однако их роль в репликации вируса не до конца понятна из-за недостаточности и противоречивости

существующих данных [3,143]. Настоящий обзор освещает лишь часть функций SFPQ и NONO в клетке и жизненном цикле ВИЧ-1, детальный анализ опубликован ранее [2].

SFPQ представляет собой ядерный многофункциональный белок семейства DBHS (*Drosophila Behavior Human Splicing*), играющий важную роль в различных клеточных процессах. Структурная организация SFPQ характеризуется наличием центрального ядра, включающего четыре ключевых домена: два РНК-связывающих домена (RRM1 и RRM2); домены NOPS (NonA/paraspeckle) и Coiled-Coil, ответственные за белок-белковые взаимодействия; N- и C-концевые участки белка SFPQ характеризуются отсутствием четкой пространственной структуры и значительно отличаются от аналогичных доменов других членов семейства DBHS (Рисунок 11). N-концевая часть SFPQ содержит два домена GPQ-rich и предположительно ДНК-связывающий домен (DBD) [144,145]. Скорее всего, именно эти вариабельные участки определяют индивидуальные функции белка.

В клетке белок SFPQ в основном функционирует в виде гомо- или гетеродимеров со своим партнером по семейству DBHS белком NONO [146]. Такая способность к димеризации расширяет его функциональные возможности. По строению белок NONO крайне схож с SFPQ, однако у NONO отличается N-конец, а именно отсутствует предполагаемый ДНК-связывающий домен и присутствует неструктурированный HPQ-rich домен (Рисунок 11, А). Структурный анализ центральных доменов SFPQ и NONO выявил высокую степень сходства – 71%. Этот вывод основан на двух независимых методах: выравнивание аминокислотных последовательностей показало гомологию в 71% (BLAST), что впоследствии подтверждено сравнением их третичных структур,



**Рисунок 11.** Схема структуры белков SFPQ и NONO. А) Доменная организация белков SFPQ и NONO на основе [144]. Б) Выравнивание третичных структур центральных доменов SFPQ (ID 4WII) и NONO (ID 5IFM) выполнено с помощью chimera 1. 17.

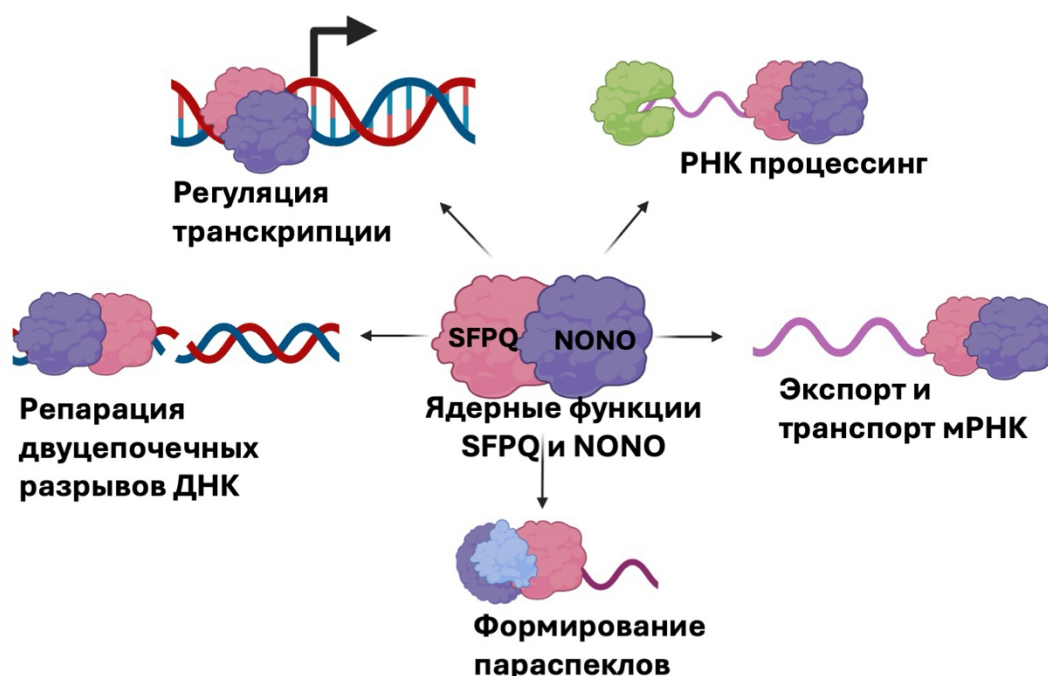
продемонстрировавшим значительное совпадение пространственной организации ( $\text{RMSD} = 0,97 \text{ \AA}$ ) (UCSF Chimera) (Рисунок 11, Б).

В клетке комплекс SFPQ/NONO может выполнять разнообразные функции (Рисунок 12). Например, он участвует в регуляции сплайсинга [147] и альтернативного сплайсинга [148]. Кроме того, этот комплекс может удерживать дефектные РНК в ядре вместе с фактором транскрипции Matrix [149]. В процессах транскрипции SFPQ может выступать в качестве репрессора, например, за счет взаимодействия с регулятором транскрипции SIN3A, которое привлекает гистондеацетилазы [150]. В качестве активатора транскрипции SFPQ регулирует транскрипцию гена *CYP17* в комплексе вместе с NONO и SF-1 (стероидогенный фактор 1) через связывание с промотором [151]. Также комплекс SFPQ/NONO

был обнаружен при изучении процесса гомологичной рекомбинации ДНК, где он облегчал расплетание ДНК через регуляцию функции топоизомеразы [152]. SFPQ/NONO был замечен в репарации по пути NHEJ [153], где он связывался с ДНК и стабилизировал комплекс ДНК с DNA-ПК для дальнейшей репарации. В экспериментах *in vitro* комплекс SFPQ/NONO может заменить белок XLF (Non-homologous end-joining factor 1 или XRCC4-подобный фактор), который участвует в репарации по пути NHEJ [154]. Так, SFPQ/NONO как и XLF, судя по всему, сближают концы ДНК перед окончанием репарации, однако авторы работы [154] предполагают различный механизм данного сближения, так как XLF связывает свободные концы ДНК, в отличие от SFPQ/NONO для которого характерно связывание внутренних последовательностей ДНК [153]. Кроме того, несколько других работ также выявило стимулирующее действие SFPQ/NONO на клеточную репарацию [155, 156]. Показано, что SFPQ и Ku70 совместно рекрутируются к местам повреждений ДНК [157]. Их ко-локализация стабилизирует репарационный модуль и опосредует синапсис ДНК-концов. Однако в работе [156] анализ кинетики ассоциации SFPQ, NONO и Ku с ДНК в очагах лазер-индуцированных двуцепочечных разрывов показал, что концентрация Ku максимальна через 5 сек и стабильна  $\geq 7$  мин, в то время как концентрация SFPQ/NONO достигает пика лишь к 100 сек, а затем уменьшается [156]. Различие в кинетике указывает на потенциально разные механизмы рекрутирования Ku-гетеродимера и SFPQ/NONO комплекса к местам повреждений ДНК, их действие на разных стадиях репарации или различное положение в хроматине [156].

Белки SFPQ и NONO формируют ядерные рибонуклеопротеиновые комплексы – параспеклы посредством ассоциации с длинной некодирующей РНК NEAT1. Несмотря на неполную расшифровку их функций, известно, что параспеклы удерживают в ядре мРНК, подвергшиеся дезаминированию по типу А-на-И [158]. Кроме того, параспеклы опосредуют регуляцию транскрипции генов врожденного иммунитета, активируемой cGAS-STING-IRF3-сигнальным путем в

ответ на чужеродную ДНК [159]. Этот путь играет ключевую роль в детекции экзогенной ДНК и индукции иммунного ответа, причем его полноценная активация требует участия комплекса DNA-PK [160].



**Рисунок 12.** Клеточные функции белков SFPQ и NONO. Розовым обозначен SFPQ, фиолетовым NONO, красными и синими лентами обозначены клеточные ДНК, фиолетовой лентой обозначена клеточная РНК.

На начальном этапе исследования участия SFPQ в репликации ВИЧ-1 данный белок был идентифицирован как партнер ИН в ядерных лизатах клеточной линии HeLa, зараженной ВИЧ-1 [143]. Было подтверждено взаимодействие SFPQ и ИН с использованием рекомбинантных белков [143]. Установлено также, что нокдаун SFPQ приводит к повышению уровня люциферазы в клетках TZM-bl, содержащих стабильно интегрированный ген люциферазы под контролем LTR-промотора при их заражении ВИЧ, увеличению количества тотальной вирусной кДНК через 8 часов после заражения и росту количества интегрированной вирусной кДНК через 24-48 часов.

Однако эффект на стадию интеграции авторы связывают с эффектом на стадию обратной транскрипции, так как количество субстрата для ИН в данных условиях увеличилось. Кроме того, авторами были проведены докинг и

молекулярная динамика комплекса SFPQ, ИН и ДНК и предложен механизм их взаимодействия. Со стороны ИН в связывании SFPQ, по мнению авторов, участвует подвижная петля в каталитическом домене 140-149 а. к., а со стороны SFPQ - домены RRM1, RRM2 и NOPS. Однако для данного анализа использовались данные о структуре лишь центрального кора SFPQ (SFPQ\_276-598), неструктурированные участки не учитывались, поэтому данный анализ мог быть недостоверным и неполным [143].

Белок NONO был выявлен как компонент ПИК ВИЧ-1, выделенного из CD4<sup>+</sup> Т-клеток, что указывает на его потенциальную роль в ранних этапах вирусной репликации [161]. Кроме того, NONO был обнаружен в составе комплекса обратной транскрипции и ПИК в инфицированных Т-клетках, что предполагает его участие в нескольких стадиях жизненного цикла ВИЧ-1 [162]. В исследовании, где использовались лентивирусные частицы с геном люциферазы светлячка для трансдукции клеток линии Jurkat и выделенных первичных CD4<sup>+</sup> клеток с нокдауном NONO, наблюдалось увеличение экспрессии люциферазы по сравнению с контрольными клетками [163]. Это свидетельствует о том, что NONO оказывает негативное влияние на репликацию ВИЧ-1, возможно, за счёт модуляции процессов обратной транскрипции и интеграции вирусной ДНК.

Белок NONO играет значительную роль в активации врожденного иммунного ответа против ВИЧ-2, но не оказывает прямого влияния на репликацию вируса [164]. NONO способен связываться с капсидным белком ВИЧ-2 с более высокой аффинностью, чем с капсидом ВИЧ-1, что позволяет ему выступать в качестве сенсора для обнаружения вирусного капсида в ядре клетки-хозяина. Это связывание NONO с p24 ВИЧ-2 способствует активации фермента cGAS (циклической GMP-AMP синтазы), который необходим для обнаружения вирусной ДНК и запуска врожденного иммунного ответа через активацию STING и последующую продукцию интерферонов типа I и других провоспалительных цитокинов [163].

В целом, NONO и SFPQ представляет собой важные объекты для изучения в контексте ВИЧ-1, поскольку их функции могут быть использованы для разработки новых стратегий противовирусной терапии. Однако для полного понимания роли NONO и SFPQ в репликации ВИЧ-1 необходимы дальнейшие исследования.

## II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### III.1. Буферные растворы

**Таблица 1.** Буферные растворы, использованные в работе.

Название буфера	Состав буфера
Среда LB (с ампициллином)	1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl (100 мг/л ампициллина);
Обогащенная среда (с ампициллином)	0,16% бактотриптон, 1 % дрожжевой экстракт, 17 mM хлорид натрия, Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2,7 г/л, KН <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,24 г/л, глицерин 10 г/л (100 мг/л ампициллина);
Плотная среда LB с ампициллином	1,5% раствор агара в среде LB с ампициллином;
среда DMEM	DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4,5 г/л D-глюкозы, пируват натрия, пенициллин- стрептомицин 100 е.а;
TBE	50 mM Tris-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (pH 8,5), 2 mM ЭДТА;
Буфер для переноса	50 mM Tris, 40 mM глицин, (pH 7,5), 20% этиловый спирт, 0,08% SDS
TBST	50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,1% Tween 20;
10xБуфер для лизиса	25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 150 mM NaCl, 0,25% NP-40, 10% глицерин, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10X Halt™ Protease Inhibitor Cocktail
А	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 5 mM ЭДТА, 2 mM меркаптоэтанол, 1 mM PMSF
Б	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM ЭДТА
В	25 mM Tris (pH 8,3), 200 mM глицин, 0,01% ДСН
Г	50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% глицерин, 100 mM 2-меркаптоэтанол, ~0,0025% бромфеноловый синий



Д	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0,5 M NaCl, 5% глицерин, 5 mM ЭДТА, 2 mM меркаптоэтанол, 0,1% NP-40
Е	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 1 mM ЭДТА, 2 mM меркаптоэтанол, 1 mM PMSF
Ж	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 1 mM ЭДТА, 2 mM меркаптоэтанол, 5 mM PMSF, глутатион 50 mM
З	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 1 mM ЭДТА, 2 mM меркаптоэтанол, 5 mM PMSF, дезтиобиотин 2,5 mM
И	20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM 2-меркаптоэтанол, 50 мкг/мл БСА, 0,1% NP40
К	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 4 mM меркаптоэтанол
Л	50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 M NaCl, 10% глицерин, 4 mM меркаптоэтанол, глутатион 50 mM
М	20 mM Hepes (pH 7,2), 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM ДТТ
Н	20 mM Hepes (pH 7,2); 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM ДТТ; 10% глицерин; 50 mM NaCl
О	20 mM Tris-ацетат (pH 7,2); 7,5 mM MgCl <sub>2</sub>

### III. 2. Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды (Таблица 2) были синтезированы амидофосфитным методом в компании Евроген.

**Таблица 2.** Олигонуклеотиды использованные в работе для получения мутантных форм белков SFPQ и ИН

Название	Последовательность олигонуклеотидов (5' -3')
----------	--

SFPQ_201_STOP_	GTCCAGGGCCTAAGCAGTAGCCAGGTCCGGGTGGTCC
SFPQ_201_STOP_anti	CCCAACAAACAACCGCTATCGCTGTGTGTAAGTTTTC
SFPQ_599_STOP	TCTTTGGCGCCTCATCTAGTCTTCCATCTCACG
SFPQ_599_STOP_anti	CGTGAGATGGAAGACTAGATGAGGCGCCAAAGA
SFPQ $\Delta$ 213-275	TCC CAA AGG CGG CAA AAT GGA GGG GTT TAA AGC
SFPQ $\Delta$ 213-275-anti	GCT TTA AAC CCC TCC ATT TTG CCG CCT TTG GGA
SFPQ_201-707	CAATTCAAGCTTGGTACCCATGGCCCAGGTCCGGGT G
SFPQ_201-707_anti	CACCCGGACCTGGGCCATGGGTACCAAGCTTGAATT G
SFPQ_297-707	CCAACAAACAACCGACAATGGGTACCAAGCTTGAAT TG
SFPQ_297-707_anti	CAATTCAAGCTTGGTACCCATTGTCGGTTGTTTGTTG G
SFPQ_R19A	GCCGCCTCCTCCAGCCCTGTGGAAGCCA
SFPQ_R19A_anti	AGGCGGCGGGCGCCGGCGGCCTC
SFPQ_R242A	GCGGCCCCCGGCGGGCTCCCCG
SFPQ_R242A_anti	CGGGGAGCCCGCCGGGGGGCCGC
SFPQ-N-NdeI	GATCCATATGTCTCGGGATCGGTTCCG
SFPQ-C-XhoI	GATCCTCGAGTTAAAATCGGGGTTTTTTGTTTGGG
NONO-N-NdeI	GATCCCATATGCAGAGTAATAAACTTTTAACTTGG
NONO-C-BamHI	GATGGGATCCTTAGTATCGGCGACGTTTGTTTG

INB_201_STOP	GCAGGGGAAAGAATATAGGACATAATAGCAACA
INB_201_STOP_anti	TGTTGCTATTATGTCCTATATTCTTTCCCCTGC
INB_191_STOP	AAAAGAAAAGGGGGGGTAGGGGGGGGTACAGTGCA
INB_191_STOP_anti	TGCACTGTACCCCCCCTACCCCCCTTTTCTTTT
INB_181_STOP	TACAAATGGCAGTATAGATCCACAATTTTAAA
INB_181_STOP_anti	TTTAAAATTGTGGATCTATACTGCCATTTGTA
INB_171_STOP	AGAGATCAGGCTGAATAGCTTAAGACAGCAGTA
INB_171_STOP_anti	TACTGCTGTCTTAAGCTATTCAGCCTGATCTCT
INB_161_STOP	CCTGATCTCTTACCTGTCCTATAATTTACTTTAATTCT TTATTCATAGATTCTAT
INB_161_STOP_anti	ATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGTAAATTATA GGACAGGTAAGAGATCAGG
IN_Q164A/V165A/ R166A	CGCCGATCAGGCTGAACATCTTAAG
IN_Q164A/V165A/ R166A_anti	GCAGCTCCTATAATTTTCTTTAATTCTTTATTC
IN_E170A/H171A/ K173A	GAATACTGCCATTTGTACTGCTGTCGCAAGAGCTGC AGCCTGATCTCTTACCTGTCCTAT
IN_E170A/H171A/ K173A_anti	ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGCAGCTCTTGCG ACAGCAGTACAAATGGCAGTATTC

IN_K160A/Q164A/ Q168A	CTGCTGTCTTAAGATGTTTCAGCCGCATCTCTTACCGC TCCTATAATTGCCTTTAATTCTTTATTCATAGATTCTA TTACCCCC
IN_K160A/Q164A/ Q168A_anti	GGGGGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGGC AATTATAGGAGCGGTAAGAGATGCGGCTGAACATCT TAAGACAGCAG
IN_T174A/V176A/ Q177A/M178A	TGCTGCTGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAG
IN_T174A/V176A/ Q177A/M178A_anti	GCTGCAGCCTTAAGATGTTTCAGCCTG
IN_I182A	CCCCTTTTCTTTTAAAATTGTGGGCGAATACTGCCAT TTGTACTGCTG
IN_I182A_anti	CAGCAGTACAAATGGCAGTATTCGCCCACAATTTTA AAAGAAAAGGGG
IN_R187A	AATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAGCAAAAGG GGGGATTGGG
IN_R187A	CCCAATCCCCCCTTTTGCTTTAAAATTGTGGATGAAT ACTGCCATT
IN_K188A	CCCAATCCCCCCTGCTCTTTTAAAATTGTGGATGAA TACTGC
IN_K188A_anti	GCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAGCAGGGGGG ATTGGGG

### III. 3. Плазмидные конструкции

Плазмиду для вирусной упаковки pCMV $\Delta$ 8.2R и плазмиду pCMVVSVG получали из AddGene. Геномная плазида pUCHR\_inLuc была подарком доктора Д.Мазурова.

Плазмидный вектор pET-15b\_ИН, кодирующий интегразу ВИЧ-1 с His<sub>6</sub>-тагом на N-конце была любезно предоставлена доктором Джей-Ф. Мускаде (АНС-де-Кашан, Франция).

Плазмидный вектор pGGW-GST-IN, предназначенный для экспрессии интегразы ВИЧ-1 с GST-меткой на N-конце, был создан в нашей лаборатории ранее (Анисенко А.А.) на базе вектора pGGW-GST.

Создание плазмиды pGEX-SFPQ: Фрагмент кДНК, соответствующий полноразмерной последовательности белка SFPQ, амплифицировали методом ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду Мус-PSF-WT (Addgene). Для амплификации применяли праймеры SFPQ-N-NdeI и SFPQ-C-XhoI (Таблица 2). Полученный ПЦР-продукт подвергли рестрикции ферментами NdeI и XhoI (ThermoFisher, США), после чего очистили методом электрофореза в агарозном геле. Очищенный фрагмент лигировали в вектор pGEX-6p-1 (GE Healthcare, США), предварительно линеаризованный по тем же сайтам рестрикции (NdeI и XhoI). Сконструированная рекомбинантная плазида pGEX-SFPQ была использована для последующей экспрессии и очистки полноразмерного белка SFPQ, меченного GST-пептидом на N-конце.

Создание плазмиды pET15b-Strep-NONO: Полноразмерную кДНК белка NONO амплифицировали с матрицы pcDNA3.1\_NONO (получена ранее в лаборатории Щадриной О. А.), используя праймеры NONO-N-NdeI и NONO-C-BamHI (Таблица 2). Ампликон обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI (ThermoFisher, США), гель-очищали и затем встраивали в вектор pET-15b-Strep-Ku70, который был линеаризован по сайтам NdeI и BamHI. В результате была получена рекомбинантная плазида pET-15b-Strep-NONO, пригодная для

экспрессии и последующей аффинной очистки полноразмерного белка NONO, содержащего N-концевой Strep-таг.

Для получения мутантных вариантов плазмид pGEX-SFPQ-1-200, pGEX-SFPQ-1-598, pGEX-SFPQ-Δ213-275, pGEX-SFPQ-201-707, pGEX-SFPQ-297-707, pGEX-SFPQ-R19A, pGEX-SFPQ-R242A, pGEX-SFPQ-R19A/R242A был использован сайт направленный мутагенез с помощью набора Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, США) с помощью соответствующих праймеров в таблице 2

Для получения мутантных вариантов плазмид pcDNA3.1\_SFPQ-Δ213-275, pcDNA3.1\_SFPQ-R19A/R242A был использован сайт направленный мутагенез с помощью набора Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, США) с помощью соответствующих праймеров в таблице 2 на основе вектора pcDNA3.1\_SFPQ, полученного ранее в нашей лаборатории.

Метод сайт-направленного мутагенеза Quick Change II («Agilent Technologies», США) был применен для получения серии мутантных конструкторов. С его помощью на основе исходной плазмиды pET15b-IN были созданы усеченные варианты гена интегразы ВИЧ-1, кодирующие полипептиды различной длины: ИН\_1-200, ИН\_1-190, ИН\_1-180, ИН\_1-170 и ИН\_1-160. С помощью той же системы были получены точечные мутации, приводящие к аминокислотным заменам в сайтах, критичных для функциональности белка: Q164A/V165A/R166A, E170A/H171A/K173A, K160A/Q164A/Q168A, T174A/V176A/Q177A/M178A, I182A, R187A и K188A. Для проведения мутагенеза во всех случаях использовали специфичные праймеры, перечисленные в таблице 2.

Кроме того, с использованием идентичной методики Quick Change II и праймеров из таблицы 2, мутации I182A, R187A и K188A были внесены в другие векторные системы: pCMVΔ8.2R-mut, pET-15b-IN и pGGW-GST-IN.

### III. 4. Получение и очистка рекомбинантных белков

Очистку рекомбинантного белка **Ku70**, меченного His<sub>6</sub>-пептидом на N-конце, проводили в соответствии с ранее разработанным в нашей лаборатории протоколом [139].

Белок **SFPQ** (как нативную, так и мутантные формы) с N-концевой GST-меткой экспрессировали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) *Codon Plus*, трансформированных плазмидой pGEX-SFPQ. Ночную культуру объемом 250 мл использовали для инокуляции 3.5 л обогащенной среды с добавлением ампициллина (100 мг/л) с последующим культивированием в биореакторе Minifors 2 до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0.6. Индукцию экспрессии осуществляли добавлением 1 mM ИПТГ и проводили в течение 16 часов при 18 °C. Клеточный осадок, полученный центрифугированием (8000 g, 40 мин, 4 °C), ресуспендировали в 80 мл буфера А и подвергали лизису с помощью ультразвука (аппарат Vilber Lourmat ECX-F20.C, Германия). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (20000 g, 30 мин, 4 °C), после чего супернатант инкубировали с 1 мл глутатион-сефарозы, уравновешенной буфером А, в течение 3 часов при 4 °C. Смолу трижды отмывали 50 мл буфера А, а иммобилизованный белок элюировали несколькими фракциями буфера Ж общим объемом 1 мл.

Далее фракции очищали с помощью гель-фильтрации на Amersham Akta Explorer 100 FPLC System (General Electric). Использовалась колонка Sephadex G75, уравновешенная буфером Д.

Белок **NONO**, меченный Strep-тагом, экспрессировали из плазмиды pET15b-Strep-NONO в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) *Rosetta*. Трансформированные клетки инокулировали в 1 л обогащенной питательной среды следующего состава : бактотриптон (16 г/л), дрожжевой экстракт (10 г/л), NaCl (1 г/л), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2.7 г/л), KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24 г/л), глицерин (10 г/л) с добавлением ампициллина (100 мг/л). Культивирование проводили до достижения OD<sub>600</sub> = 0.6, после чего экспрессию индуцировали 1 mM ИПТГ в течение 6 часов при 30 °C. Клеточный осадок, полученный центрифугированием

(8000 g, 20 мин, 4 °C), ресуспендировали в 25 мл буфера E и подвергали ультразвуковой дезинтеграции. Лизат центрифугировали (20000 g, 30 мин, 4 °C) для удаления нерастворимой фракции, а супернатант инкубировали с 0.3 мл глутатион-сефарозы (ThermoScientific, USA), уравновешенной буфером E, в течение 3 ч при 4 °C. После инкубации смолу трижды отмывали 25 мл буфера E, а связанный белок элюировали 1 мл буфера 3, собирая несколько фракций. Полученный элюат диализовали в течение 18 часов против буфера E, не содержащего PMSF.

Наличие целевых белков подтверждали методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН: для белка NONO анализировали диализаты, а для SFPQ – фракции после хроматографии на сефарозе. После электрофореза гель отмывали от ДСН и окрашивали красителем Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Белок **ОТ ВИЧ-1** с His<sub>6</sub>-меткой был любезно предоставлен для исследования к.б.н., н.с. Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН В.Т. Валуховым-Эллистоном.

Экспрессию и очистку интегразы ВИЧ-1 (**ИН**) и ее мутантных форм (ИН\_I182A, ИН\_R187A, ИН\_K188A), содержащих N-концевой His<sub>6</sub>- или GST-таг, проводили по ранее описанной методике [165] и следующему протоколу соответственно. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) *Codon Plus* трансформировали плазмидами pGGW-GST-IN (нативная или мутантные формы). Культивирование начинали с инокуляции 10 мл ночной культуры в 300 мл среды 2.5% LB с последующим ростом до OD<sub>600</sub> = 0.8. Экспрессию индуцировали 1 mM ИПТГ и проводили в течение 16 ч при 18 °C. Клетки осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 40 мин, 4 °C), ресуспендировали в 80 мл буфера K и лизировали ультразвуком. После осаждения клеточного дебриса (10000 g, 30 мин, 4 °C) супернатант наносили на 1 мл глутатион-сефарозы («Thermo Scientific», США), уравновешенной буфером K, и инкубировали 3 ч при 4 °C. Смолу промывали 50 мл буфера K (трижды), после чего белок элюировали 1 мл буфера L порциями.



Объединенные элюаты диализовали против буфера К, а перед замораживанием добавляли глицерин до конечной концентрации 20%.

Количественное определение концентрации белка в образцах проводили спектрофотометрическим методом по М. Брэдфорд. Рабочий реактив готовили путем растворения 5 мг красителя Кумасси Бриллиантового Синего G-250 в 2.5 мл этанола с последующим добавлением 5 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Объем полученной смеси доводили до 50 мл дистиллированной водой. Приготовленный реактив инкубировали в течение 24 часов в защищенном от света месте, после чего фильтровали для удаления возможных взвесей.

Анализ проводили в лунках планшетов для ИФА. В каждую лунку вносили 5 мкл исследуемого белкового раствора и добавляли 250 мкл приготовленного реактива Брэдфорд, тщательно перемешивая пипетированием. Измерение оптической плотности проводили на мультиридере Victor3™ через 5–10 минут после внесения реактива при длине волны 600 нм. Построение калибровочной кривой осуществляли с использованием растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА) с известной концентрацией.

### **III. 5. Метод соосаждения белков**

С целью изучения возможного взаимодействия между белками SFPQ, NONO, OT и ИН был применен метод аффинного соосаждения с использованием GST- и Strep-тагов. Белковые смеси в различных комбинациях инкубировали в 200 мкл буфера И в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в пробу добавляли 20 мкл глутатион-сефарозы (для GST-соосаждения) или Strep-tactin-сефарозы (для Strep-соосаждения). После часовой инкубации при комнатной температуре сорбент трижды отмывали 1 мл буфера И, не содержащего БСА. Белки, связавшиеся с носителем, элюировали денатурирующим буфером Г путем нагревания до 95 °С в течение 5 мин. Полученные пробы разделяли электрофоретически в ПААГ по Лэммли с последующей детекцией целевых белков методом вестерн-блоттинга.

### **III. 6. Анализ обмена субъединиц ИН**

Анализ процесса обмена субъединицами белка ИН проводили по следующей схеме: смешивали ИН, меченную GST-тагом (100 нМ), с ИН, содержащий His<sub>6</sub>-пептид (100 или 200 нМ), и инкубировали смесь в буфере И в течение 60 мин при комнатной температуре. Для удаления неспецифических агрегатов пробы кратковременно центрифугировали (2 мин, 1000 g). Полученные супернатанты инкубировали с глутатион-сепарозой, предварительно блокированной 0,1 мг/мл БСА, в течение 60 минут. После отмывки носителя иммобилизованные белки элюировали и детектировали с помощью вестерн-блоттинга.

### **III. 7. Метод «пептидного фишинга»**

Белковые образцы подготовили для масс-спектрометрической идентификации и проанализировали по ранее опубликованной методике [166]. Масс-спектры регистрировались на MALDI-TOF масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker Daltonics), обрабатывались в программе FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия), идентификацию белков проводили с помощью программного обеспечения Mascot.

### **III. 8. Культивирование эукариотических клеточных линий**

Линию клеток НЕК 293Т культивировали в среде DMEM в увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в чашках Петри диаметром 35 мм и в культуральных планшетах на 6-48 лунок. При достижении монослоя клетки рассеивали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали стерильным PBS, далее добавляли раствор трипсин/ЭДТА и инкубировали 3-5 минут при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в среде DMEM. Затем клетки рассеивали 1/5 по объему суспензии.

### **III. 9. Трансфекция эукариотических клеток**

За день до проведения трансфекции высевали  $2-3 \cdot 10^5$  клеток линии НЕК 293Т в лунки 24-луночного планшета в 500 мкл среды DMEM. Для введения плазмидных векторов проводили кальций-фосфатную трансфекцию. Кальций-

фосфатную трансфекцию осуществляли согласно ранее опубликованному протоколу [167]. Количество плазмидной ДНК для трансфекции клеток в 24-луночной планшете составляло 1 мкг. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Липофекцию малыми интерферирующими РНК (siРНК, таблица 3) с использованием реагента Lipofectamine RNAiMax Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Конечная концентрация siРНК в лунках планшета составляла 50 нМ.

**Таблица 3.** Олигонуклеотиды, использовавшиеся для липофекции siРНК.

Название	Последовательность олигонуклеотида (5' -3')
siSFPQ#1-s	GAAGAAGCCUUUAGCCAAU
siSFPQ#1-as	GCAAAGGAUUCGGAUUUA
siSFPQ#2-s	GAACAAAUGAGGCGCCAAA
siSFPQ#2-as	GGGAAAGAACAUGCGAAU
siNONO#1-s	UUCAGUAUACAGUAACCCUGUUC
siNONO#1-as	GAACAGGGUUACUGUAUACUGAA
siNONO#2-s	GCAGUGUCUAGUUUCUCAATT
siNONO#2-as	UUGAGAAACUAGACACUGCTT
siControl-s	AGGUCGAACUACGGGUCAA
siControl-as	UUGACCCGUAGUUCGACCU

### III. 10. Определение активности люциферазы светлячка

Клетки НЕК293Т снимали диссоциацией трипсином и центрифугировали (3 мин при 3000 об/мин) для удаления среды. Далее клетки ресуспендировали в 1x Passive Lysis Buffer (Promega, США) и оставляли при комнатной температуре на 10 мин. Затем полученный лизат центрифугировали 30 сек при 14000 об/мин и отбирали супернатант. Активность люциферазы светлячка измеряли с помощью

набора Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, США). Люминесцентный сигнал измеряли с помощью прибора SYNERGY H1 («BioTek», США).

### **III. 11. Сборка вируса**

Для получения ВИЧ-подобных псевдовирусов клетки 293Т были совместно трансфицированы упаковочным вектором pCMVΔR8.2 для ВИЧ-1, вектором для экспрессии белка G вируса везикулярного стоматита (VSV) pCMV-VSVG и репортерной плазмидой pUHR inLuc. Через 48 ч после трансфекции были собраны супернатанты, псевдовирусы концентрировали центрифугированием при 30 000 g в течение 2 ч и повторно суспендировали в PBS. Уровень p24 определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа на p24-антиген ВИЧ-1 ("Вектор Бест", Россия) по инструкции производителя.

### **III.12. Трансдукция клеток**

Клетки НЕК 293Т инфицировали добавлением псевдовирусов в клеточную среду в конечной концентрации 100 пг p24 на  $10^5$  клеток. Клетки собирали через 24 ч после инфицирования, подсчитывали количество клеток и измеряли активность люциферазы в клеточных лизатах с использованием считывателя микропланшетов SYNERGY H1 и наборасистемы анализа люциферазы. Полученные данные нормализовали по количеству клеток.

### **III. 13. Определение эффективности репарации NHEJ**

Клетки трансфецировали тремя векторами: pCMV6-AC EJ7-GFP, 7a sgRNA и 7b sgRNA (в отрицательном контроле вместо 7b sgRNA использовали «пустую» плазмиду pcDNA3.1). Накануне проведения трансфекции высевали  $2 \cdot 10^5$  клеток НЕК293Т в лунки 24-луночного планшета в 500 мкл среды DMEM. Для введения плазмидных векторов проводили трансфекцию с использованием кальций-фосфата. На 500 мкл культуральной среды брали 50 нг репортерной плазмиды и по 200 нг векторов, кодирующих одиночные гидовые РНК и белок Cas9. Через 2 дня клетки снимали с помощью трипсина/ЭДТА, а долю светящихся GFP+ клеток считали с помощью проточной цитометрии на приборе MACSQuant Analyzer 10.

### **III. 14. Вестерн-блот анализ**

После электрофореза в SDS-ПААГ, проведенного по методу Лэммли, белки переносили на мембрану Immobilon®-P PVDF с использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, США) в режиме полусухого переноса. Мембрану трижды промывали буфером TBST (по 5 минут на каждую отмывку) для удаления следов трансферного буфера. Детекцию целевых белков проводили по следующей схеме:

- Блокирование: Инкубация в 5% растворе обезжиренного молока на TBST в течение 1 часа с последующей трехкратной промывкой в TBST.
- Первичные антитела: Инкубация с первичными антителами, разведенными в TBST (1 час), и отмывка мембраны от несвязавшихся антител (3 раза по 5 минут).
- Вторичные антитела: Обработка мечеными пероксидазой хрена вторичными антителами в TBST (1 час) с последующей трехкратной отмывкой.

Визуализацию сигнала осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата Clarity Western ECL (Bio-Rad, США), регистрируя свечение на системе ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

### **III. 15. Количественный ПЦР**

Количество общей и интегрированной ДНК определяли количественно через 24 часа, как описано ранее [168]. ДНК выделяли с помощью автоматической станции выделения ДНК на магнитных частицах GenePure Pro (NPA-16H) (Bioer, Китай). Для определения общего количества ДНК использовали 25 мкл смеси, содержащей 1×полимеразный буфер DreamTaq (Thermo), 3 мм MgCl<sub>2</sub>, 300 мкм dNTP(Thermo), 4 праймера (по 300 нм каждый) (Таблица 4: для амплификации тотальной ДНК использовали праймеры ULF1, UR1, праймеры HCD3OUT5' и HCD3OUT3' для амплификации человеческого гена CD3, который использовали в качестве контроля) и к 100 нг общей клеточной ДНК добавляли 2,5 единицы полимеразы DreamTaq (Thermo). Реакционную смесь подвергали денатурации (95°C, 8 мин) с последующим проведением 23 циклов амплификации по схеме:

денатурация (95°C, 1 мин), отжиг праймеров (55°C, 40 с) и элонгация (72°C, 1 мин). Финальное удлинение цепей выполняли при 72°C в течение 15 мин.

Для амплификации интегрированной формы ВИЧ-ДНК использовали модифицированный состав смеси: обратный праймер UR1 заменяли на праймеры Alu1 и Alu2 (по 300 нМ каждый, Таблица 4), а концентрацию праймера ULF1 снижали до 150 нМ. После начальной денатурации (95°C, 8 мин) проводили 9 циклов амплификации (95°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 10 мин) с финальной элонгацией (72°C, 15 мин).

Количественный анализ вирусной ДНК и референсного гена CD3 выполняли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе Bio-Rad CFX96. Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл разбавленной матрицы: ДНК интегрированных форм разбавляли в 100 раз, тотальную ДНК – в 10 000 раз. Для детекции вирусной ДНК использовали праймеры Lambda-T/UR2 (250 нМ) и зонд UHIV\_TaqMan (200 нМ). Концентрацию гена CD3 определяли с праймерами HCD3IN5'/HCD3IN3' (250 нМ) и зондом CD3\_TaqMan (200 нМ) (таблица 4). Протокол амплификации включал: начальную денатурацию (95°C, 4 мин), 40 циклов (95°C – 3 с, 60°C – 10 с).

Для определения репарированной ДНК методика была усовершенствована за счет включения стадии линейной амплификации, позволяющей дифференцировать репарированные и нерепарированные провирусы [169]. При использовании репарированных матриц синтезируются протяженные одноцепочечные фрагменты, содержащие Alu-повторы. В случае нерепарированных провирусов амплификация останавливается на участке 5'-нуклеотидной брешы, образуя короткие продукты без Alu-последовательностей. Последующее введение праймеров к Alu-повторам обеспечивает экспоненциальную амплификацию только полноразмерных продуктов.

Для каждого образца регистрировали четыре пороговых цикла ( $C_t$ ):

$C_{t,rep}$  – репарированная ДНК после линейной и экспоненциальной преамплификации;  $C_{t,CD3\ for\ rep}$  – референсный ген для репарированной формы;  $C_{t,int}$

– интегрированная ДНК после экспоненциальной преамплификации;  $C_{t,CD3 \text{ for int}}$  – референсный ген для интегрированной формы. Значения  $C_{t,rep}$  и  $C_{t,int}$  нормировали на соответствующие концентрации гена CD3 для последующего количественного анализа:

$$C'_t = C_t - C_{t,CD3}$$

$$C'_{t,int} = C_{t,int} - C_{t,CD3 \text{ for int}}$$

$$C'_{t,rep} = C_{t,rep} - C_{t,CD3 \text{ for rep}}$$

$$\Delta C_t = C'_{t,int} - C'_{t,rep}$$

$$n = \frac{1}{1 - \frac{2^{\Delta C_t - 1}}{\alpha}} - 1,$$

где  $n$  – эффективность постинтеграционной репарации,  $\alpha$  – число линейном преамплификации, в данной работе 12.

**Таблица 4.** Олигонуклеотиды, использовавшиеся для кПЦР.

Название	Последовательность олигонуклеотида (5' -3')
ULF1	ATGCCACGTAAGCGAAACTCTGGGTCTCTCTGGTTAGAC
UR1	CCATCTCTCTCCTTCTAGC
UR2	CTGAGGGATCTCTAGTTACC
Alu1	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG
Alu2	GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
LambdaT	ATGCCACGTAAGCGAAACT
HCD3OUT3'	ACTGACATGGAACAGGGGAAG
HCD3OUT5'	CCAGCTCTGAAGTAGGGAACATAT
HCD3IN5'	GGCTATCATTCCTTCTTCAAGGT
HCD3IN3'	CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA
UHIV_TaqMan	FAM-GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGG-BHQ-1
CD3_TaqMan	FAM-AGCAGAGAACAGTTAAGAGCCTCCAT-BHQ-1

### **III. 16. Получение радиоактивно меченных субстратов ИН и TAR-РНК**

Для приготовления радиоактивно меченных ДНК-субстратов интегразы (ИН) и TAR-РНК проводили 5'-фосфорилирование 10 пмоль соответствующих олигонуклеотидов (U5B, U5B-2, таблица 5) или TAR-РНК. Реакцию проводили в течение 60 минут при 37 °С в присутствии 2 пкмоль  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  АТФ и 10 единиц активности Т4-полинуклеотидкиназы. По окончании инкубации процесс останавливали добавлением 2 мкл 0.25 М ЭДТА. Для сборки двухцепочечных ДНК-субстратов ИН в смесь вносили 10 пмоль комплементарного олигонуклеотида U5A. Затем добавляли 20 мкл 3 М ацетата натрия и доводили объем до 100 мкл деионизированной водой milli-Q. Фермент удаляли экстракцией равным объемом (100 мкл) смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). Меченые продукты осаждали этанолом, а уровень радиоактивности количественно оценивали методом черенковского счета на счетчике Delta-300 («Tracor», Нидерланды).

### **III. 17. Определение каталитической активности ИН**

Каталитическую активность интегразы ВИЧ-1 оценивали в двух реакциях: 3'-концевом процессинге и переносе цепи. В качестве субстрата для процессинга применяли 5 нМ дуплекс  $[5'\text{-}\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{U5B/U5A}$ , тогда как для анализа переноса цепи использовали 10 нМ дуплекс  $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{U5B-2/U5A}$ . Реакционные смеси, содержащие 100–800 нМ ИН в буфере М, инкубировали в течение 1 часа при 37 °С в соответствии с ранее описанным протоколом [170]. После осаждения нуклеиновых кислот продукты реакции разделяли методом электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ. Визуализацию результатов проводили с помощью фосфоимиджера GE Typhoon FLA 9500 («Molecular Dynamics», США). Количественный анализ эффективности реакций выполняли в программе ImageQuant™ 5.0: для 3'-концевого процессинга рассчитывали соотношение интенсивностей полос U5B и U5B-2, а для переноса цепи – долю



высокомолекулярных продуктов относительно U5B-2. Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидов U5B, U5B-2 и U5A, использованных для получения ДНК-субстратов, представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Олигонуклеотиды, использовавшиеся в изучении свойств ИН.

Название	Последовательность праймеров (5'→3')
U5B	GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT
U5B-2	GTGTGGAAAATCTCTAGCA
U5A	ACTGCTAGAGATTTTCCACAC
TAR-РНК	GGGUCUCUCUGGUUAGACCAGAUCUGAG CCUGGGAGCUCUCUGGCUAACUAGGGAA CCC

### **III. 18. Анализ взаимодействия ИН с ДНК-субстратом и TAR-РНК методом торможения в геле**

Связывание белков ИН (дикого типа и мутантных форм I182A, R187A, K188A) с <sup>32</sup>P-меченными ДНК-субстратом U5B/U5A или TAR-РНК (рибоолигонуклеотид, формирующий шпильку TAR) анализировали методом электрофоретического разделения комплексов. Инкубацию 5 нМ меченого субстрата с возрастающими концентрациями белков (0-500 нМ) проводили в 20 мкл буфера Н в течение 30 минут при 20°C с последующей остановкой реакции на льду. Сформированные комплексы разделяли в 8% ПААГ в буфере О (60 V, 3-4 ч, 4°C). После высушивания геля проводили визуализацию на фосфоимиджере GE Typhoon FLA 9500. Количественную оценку эффективности образования комплексов ИН/TAR-РНК и ИН/ДНК при различных концентрациях белка выполняли с использованием программы ImageQuant™ 5.0. Полученные в трех независимых экспериментах данные подвергали аппроксимации с помощью уравнения:

$$\text{эффективность образования комплекса, \%} = \frac{B_{\text{max}} \cdot [\text{ИН}]}{K_d + [\text{ИН}]},$$

с использованием программы GraphPad Prism 8.0.1, где  $B_{\text{max}}$  – максимальная эффективность связывания,  $[\text{ИН}]$  – концентрация ИН в нМ,  $K_d$  – константа диссоциации в нМ, и рассчитывали значения константы диссоциации  $K_d$ .

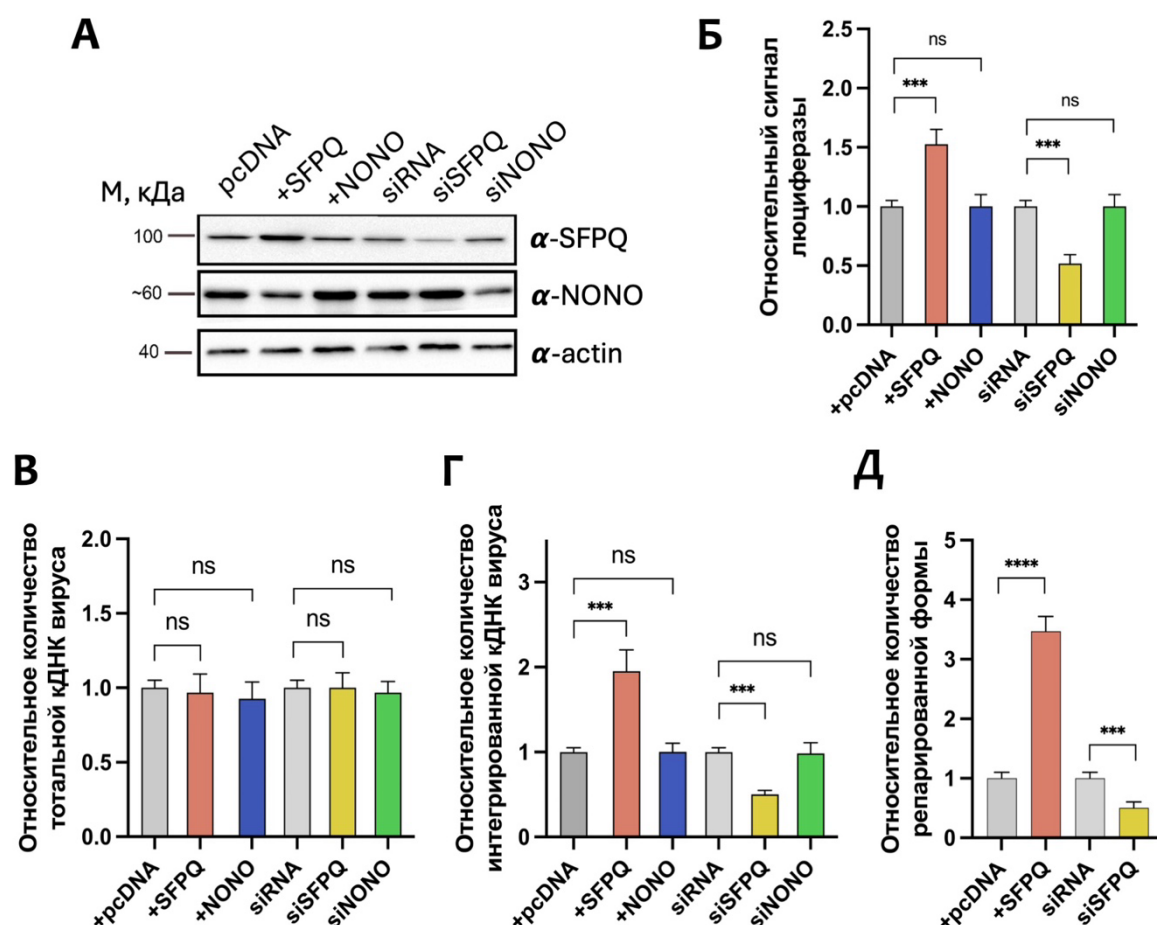
## IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### IV.1. Анализ влияния белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1

Для детального анализа влияния белков SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 мы использовали псевдовиральные частицы, представляющие собой VSV-G-псевдотипированный репликативно некомпетентный вектор на основе ВИЧ-1, в котором гены (*gag*, *pol*, *env*) заменены геном репортерного белка - люциферазы светлячка (Fluc), а регуляторные элементы (LTR,  $\psi$ -сайты) сохранены. Для сборки этих псевдовиральных частиц упаковывающие клетки НЕК 293Т трансфицировались тремя плазмидами, содержащими: 1) ДНК, кодирующую рекомбинантный РНК-геном, в состав которого входит ген люциферазы светлячка; 2) ген *gag-pol* ВИЧ-1, кодирующий структурные белки для формирования капсида вирусной частицы и ферменты ВИЧ-1; 3) ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), который обеспечивает широкий тропизм за счет связывания с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LDLR). В упаковывающих клетках происходит формирование ВИЧ-1-подобных частиц, выходящих в культуральную среду. Эти частицы способны к однократному циклу инфекции, при котором в инфицированных клетках происходит обратная транскрипция, интеграция провирусной ДНК в геном хозяина, репарация повреждений и экспрессия Fluc, уровень которой отражает успешность протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1. Таким образом, эти псевдовиральные частицы являются удобной и общепринятой моделью для изучения ранних этапов репликации ВИЧ-1[171]. Отметим, что в использованном нами векторе ген люциферазы находится под контролем LTR-промотора, что позволяет оценивать влияние различных факторов и на транскрипцию с вирусного промотора.

Для изучения эффекта SFPQ и NONO на ранние стадии репликации ВИЧ-1 и определения стадии, на которую осуществляется это влияние, проводилась трансдукция собранными псевдовиральными частицами клеток НЕК 293Т с

нормальным, повышенным или пониженным уровнем этих белков. Для увеличения уровня белков применялась кальций-фосфатная трансфекция плазмидными векторами, содержащими гены белков SFPQ и NONO (pcDNA3.1\_SFPQ, pcDNA3.1\_NONO), полученными по методике, описанной в разделе «Материалы и Методы». Для понижения уровня содержания белков белков использовалась липофекция siРНК к этим генам (siSFPQ, siNONO).



**Рисунок 13.** Влияние разных уровней клеточных белков SFPQ и NONO на репликацию ВИЧ-1. А) Анализ количества белков SFPQ, NONO в клетках HEK293T. Б) Относительный сигнал люциферазы для образцов трансдуцированных вирусом с MOI=1 и разным уровнем белков SFPQ и NONO. В) Анализ уровня totalной кДНК вируса в клетках с разным уровнем белков SFPQ и NONO. Г) Анализ уровня интегрированной кДНК вируса в клетках с разным уровнем SFPQ и NONO. Д) Анализ уровня репарированной формы кДНК вируса в клетках с разным уровнем SFPQ. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns - не является значимой.

Успешность изменения уровня белков подтверждалась с помощью вестерн-блоттинга (Рисунок 13, А).

Через 24 часа после инфицирования клетки лизировали для комплексной оценки эффективности вирусной репликации. Методика включала: количественное измерение активности люциферазы как интегрального показателя эффективности ранних этапов жизненного цикла вируса; экстракцию тотальной ДНК с последующим ПЦР-анализом для детекции различных форм вирусной ДНК (тотальной, интегрированной и репарированной) по методике [169]. Отметим, что использованный нами метод ПЦР в реальном времени обеспечивает количественную оценку эффективности ключевых этапов вирусного цикла – обратной транскрипции (анализ тотальной ДНК), интеграции (анализ интегрированной ДНК) и ПИР (анализ репарированной ДНК).

Результаты продемонстрировали отсутствие статистически значимого влияния белка NONO на репликацию ВИЧ-1, тогда как повышение внутриклеточного уровня SFPQ достоверно усиливало вирусную репликацию, а снижение его уровня – понижало ее эффективность. Важно, что влияние SFPQ подтверждалось изменением как уровня люциферазы (Рисунок 13, Б), так и количества интегрированной и особенно репарированной ДНК (Рисунок 13, Г, Д). При этом мы не обнаружили негативного влияния SFPQ на обратную транскрипцию, которое было описано ранее [143]. Возможно, это обусловлено различиями в используемых клеточных моделях и конструкциях псевдовиральных векторов.

Полученные данные свидетельствуют, что SFPQ выступает положительным фактором, существенно повышающим эффективность интеграции вирусной кДНК и последующей ПИР, в то время как NONO не участвует в регуляции ранних этапов жизненного цикла ВИЧ-1, несмотря на структурное сходство и способность формировать комплекс с SFPQ. Тот факт, что NONO был обнаружен в составе ПИК [162], можно объяснить тем, что он оказался там в составе гетеродимера с SFPQ. Результаты данного раздела представлены в статье [3].

#### IV.2. Взаимодействия белков SFPQ и NONO с интегразой и обратной транскриптазой

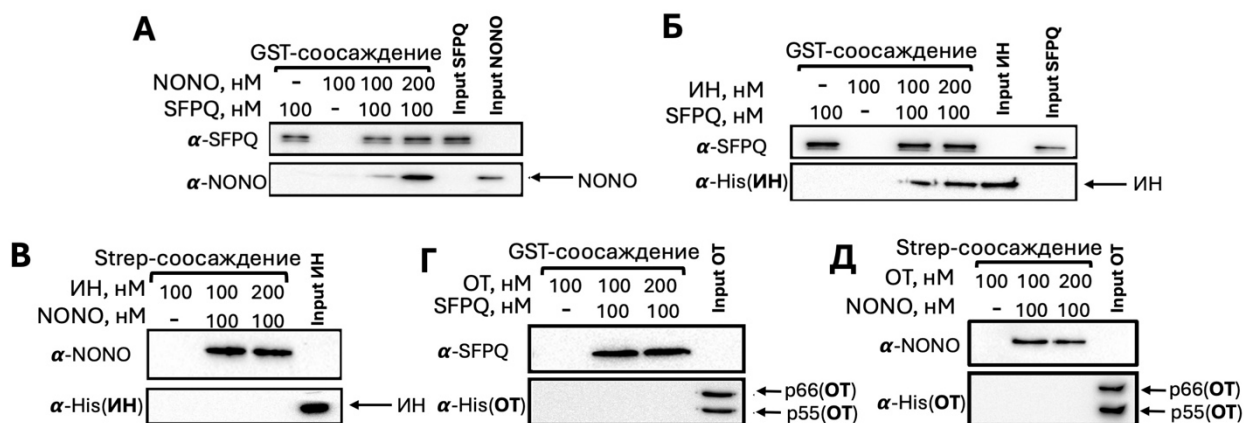
Обнаруженное нами влияние белка SFPQ на стадии интеграции вирусной кДНК и ПИР может быть связано с его непосредственным взаимодействием с вирусной ИН, участвующей в обоих этих процессах. Образование комплекса ИН с SFPQ было ранее описано в работе Yadav et al. [143], в которой было также обнаружено негативное влияние SFPQ на обратную транскрипцию. Несмотря на то, что мы такого влияния не обнаружили (Рисунок 13, В), мы решили детально исследовать взаимодействие SFPQ с ИН, для того чтобы понять, насколько оно важно для влияния SFPQ на репликацию ВИЧ-1. Для контроля мы проверили также возможность связывания SFPQ с ОТ. Учитывая структурное сходство коровых доменов белков SFPQ и NONO [144], мы также проанализировали возможность связывания NONO с ИН и ОТ.

Все исследуемые белки с аффинными метками (GST-SFPQ, Strep-NONO, His<sub>6</sub>-ИН) были получены путём экспрессии с плазмидных векторов (pGEX-SFPQ, pET\_15b\_IN\_wt, pET\_15b\_Strep\_NONO) в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) *Codon Plus* и очищены методом аффинной хроматографии. ОТ с His<sub>6</sub>-тагом нам любезно предоставил для работы к.б.н., н.с. Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН В.Т. Валуев-Эллистон.

Для детекции взаимодействия белков мы использовали метод соосаждения белков с различными аффинными метками: GST для SFPQ (на N-конце), Strep-таг для NONO (на N-конце), и His<sub>6</sub> для ИН и ОТ (на N-конце). Учитывая, что в клетке SFPQ и NONO способны взаимодействовать, образуя гетеродимерный комплекс SFPQ/NONO [144], мы прежде всего проверили функциональность полученных рекомбинантных белков методом соосаждения на глутатион-сефарозе. Результаты показали, что осаждение Strep-NONO происходило только при наличии GST-SFPQ (Рисунок 14, А).

Используя метод GST/Strep-соосаждения, мы далее исследовали способность GST-SFPQ и Strep-NONO взаимодействовать с ИН и ОТ.

Выяснилось, что SFPQ связывается с ИН (Рисунок 14, Б), в то время как NONO такой способностью не обладает (Рисунок 14, В). При этом не было обнаружено взаимодействия ОТ ни с одним из белков: ни с SFPQ, ни с NONO, при любых концентрациях (Рисунок 14, Г, Д).



**Рисунок 14.** Анализ взаимодействия белков с помощью метода соосаждения. А) Анализ взаимодействия SFPQ и NONO. Б) Анализ взаимодействия SFPQ и ИН. В) Анализ взаимодействия ИН и NONO. Г) Анализ взаимодействия SFPQ и ОТ. Д) Анализ взаимодействия NONO и ОТ.

Таким образом мы подтвердили, что SFPQ действительно образует комплекс с ИН, и его эффект по крайней мере на стадию интеграции может быть обусловлен формированием этого комплекса. Тот факт, что SFPQ оказался неспособен связываться с ОТ, хорошо согласуется с отсутствием его влияния на стадию обратной транскрипции, обнаруженным в нашей работе. Результаты данного раздела представлены в статье [3].

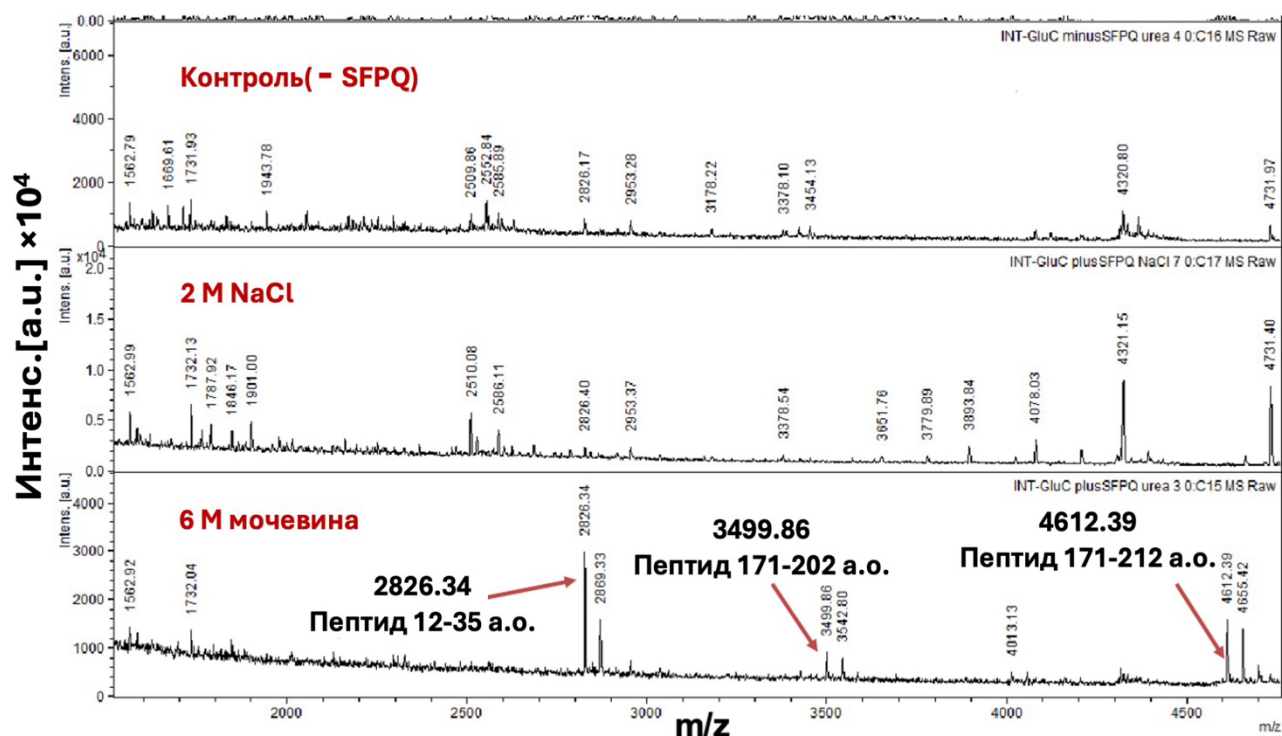
#### IV. 3. Поиск аминокислотных остатков интегразы ВИЧ-1, важных для взаимодействия с SFPQ

Для того, чтобы проверить, действительно ли влияние SFPQ на стадию интеграции и/или ПИР обусловлено его взаимодействием с ИН, необходимо нарушить это взаимодействие, введя аминокислотные замены в сайт связывания белков либо со стороны ИН, либо со стороны SFPQ. В первую очередь мы решили определить сайт связывания SFPQ в составе ИН и получить мутантный вариант ИН, не связывающийся с SFPQ. Это позволило бы нам сформировать мутантный

псевдовирус, содержащий мутации в гене ИН, нарушающие ее способность взаимодействовать с SFPQ, и повторить эксперимент по определению стадии репликации ВИЧ, на которую влияет SFPQ. Если в случае использования такого мутантного вируса влияние на интеграцию или ПИР исчезнет, это будет однозначным подтверждением того, что это влияние действительно обусловлено связыванием SFPQ с ИН. Такая стратегия ранее была применена в нашей лаборатории при изучении влияния на ПИР клеточного белка Ku70 [20].

Для идентификации района ИН, важного для взаимодействия с SFPQ, мы использовали метод «пептидного фишинга», который ранее был успешно применен для анализа структуры сайта связывания ИН с белком Ku70 [139]. С этой целью His<sub>6</sub>-ИН обрабатывалась пептидазой GluC (сериновая протеаза, расщепляет пептидную цепь после Glu, реже после Asp), и полученная смесь пептидов добавлялась к глутатион-сефарозе с иммобилизованным GST-SFPQ и для контроля без него. Далее все пептиды элюировались с глутатион-сефарозы, в целях концентрирования наносились на смолу C18, промывались и элюировались, используя сначала 2 М NaCl, а затем 6 М мочевины. Полученные элюаты анализировались методом tandemной масс-спектрометрии, что позволило идентифицировать пептиды ИН 12-25 и 171-202, связавшиеся с SFPQ (рисунок 15). Эти результаты дали нам первоначальную информацию о возможных участках связывания SFPQ в составе ИН.



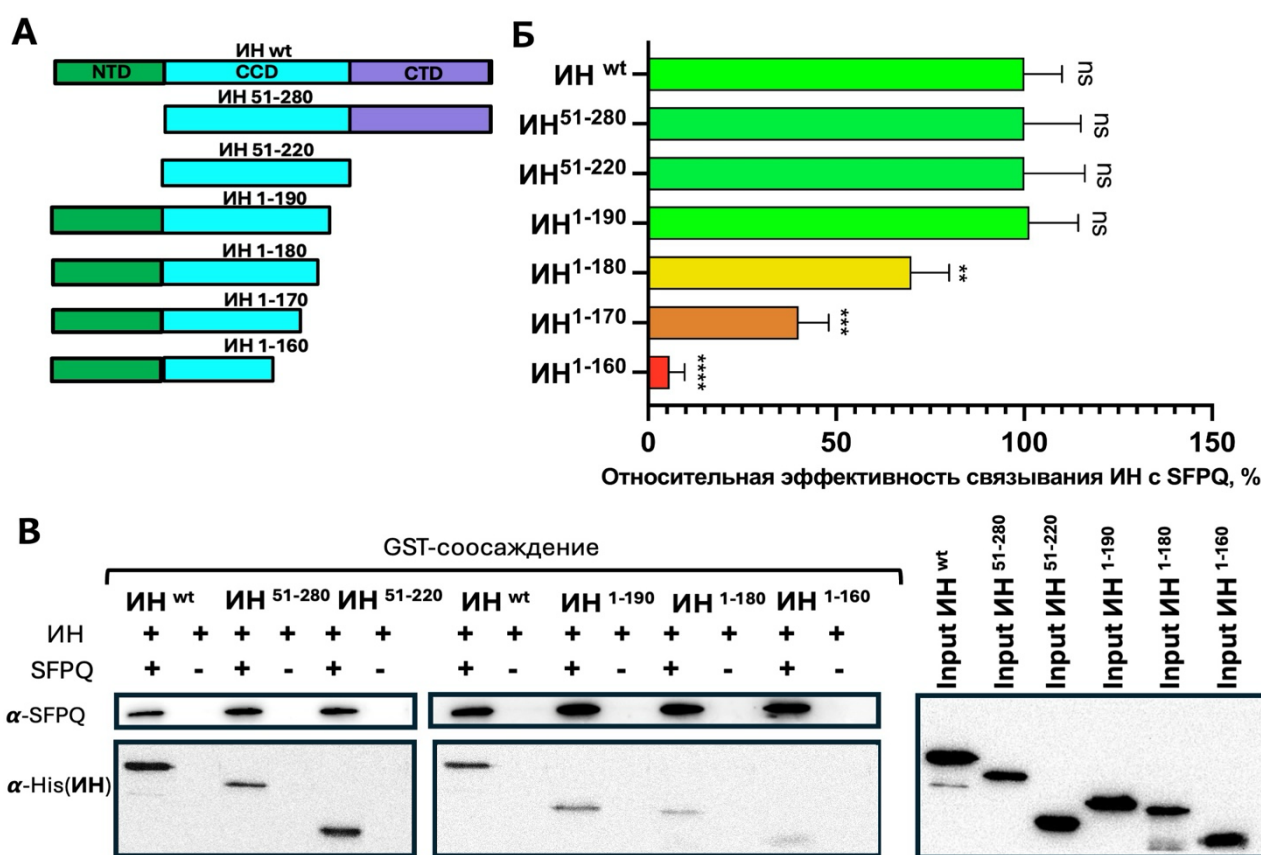


**Рисунок 15.** Результаты идентификации с помощью масс-спектрометрии пептидов интегразы, взаимодействующих с SFPQ.

Для более точного определения сайта связывания SFPQ мы получили набор делеционных мутантов His<sub>6</sub>-ИН: без N-конца (ИН<sup>51-288</sup>), без C-конца (ИН<sup>1-220</sup>), а также без обоих концов (ИН<sup>51-220</sup>) и проверили их взаимодействие с SFPQ методом соосаждения. Анализ связывания GST-SFPQ с этими делеционными мутантами показал, что удаление N- и C-концов не влияет на связывание, что указывает на то, что пептид 12-25, вероятно, соосади́лся с SFPQ в эксперименте по «пептидному фишингу» за счет неспецифического взаимодействия. В то же время, идентифицированный нами пептид 171-202 располагается в центральном каталитическом домене ИН (51-220), который связывался с SFPQ также эффективно, как полноразмерная ИН (Рисунок 16, Б).

Для уточнения места связывания SFPQ, мы создали конструкции ИН с укороченным со стороны C-конца центральным доменом, получив набор мутантов: ИН<sup>1-200</sup>, ИН<sup>1-190</sup>, ИН<sup>1-180</sup>, ИН<sup>1-170</sup> и ИН<sup>1-160</sup>.

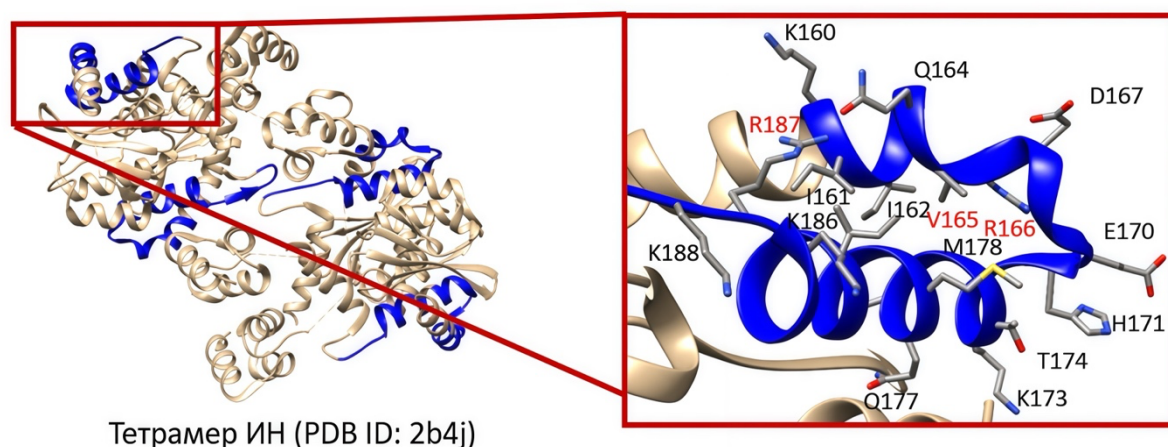
Результаты, представленные на рисунке 16, Б, демонстрируют снижение эффективности связывания при укорачивании каталитического домена ИН. Если белок ИН<sup>1-180</sup> связывался с SFPQ только на 30% хуже ИН дикого типа (ИН<sup>wt</sup>), а белок ИН<sup>1-170</sup> - на 60 % хуже, то мутант ИН<sup>1-160</sup> практически не взаимодействовал с белком SFPQ (Рисунок 16, Б, В). На основании этих данных, можно заключить, что ключевой регион связывания SFPQ локализован в пределах аминокислотных остатков 160-190, что согласуется с результатами «пептидного фишинга».



**Рисунок 16.** Анализ взаимодействия делеционных мутантов интегразы с SFPQ. А) Схематическое изображение делеционных мутантов, тестируемых на взаимодействие с SFPQ. Б) Относительная эффективность связывания мутантных вариантов ИН с SFPQ, %. Эксперимент выполнен в трех независимых повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; ns - не является значимой. В) вестерн-блот анализ связывания некоторых мутантных форм ИН с SFPQ.

Последовательное частичное снижение эффективности связывания SFPQ с мутантами ИН<sup>1-180</sup> и ИН<sup>1-170</sup> позволяет предположить наличие в данном регионе

двух независимых сайтов взаимодействия: в районах 180-190 и 160-170. Для точного картирования этих сайтов в область 160-190 ИН были введены точечные замены аминокислот. Для этого аминокислотные остатки, экспонированные на поверхность белка и доступные растворителю в составе функционально активного тетрамера ИН, последовательно замещались на аланин (Рисунок 17).



**Рисунок 17.** Структура тетрамера интегразы, ID 2b4j. Справа в рамке представлена структура участка ИН, содержащего остатки 160-190. Красным обозначены аминокислотные остатки, которые важны для взаимодействия с SFPQ (R187, V165, R166).

Сначала методом сайт-направленного мутагенеза были получены конструкции с множественными аминокислотными заменами в указанном регионе. Полный перечень мутантов, включая их структурные модификации и количественные показатели эффективности связывания с SFPQ, приведен в Таблица 6.

Результаты вестерн-блот анализа взаимодействия всех вышеперечисленных мутантов с SFPQ приведены в приложении 1. Значительное снижение эффективности связывания наблюдалось для вариантов ИН, содержащих замены K160A/Q164A/Q168A/I182A/R187A и Q164A/V165A/R166A. При этом для белков, содержащих замены K160A, Q164A, Q168A и I182A, статистически значимого снижения эффективности связывания отмечено не было, что позволило нам исключить данные остатки из последующего анализа.

**Таблица 6.** Относительная эффективность связывания мутантных форм интегразы с SFPQ. Красным выделены аминокислотные остатки, замена которых нарушает взаимодействие ИН с SFPQ.

Мутантные формы ИН	Относительная эффективность связывания, %
ИН <sup>wt</sup>	100±9
E170A/H171A/K173A	100±8
K160A/Q164A/Q168A	100±7
K160A/Q164A/Q168A/I182A	95±8
K160A/Q164A/Q168A/I182A/ <b>R187A</b>	<b>5±1.5</b>
K160A/I161A/I162A	90±7
Q164A/ <b>V165A/R166A</b>	<b>3±1</b>
T174A/V176A/Q177A/M178A	100±9
<b>R187A</b>	<b>5±2</b>

С целью подтвердить важность для связывания с SFPQ аминокислотных остатков R187, V165 и R166 были сконструированы генетические векторы, содержащие точечные мутации в указанных позициях. Мутант ИН<sup>R187A</sup> был получен и выделен и было показано, что замена R187A действительно приводит к потере способности ИН взаимодействовать с SFPQ. Белки с точечными заменами V165A и R166A нам выделить не удалось, поэтому на данный момент мы можем только утверждать, что эффективность связывания нарушена у тройного мутанта ИН<sup>Q164A/V165A/R166A</sup>. Однако, поскольку замена Q164A не влияет на связывание ИН с SFPQ (например, мутант ИН<sup>K160A/Q164A/Q168A</sup> связывается также хорошо, как полноразмерная ИН), можно утверждать, что в связывании участвуют только остатки V165A и/или R166A.

Таким образом, в результате проведенного исследования мы смогли идентифицировать критически важные остатки, участвующие в формировании интерфейса взаимодействия ИН с SFPQ: R187, V165 и/или R166. Надо также отметить, что эти аминокислотные остатки располагаются с разных сторон двух разных участков  $\alpha$ -спирали, и такое их расположение в принципе может указывать на наличие двух сайтов связывания.

#### IV. 4. Анализ функциональной активности точечных мутантов ИН

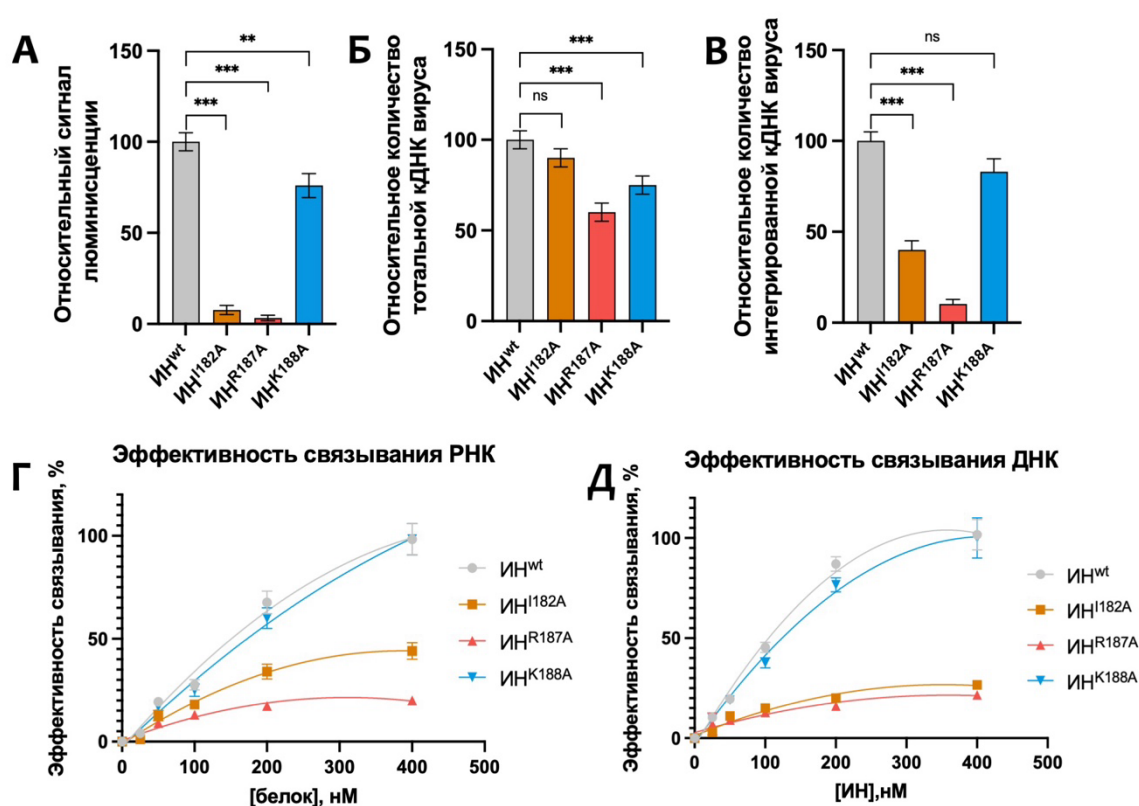
Получив данные о структуре сайта связывания SFPQ в составе ИН, мы далее планировали собрать псевдовirusы, содержащие варианты ИН с заменами идентифицированных нами аминокислот, чтобы проверить, как эти замены влияют на ранние этапы репликации ВИЧ-1. Этот эксперимент позволил бы нам выяснить, вызвано ли влияние клеточного белка SFPQ на интеграцию и/или ПИР его непосредственным связыванием с ИН или нет. Однако для этого эксперимента необходимо, чтобы такой мутантный псевдовirus сохранял способность к репликации. К сожалению, анализ данных литературы показал, что аминокислотные замены в позициях ИН V165 и R166 существенно снижают её каталитическую активность *in vitro* и подавляют репликативную активность вируса [172]. По этой причине мы отказались от мысли получать псевдовirus с указанными заменами. Что касается замены R187A, то, по литературным данным [173], она тоже приводила к потере инфекционности ВИЧ-1, однако молекулярные механизмы этого эффекта оставались не до конца выяснены.

По этой причине мы решили провести дополнительное исследование влияния аминокислотных замен в участке 180-188 на ранние этапы жизненного цикла ВИЧ-1 и выбрали помимо остатка R187 еще I182 и K188, о которых было известно, что замена K188E препятствует связыванию ИН с вирусной РНК [174], а замена I182A снижает эффективность обратной транскрипции [175].

Мы начали с оценки эффективности репликации вирусов с заменами в ИН I182A, R187A и K188A, для чего использовали описанные в разделе 4.1 псевдовirusные частицы. Для создания мутантных вариантов ИН в составе этих частиц применяли метод сайт-направленного мутагенеза. Все псевдовirusы были проанализированы на содержание белка p24. Клетки линии НЕК 293Т были трансдуцированы псевдовirusами в дозе 100 пг p24 на  $10^5$  клеток (MOI = 1). Через 24 часа после трансдукции собрали образцы для измерения активности люциферазы и анализа ДНК. Результаты показали, что у псевдовirusных частиц, содержащих замены в ИН, снижалась продукция люциферазы (Рисунок 18, А).

Самый сильный эффект наблюдался в случае замены R187A, которая снижала эффективность репликации в 50 раз. Этот результат в целом согласуется с данными литературы [175]. Замена I182A снижала активность люциферазы в 10 раз, а замена K188A всего лишь в 1,5 раза. По результатам этого эксперимента можно заключить, что каждая из этих аминокислотных замен действительно оказывает влияние на ранние стадии репликации вируса.

Для определения стадии, на которую влияют аминокислотные замены I182A, R187A и K188A, мы определили количества тотальной и интегрированной



**Рисунок 18.** Анализ активности мутантных форм ИН в вирусе и анализ эффективности связывания РНК, ДНК мутантов *in vitro*. А) Относительный сигнал люминисценции при трансдукции клеток вирусом, содержащим мутантные формы ИН (мутантным вирусом). Б) Относительное количество тотальной кДНК мутантных вирусов. В) Относительное количество интегрированной кДНК мутантных вирусов. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; ns - не является значимой. Г) Эффективность связывания TAR РНК мутантными ИН. Д) Эффективность связывания ДНК мутантными ИН.



вирусной кДНК методом количественного ПЦР в режиме реального времени. Результаты анализа продемонстрировали следующие закономерности: замена I182A оказывала негативное воздействие исключительно на стадию интеграции, не затрагивая процесс обратной транскрипции (Рисунок 18, Б, В); замена K188A вызывала снижение эффективности обратной транскрипции приблизительно в 1.5 раза (Рисунок 18, Б). Наблюдаемое уменьшение уровня интегрированной ДНК (на 20-25%) в случае замены K188A (Рисунок 18, В), вероятно, обусловлено снижением количества субстрата (кДНК), доступного для последующей интеграции. Замена R187A вызывала статистически значимое снижение продукции тотальной кДНК (почти в 2 раза) и сопровождалось резким подавлением интеграции (10-кратное уменьшение) (Рисунок 18, Б, В), что свидетельствует о влиянии замены R187A на обе ранние стадии репликации. Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что исследованные аминокислотные остатки играют различную роль в механизме протекания обратной транскрипции и интеграции.

Для детализации молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых эффектов введенных в ИН аминокислотных замен, было проведено комплексное исследование, включающее в себя анализ взаимодействия мутантных форм ИН с нуклеиновыми кислотами (ДНК/РНК) методом торможения в геле, определение каталитической активности мутантных вариантов интегразы *in vitro* с использованием модельных субстратов для количественной оценки эффективности реакций 3'-процессинга и переноса цепи, исследование их способности мультимеризоваться и взаимодействовать с ОТ методом соосаждения.

Известно, что ИН вируса демонстрирует специфическое связывание с вирусной РНК, обладая повышенной аффинностью к структуре TAR-участка, и это взаимодействие критически важно для обеспечения эффективной обратной транскрипции. Результаты количественного анализа связывания мутантных форм ИН с заменами I182A, R187A, K188A с нуклеиновыми кислотами представлены

на рисунке 18 Г, Д. Анализ РНК-связывающей активности белка ИН<sup>I182A</sup> продемонстрировал 3-кратное снижение аффинности этого мутанта к TAR РНК. Для ИН<sup>R187A</sup> наблюдали 4-кратное уменьшение эффективности связывания. Замена K188A снижала аффинность только в 1.5 раза.

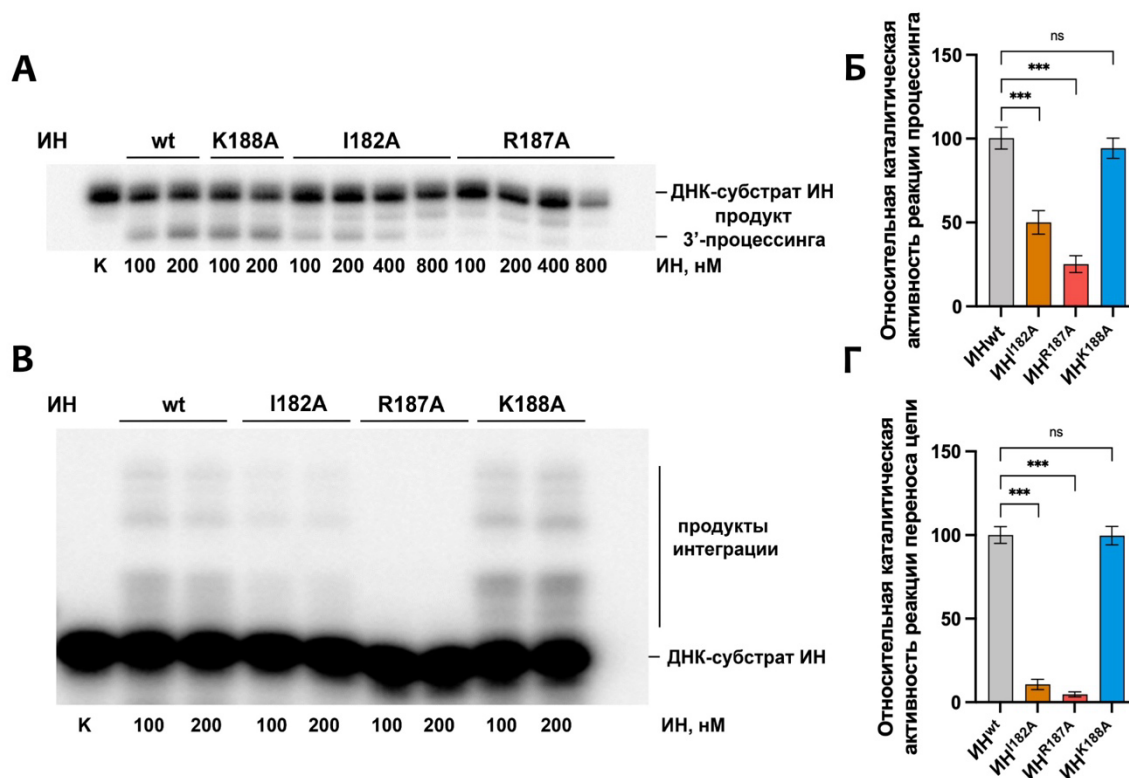
Сильное нарушение взаимодействия ИН с TAR РНК, вызванное аминокислотной заменой R187A, хорошо коррелирует с обнаруженным нами снижением эффективности обратной транскрипции в случае псевдовируса с мутантной ИН<sup>R187A</sup> (Рисунок 18, Б). В отличие от него, замена K188A мало влияет на связывание РНК и приводит только к незначительному снижению эффективности обратной транскрипции (Рисунок 18, А, Г). Наиболее интересный результат был получен при изучении ИН<sup>I182A</sup>: замена I182A заметно ухудшает связывание TAR РНК, но никак не влияет на эффективность обратной транскрипции. Возможно, этот мутант ИН связывает РНК хуже, но структура образующихся комплексов такова, что не нарушает морфологию вирусных частиц, что соответственно не приводит к снижению уровня тотальной вирусной кДНК.

Каталитическая функция ИН находится в прямой зависимости от корректного связывания ДНК-субстрата. ДНК-связывающая активность белка ИН<sup>I182A</sup> оказалась снижена в 9 раз, а белка ИН<sup>R187A</sup> в 13.5 раз хуже активности ИН дикого типа, причем, даже при 100-кратном избытке белков по сравнению с ДНК, нам не удалось достичь 100% эффективности образования их комплекса. Для ИН<sup>K188A</sup> наблюдалось 2-кратное уменьшение аффинности.

Снижение аффинности мутантов ИН<sup>I182A</sup> и ИН<sup>R187A</sup> к ДНК коррелирует с выраженными дефектами каталитической активности: эффективность реакции 3'-процессинга для ИН<sup>I182A</sup> снижена в 2 раза, для ИН<sup>R187A</sup> – в 4 раза, а ИН<sup>K188A</sup> сохраняет 85-90% активности. При анализе реакции переноса цепи белок ИН<sup>I182A</sup> демонстрирует 10-кратное снижение активности, ИН<sup>R187A</sup> – 20-кратное, тогда как активность ИН<sup>R188A</sup> не отличается от нативной ИН (Рисунок 19).



Эти данные объясняют заметное снижение эффективности интеграции в случае псевдовируса, несущего ИН с заменой I182A, и комбинированный дефект обратной транскрипции/интеграции при замене R187A (Рисунок 18).

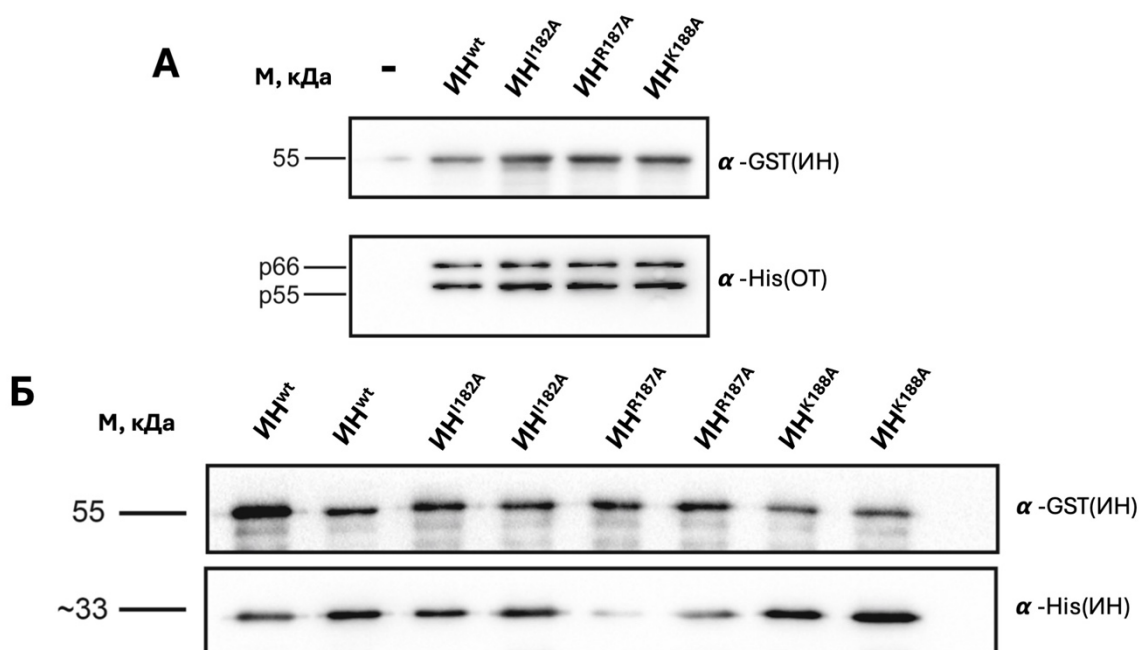


**Рисунок 19.** Характеристика каталитической активности мутантных форм ИН. А, Б - Характеристика 3'-процессинга. В, Г - Характеристика переноса цепи. Эксперимент выполнен в трех независимых повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*  $p < 0,001$ ; ns - не является значимой.

Интеграза ВИЧ-1 в составе интасомы образует тетрамер из двух димеров [176]. Одна субъединица в каждом димере катализирует 3'-процессинг и перенос цепи ДНК, а другая стабилизирует комплекс. Каталитический центр одной субъединицы расположен рядом с N-концом соседней субъединицы и вирусной ДНК, что указывает на его роль в связывании субстрата [176]. Надо заметить, что участок ИН между аминокислотными остатками 180 и 188 важен для правильной организации и функционирования ИН. Так, ранее было показано, что замены аминокислот в этом участке существенно снижают эффективность обратной

транскрипции, возможно из-за нарушения связывания мутантных вариантов ИН с ОТ и/или нарушения мультимерной структуры ИН [131].

Гипотеза о нарушении взаимодействия ИН с обратной транскриптазой (ОТ) у исследуемых мутантов ИН была нами опровергнута: анализ GST-меченых мутантов ИН с His<sub>6</sub>-меченой ОТ методом соосаждения показал, что все варианты ИН одинаково хорошо связываются с ОТ (Рисунок 20, А).



**Рисунок 20.** Влияние аминокислотных замен на некаталитические свойства ИН ВИЧ-1. А) Анализ взаимодействия ИН с ОТ с помощью метода соосаждения. Б) Анализ мультимеризации мутантных ИН с помощью соосаждения.

Тест на мультимеризацию показал, что ИН<sup>I182A</sup> и ИН<sup>K188A</sup> сохраняют 85-95% способности к олигомеризации, тогда как ИН<sup>R187A</sup> полностью теряет эту способность (<5% от контроля) (Рисунок 20, Б), что дополнительно оказывает негативный эффект на репликацию вируса, содержащего замену R187A в ИН.

Такое сильное влияние замены R187A на функции ИН можно объяснить тем, что гуанидиновая группа остатка R187 может образовывать водородные связи с карбонильным кислородом в пептидной цепи у остатка N16, который участвует в организации важного структурного ННСС-мотива в N-концевом домене ИН [135]. Предсказана также водородная связь остатка R187 с вирусной

ДНК [177]. Следовательно, аминокислота R187 очень важна для организации правильной структуры ИН, необходимой как для ее каталитических, так и некаталитических функций, поэтому замена R187A оказывает такое существенное влияние.

Полученные результаты указывают на сложную функциональную организацию ИН ВИЧ-1, где каждая аминокислота в области междоменного взаимодействия играет специфическую роль в реализации различных этапов жизненного цикла вируса.

Результаты данного раздела представлены в статье [4].

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

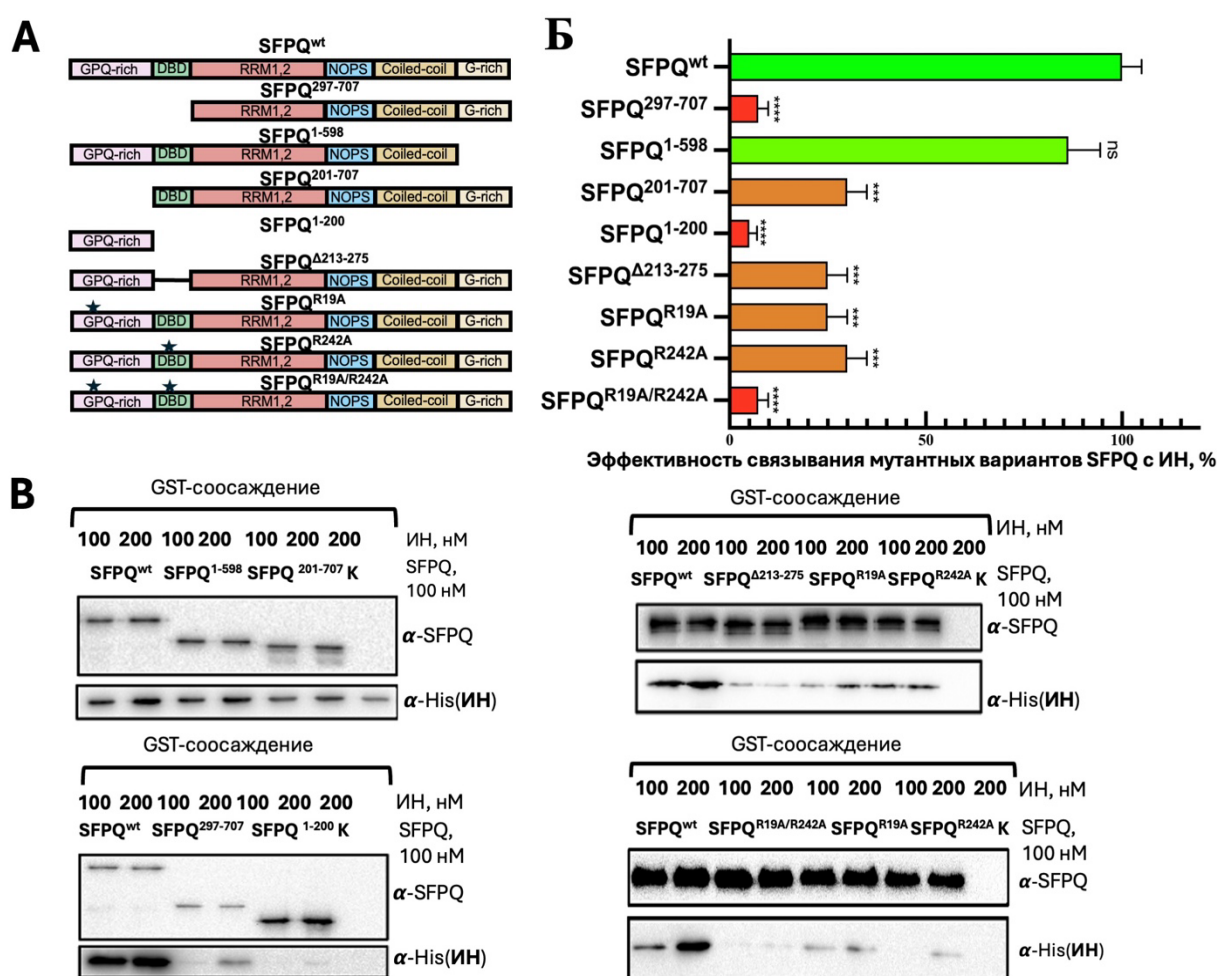
В связи с тем, что мы показали, что замена R187A в составе ИН приводит к резкому снижению каталитической активности ИН и снижению эффективности ранних этапов репликации, а замены V165A и R165A, согласно литературным данным, вызывают полную утрату инфекционности вируса [172], нам пришлось отказаться от первоначального плана по анализу влияния замен в структуре ИН, нарушающих ее взаимодействие с белком SFPQ, на эффективность интеграции. Соответственно, чтобы понять, зависит ли эффективность интеграции от непосредственного взаимодействия ИН с SFPQ, мы решили нарушить это взаимодействие со стороны SFPQ, для чего необходимо было определить сайт связывания ИН в его составе.

Для локализации участка взаимодействия ИН/SFPQ была создана серия делеционных мутантов SFPQ, содержащих GST-метку на N-конце (Рисунок 21). Учитывая, что белок NONO не связывался с ИН (Рисунок 14), а основные структурные отличия белков NONO и SFPQ находятся в их концевых доменах [144], мы в первую очередь провели проверку связывания ИН с двумя делеционными мутантами SFPQ, не содержащими N- и C-концевых участков: SFPQ<sup>297-707</sup> и SFPQ<sup>1-598</sup>, соответственно, методом аффинного соосаждения. Результаты анализа показали, что мутант SFPQ<sup>297-707</sup> полностью утратил

способность связываться с ИН (остаточная активность <5% от контроля), а белок SFPQ<sup>1-598</sup> сохранил 85-90% аффинности к ИН по сравнению с полноразмерным белком. Следовательно, мы сделали вывод, что сайт связывания ИН локализован в N-концевом домене SFPQ (а.о. 1-296). Для дальнейшего уточнения положения сайта было исследовано связывание ИН с серией мутантов: SFPQ<sup>1-200</sup>, SFPQ<sup>201-707</sup>, SFPQ<sup>246-707</sup>. Среди них только SFPQ<sup>201-707</sup> продемонстрировал частичное сохранение аффинности к ИН (30% от контроля), что позволило ограничить район расположения предполагаемого сайта связывания участком 201-246 а.о. Вместе с тем, более низкая эффективность связывания с ИН мутанта SFPQ<sup>201-707</sup>, чем SFPQ<sup>1-598</sup>, позволила нам предположить наличие второго сайта связывания в районе 1-200 а.о.

Для подтверждения этого предположения, мы попытались создать делеционный мутант SFPQ<sup>Δ201-246</sup>, но столкнулись с техническими ограничениями из-за экстремально высокого содержания GC-пар (90%) в соответствующем участке гена, препятствующего проведению ПЦР-амплификации и сайт-направленного мутагенеза. В качестве альтернативы был получен мутант SFPQ<sup>Δ213-275</sup>, который оказался способным связываться с ИН с эффективностью 20-30% от эффективности связывания полноразмерного белка. Этот результат подтвердил наличие двух участков связывания ИН в SFPQ, один из которых расположен в области 213–275 а.о., а второй в другой области N-концевого домена. Надо отметить, что наличие двух участков связывания ИН в составе SFPQ коррелирует с наличием двух участков связывания этого белка в составе ИН, обнаруженного нами ранее (Раздел IV. 3.).

С целью поиска второго участка связывания мы проверили взаимодействие ИН с мутантом SFPQ<sup>1-200</sup>. Этот белок оказался неспособен связываться с ИН, но возможно, это было обусловлено тем, что данный участок белка является неструктурированным. В связи с этим мы проанализировали структуру всего N-концевого домена SFPQ и выявили наличие двух консервативных мотивов diRGGX1-4, где X – любые аминокислотные остатки: R<sup>19</sup>GGGGGR<sup>25</sup>GG и



**Рисунок 21.** Анализ взаимодействия делеционных и точечных мутантов SFPQ с ИН. А) Схематичное изображение делеционных и точечных мутантов, тестируемых на взаимодействие с ИН. Б) Относительная эффективность связывания мутантных вариантов SFPQ с ИН, %. Эксперимент выполнен в трех независимых повторях. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ; ns - не является значимой. В) вестерн-блот анализ связывания мутантных форм SFPQ с ИН.

R<sup>236</sup>GGGGGR<sup>242</sup>GG. Данный мотив может отвечать за множество функций, в том числе за белок-белковые взаимодействия [178].

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

Таким образом, мы показали, что в связывании с ИН участвуют два мотива diRGGX<sub>1-4</sub>, локализованные в N-концевом домене SFPQ: R<sup>19</sup>GGGGGR<sup>25</sup>GG и R<sup>236</sup>GGGGGR<sup>242</sup>GG, и именно они являются ключевыми структурными элементами, обеспечивающими стабильность комплекса SFPQ с ИН.

Результаты данного раздела представлены в статье [3].

#### **IV. 6. Выяснение механизма влияния SFPQ на интеграцию и постинтеграционную репарацию**

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

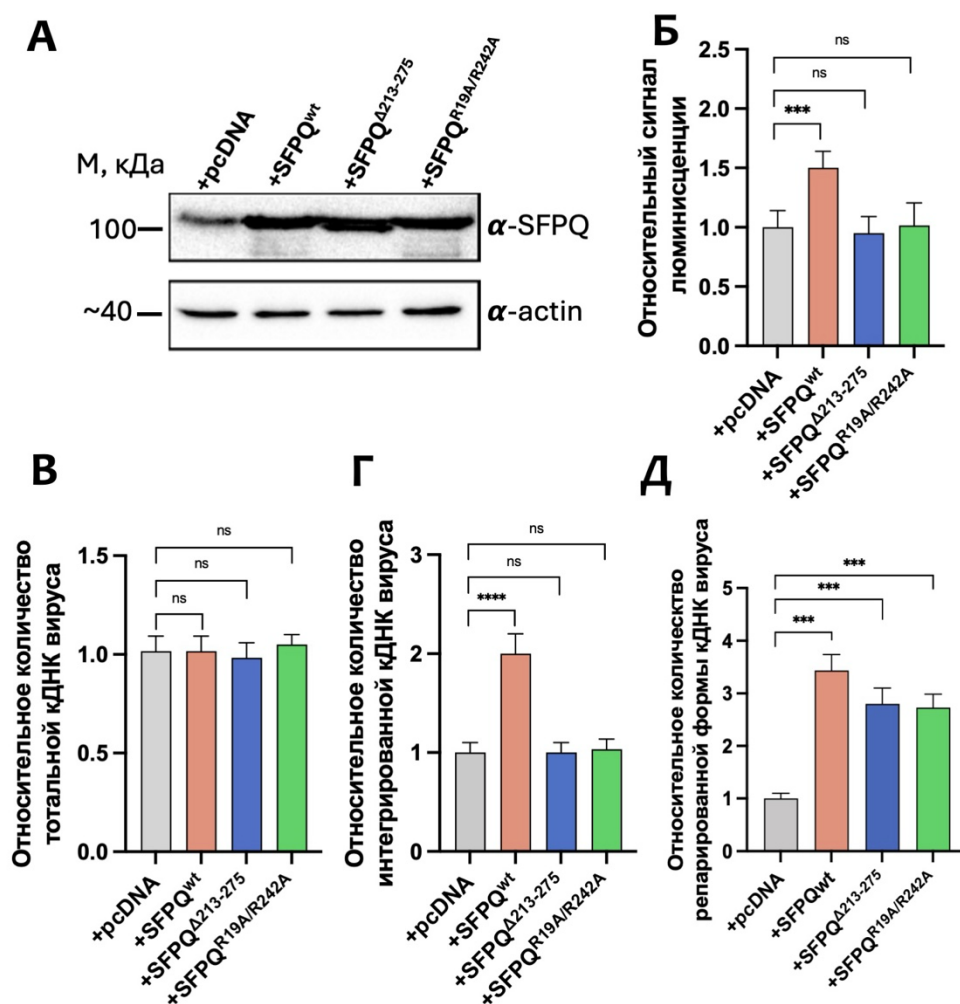
Эти белки были суперэкспрессированы в клетках HEK293T и повышение их внутриклеточного уровня было подтверждено с помощью вестерн-блот анализа (Рисунок 22, А). После этого клетки были трансдуцированы VSV-G-псевдотипированным вектором на основе ВИЧ-1, кодирующим люциферазу светлячка. Оказалось, что суперэкспрессия мутантных белков SFPQ<sup>Δ213-275</sup> и SFPQ<sup>R19A/R242A</sup> не оказывает никакого эффекта ни на сигнал люциферазы, ни на

обратную транскрипцию, ни на интеграцию вирусной кДНК, в отличие от полноразмерного белка SFPQ (Рисунок 22, Б-Г).

Эти результаты демонстрируют, что ключевую роль в регуляции процесса интеграции вирусной ДНК играет непосредственное взаимодействие клеточного белка SFPQ с ИН, а аминокислотные остатки, участвующие в связывании этих белков, расположены в N-концевом домене SFPQ и каталитическом домене ИН. При этом SFPQ является положительным фактором репликации ВИЧ-1, поскольку при увеличении его уровня в клетке уровень интегрированной формы ДНК растет, а при уменьшении – падает.

Надо отметить, что ранее проведенные исследования влияния SFPQ на репликацию ВИЧ-1 показали другой результат: когда уровень SFPQ в клетках TZM-bl снижался, количество как общей, так и интегрированной вирусной ДНК возрастало. Эти эксперименты также выявили прямое взаимодействие между SFPQ и ИН ВИЧ, а компьютерные расчеты показали, что сайт связывания ИН расположен в центральном домене SFPQ [143]. В нашем же исследовании мы получили другие результаты. Система, используемая нами – VSV-G-псевдовиральный вектор на основе ВИЧ-1, успешно показала себя в других работах, где оценивалось влияние разных факторов на ранние стадии репликации ВИЧ-1 [75, 86,169]. Мы обнаружили, что SFPQ влияет именно на стадию интеграции вируса и не оказывает влияния на обратную транскрипцию. Кроме того, мы подтвердили, что SFPQ и ИН могут непосредственно взаимодействовать друг с другом и экспериментально определили район их связывания. С помощью псевдовиралов, содержащих варианты ИН, неспособные взаимодействовать с SFPQ, мы доказали, что влияние этого клеточного белка на интеграцию обусловлено именно его связыванием с ИН.

Этот результат подтверждает, что регуляторное влияние SFPQ на интеграцию напрямую зависит от его способности связываться с ИН. Следовательно, комплекс ИН с SFPQ можно рассматривать как новую



**Рисунок 22.** Влияние мутантных форм SFPQ, не способных связываться с ИН, на репликацию псевдовиральной системы. А) Вестерн-блот анализ клеточных лизатов. Б) Относительный сигнал люминесценции при суперэкспрессии различных мутантов. В) Относительное количество totalной кДНК вируса при суперэкспрессии различных мутантов. Г) Относительное количество интегрированной кДНК вируса при суперэкспрессии различных мутантов. Д) Относительное количество репарированной кДНК вируса при суперэкспрессии различных мутантов. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ; ns - не является значимой.

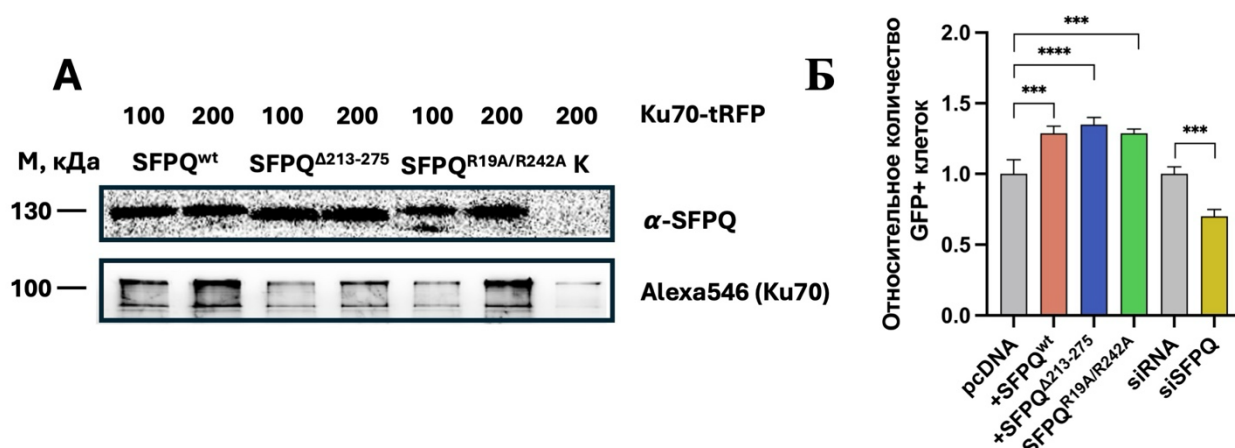


молекулярную мишень для разработки ингибиторов, нацеленных на блокировку ИН/SFPQ-взаимодействия, как потенциальных компонентов антиретровирусной стратегии.

При анализе того, как изменяется эффективность ПИР при изменении внутриклеточного уровня белка SFPQ дикого типа и его мутантов, оказалось, что суперэкспрессия мутантных белков SFPQ<sup>R19A/R242A</sup> и SFPQ<sup>Δ213-275</sup>, неспособных взаимодействовать с ИН и, соответственно, не влияющих на интеграцию, также приводила к повышению уровня репарированной ДНК, хотя эффект был несколько меньше, чем в случае SFPQ дикого типа (Рисунок 22, Д). Этот факт указывает на то, что в отличие от интеграции, влияние SFPQ на процесс ПИР не зависит от его связывания с ИН.

Как указано в обзоре литературы, процесс ПИР начинается с того, что к местам повреждений в ДНК привлекаются две киназы: ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK) и АТМ, - за счет непосредственного взаимодействия ИН с субъединицей DNA-PK - белком Ku70 [20]. В результате, инициация ПИР напоминает инициацию репарации двуцепочечных разрывов в ДНК по пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Важно, что белок SFPQ также участвует в NHEJ-репарации и способен связываться с ДНК независимо от Ku70 на внутренних поверхностях ДНК [153]. Кроме того, и SFPQ, и Ku70 связываются с местами повреждений ДНК, но в разное время [157].

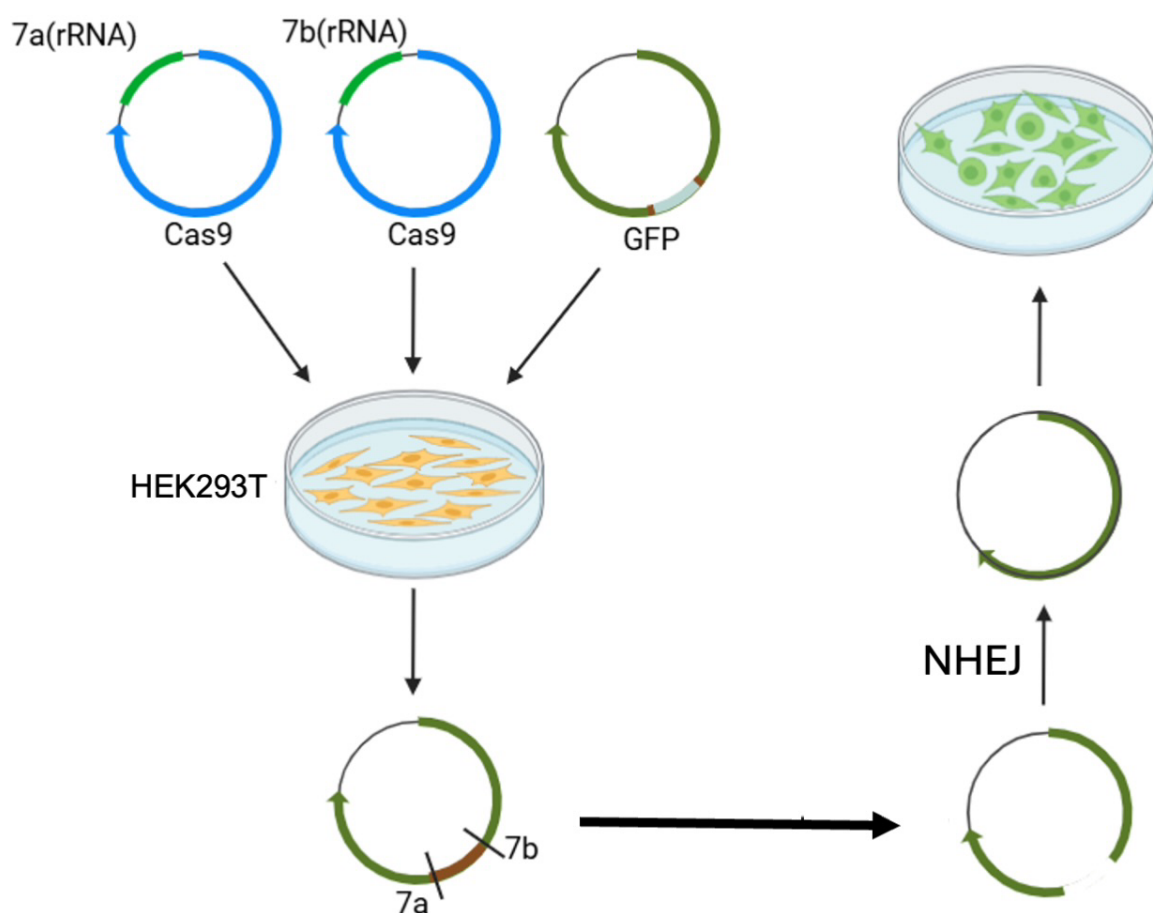
Учитывая, что SFPQ оказывает сильное стимулирующее действие на ПИР, которое при этом не зависит от его связывания с ИН, мы предположили, что SFPQ может участвовать в процессе ПИР за счет его возможного взаимодействия с Ku70. Прежде всего мы проверили способность созданных нами мутантов SFPQ $\Delta$ 213-275 и SFPQ<sup>R19A/R242A</sup> связываться с Ku70. Для этого мы соосадили белки GST-SFPQ (дикого типа и мутанты) и His<sub>6</sub>-Ku70-tRFP на глутатион-сефарозе и обнаружили непосредственное взаимодействие Ku70 и SFPQ дикого типа (Рисунок 23, А).



**Рисунок 23.** Влияние SFPQ на NHEJ репарацию. А) Анализ соосаждения GST-SFPQ и HisKu70-tRFP. Б) Анализ влияния SFPQ на NHEJ-репарацию. Эксперимент выполнен в трех независимых биологических повторах. Значимость была определена с помощью одностороннего дисперсионного анализа, \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ; ns - не является значимой.

Анализ связывания мутантных форм SFPQ показал, что как SFPQ $\Delta$ 213-275, так и SFPQ<sup>R19A/R242A</sup> способны связывать Ku70, хотя эффективность связывания была ниже для белка SFPQ $\Delta$ 213-275 (Рисунок 23, А). Учитывая, что оба мутантных белка оказывали абсолютно одинаковое влияние на эффективность ПИР (Рисунок 22, Д), а белок SFPQ $\Delta$ 213-275 хуже связывается с Ku70, чем SFPQ<sup>R19A/R242A</sup>, мы сделали вывод, что участие белка SFPQ в процессе ПИР скорее всего не зависит от его взаимодействия с Ku70.

Нам также было интересно проверить, зависит ли от связывания с Ku70 участие SFPQ в NHEJ-репарации. Для этого анализа использовалась система на основе трех плазмид [179]. Первая плазмида кодирует эндонуклеазу Cas9 и гидовую РНК 7a, вторая – Cas9 и гидовую РНК 7b, третья – ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) с 46-нуклеотидным спейсером, нарушающим синтез флуоресцентного белка. Гидовые РНК 7a и 7b нацелены на концевые участки спейсера. При попадании всех плазмид в клетки HEK293T, Cas9 вызывает двуцепочечные разрывы по краям спейсера и его удаление из вектора. Репарация разрывов по пути NHEJ восстанавливает функциональный ген GFP, в результате чего в клетках экспрессируется флуоресцентный белок (Рисунок 24).



**Рисунок 24.** Схема эксперимента для проверки эффективности NHEJ-репарации ДНК.

Прежде всего мы проверили, как белок SFPQ влияет на репарацию двуцепочечных разрывов в нашей системе. Повышение уровня SFPQ путем

суперэкспрессии увеличило долю GFP<sup>+</sup> клеток в 1,3 раза по сравнению с контролем, а снижение уровня с помощью siРНК уменьшало ее примерно на 30-35%. Это подтвердило, что наша система проверки NHEJ-репарации функциональна и SFPQ – позитивный регулятор NHEJ. Анализ влияния на эффективность репарации двуцепочечных разрывов по пути NHEJ суперэкспрессии мутантных белков SFPQ<sup>R19A/R242A</sup> и SFPQ<sup>Δ213-275</sup>, последний из которых несколько хуже связывался с Ku70, показал, что оба белка оказывают такое же влияние на NHEJ-репарацию, как и SFPQ дикого типа (Рисунок 23, Б).

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

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате экспериментов с использованием VSV-G-псевдотипированного репликативно-некомпетентного лентивирусного вектора на основе ВИЧ-1 было впервые показано, что клеточный белок SFPQ позитивно влияет на ранние стадии репликации ВИЧ-1, при этом его клеточный партнер NONO на эти стадии не влияет. Установлено, что SFPQ не влияет на процесс обратной транскрипции, но стимулирует интеграцию и постинтеграционную репарацию.

С использованием серии делеционных и точечных мутантов SFPQ и ИН ВИЧ-1 определены аминокислотные остатки, участвующие в связывании этих белков. Изучение влияния мутантов SFPQ, не способных взаимодействовать с ИН, на репликацию вируса позволило установить, что позитивный эффект SFPQ на стадию интеграции зависит от его связывания с ИН. При изучении влияния SFPQ на постинтеграционную репарацию ВИЧ-1 установлено, что он положительно влияет на этот процесс по ИН-независимому механизму.

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

## VI. ВЫВОДЫ

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

## VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 
1. Rosina A., Anisenko A., Kikhai T., Silkina M., and Gottikh M. Complex relationships between HIV-1 integrase and its cellular partners // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. P. 12341.
  2. Шадрина О.А., Кихай Т.Ф., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. Белки SFPQ, NONO и длинная некодирующая РНК NEAT1: функции в клетке и в жизненном цикле ВИЧ-1 // *Молекулярная биология*. 2022. Т. 56. № 2. С. 259–274.
  3. Kikhai T., Agapkina Y., Silkina M., Prikazchikova T., and Gottikh M. The cellular SFPQ protein as a positive factor in the HIV-1 integration // *Biochimie*. 2024. Vol. 222. P. 9–17.
  4. Кихай Т.Ф., Агапкина Ю.Ю., Приказчикова Т.А., Вдовина М.В., Шехтман С.П., Фомичева С.В., Королев С.П., Готтих М.Б. Роль аминокислот каталитического домена интегразы ВИЧ-1, I182, R187, K188, в процессах обратной транскрипции и интеграции // *Биохимия (Москва)*. 2024. Т. 89. № 3. С. 462–473.
  5. Votteler J. and Schubert U. Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology // *Encyclopedia of Virology*. 2008. P. 517–525.
  6. Li G. and 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.
  7. Агапкина Ю., Приказчикова Т., Смоллов М., Готтих М. Структура и функции интегразы ВИЧ-1 // *Успехи биологической химии*. 2005. V.45. P. 87–112.
  8. Steckbeck J.D., Kuhlmann A.S., and Montelaro R.C. C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic // *J Gen Virol*. 2013. Vol. 94. Pt 1. P. 1–19.
  9. Freed E.O. HIV-1 assembly, release and maturation // *Nat Rev Microbiol*. 2015. Vol. 13. № 8. P. 484–496.
  10. Hu W.-S. and Hughes S.H. HIV-1 reverse transcription // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. Vol. 2. P. a006882.

- 
11. Felli C., Vincentini O., Silano M., Masotti A. HIV-1 Nef Signaling in Intestinal Mucosa Epithelium Suggests the Existence of an Active Inter-kingdom Crosstalk Mediated by Exosomes // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8. P. 1022
  12. Lusic M., Siliciano R.F. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration // *Nat Rev Microbiol.* 2017.
  13. Ruelas D.S., Greene W.C. An integrated overview of HIV-1 latency // *Cell.* 2013. Vol. 155. № 3. P. 519–529.
  14. Daugherty M.D., Booth D.S., Jayaraman B., Cheng Y., Frankel A.D. HIV Rev response element (RRE) directs assembly of the Rev homooligomer into discrete asymmetric complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107. № 28. P. 12481–12486.
  15. Gomez L.M., Pacyniak E., Flick M., Hout D.R., Volkman B.F., Gomez J., Flegler A., Peterson C., Chrnyk B., Lyda M., Stephens E.B. Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains // *Virology.* 2005. Vol. 335. № 1. P. 46–60.
  16. González M.E. The HIV-1 Vpr Protein: A Multifaceted Target for Therapeutic Intervention // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. № 1. P. 126.
  17. Donahue J.P., Vetter M.L., Mukhtar N.A., D'Aquila R.T. The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation // *Virology.* 2008.
  18. Ramdas P., Sahu A.K., Mishra T., Bhardwaj V., Chande A. From Entry to Egress: Strategic Exploitation of the Cellular Processes by HIV-1 // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11. P. 559792.
  19. Levy N., Eiler S., Pradeau-Aubret K., Mason S., Ruff M., Fiorini F., Heyman T., Mély Y., Frugier M. Structural and functional studies of the HIV-1 pre-integration complex // *Retrovirology.* 2013. Vol. 10. Suppl 1. P. P76.
  20. Knyazhanskaya E., Anisenko A., Shadrina O., Kalinina A., Zatsepin T., Mazurov D., Gottikh M. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase // *Retrovirology.* 2019. Vol. 16. P. 30–45.

- 
21. Van Lint C., Bouchat S., Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update // *Retrovirology*. 2013. Vol. 10. P. 67.
  22. Colin L., Verdin E., Van Lint C. HIV-1 chromatin, transcription, and the regulatory protein Tat // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1087. P. 85–101.
  23. Karn J., Stoltzfus C.M. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression // *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012. Vol. 2. № 2. P. a006916.
  24. Stoltzfus C.M. Chapter 1 Regulation of HIV-1 Alternative RNA Splicing and Its Role in Virus Replication // *Adv. Virus Res.* 2009. Vol. 74. P. 1–40.
  25. Frankel A.D., Young J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. Vol. 67. P. 1–25.
  26. Neil S., Zang T., Bieniasz P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu // *Nature*. 2008.
  27. de Silva S., Wu L. TRIM5 acts as more than a retroviral restriction factor // *Viruses*. 2011.
  28. Coakley E., Petropoulos C.J., Whitcomb J.M. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2005. Vol. 18. № 1. P. 9–15.
  29. Wu H., Kwong P.D., Hendrickson W.A. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4 // *Nature*. 1997. Vol. 387. № 6632. P. 527–530.
  30. Di Marino D., Conflitti P., Motta S., Limongelli V. Structural basis of dimerization of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 // *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14. № 1. P. 6439.
  31. Debnath B., Xu S., Grande F., Garofalo A., Neamati N. Small molecule inhibitors of CXCR4 // *Theranostics*. 2013. Vol. 3. № 1. P. 47–75.
  32. Chen B. Molecular Mechanism of HIV-1 Entry // *Trends Microbiol.* 2019. Vol. 27. № 10. P. 878–891.
  33. Weissenhorn W., Dessen A., Harrison S.C., Skehel J.J., Wiley D.C. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 // *Nature*. 1997. Vol. 387. № 6630. P. 426–430.



- 
34. Kwong P.D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J., and Hendrickson W.A. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody // *Nature*. 1998. Vol. 393. № 6686. P. 648–659.
35. Moebius U., Clayton L.K., Abraham S., Harrison S.C., and Reinherz E.L. The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high-resolution CD4 atomic structure // *J. Exp. Med.*. 1992. Vol. 176. № 2. P. 507–517.
36. Brand D., Srinivasan K., and Sodroski J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein // *J. Virol.*. 1995. Vol. 69. № 1. P. 166–171.
37. Wilen C.B., Tilton J.C., and Doms R.W. HIV: cell binding and entry // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. Vol. 2. № 8. P. a006866.
38. Brandenburg O.F., Magnus C., Regoes R.R., and Trkola A. The HIV-1 Entry Process: A Stoichiometric View // *Trends Microbiol*. 2015. Vol. 23. № 12. P. 763–774.
39. Laumaea A., Smith A.B. III, Sodroski J., and Finzi A. Opening the HIV envelope: potential of CD4 mimics as multifunctional HIV entry inhibitors // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2020. Vol. 15. № 5. P. 300–308.
40. Schader S., Colby-Germinario P., Quashie P., Oliveira M., Ibanescu R., Moisi D., Mesplède T., Wainberg M. HIV gp120 H375 is unique to HIV-1 subtype CRF01\_AE and confers strong resistance to the entry inhibitor BMS-599793, a candidate microbicide drug // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. Vol. 56. № 8. P. 4257–4267.
41. Prévost J., Tolbert W., Medjahed H., Sherburn R., Madani N., Zoubchenok D., Gendron-Lepage G., Gaffney A., Grenier M., Kirk S., Vergara N., Han C., Mann B., Chénine A., Ahmed A., Chaiken I., Kirchhoff F., Hahn B., Haim H., Abrams C., Smith A., Sodroski J., Pazgier M., Finzi A. The HIV-1 Env gp120 Inner Domain Shapes the Phe43 Cavity and the CD4 Binding Site // *mBio*. 2020. Vol. 11. № 3. P. e00280-20.

- 
42. Cormier E.G., Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor // *J Virol*. 2002. Vol. 76. № 17. P. 8953-7.
43. Das D., Maeda K., Hayashi Y., Gavande N., Desai D., Chang S., Ghosh A., Mitsuya H. Insights into the mechanism of inhibition of CXCR4: identification of Piperidinylethanamine analogs as anti-HIV-1 inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. Vol. 59. № 4. P. 1895-904.
44. Rizzuto C., Sodroski J. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 // *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000. Vol. 16. № 8. P. 741-9.
45. Hartley O., Klasse P.J., Sattentau Q.J., Moore J.P. V3: HIV's switch-hitter // *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005. Vol. 21. № 2. P. 171-89.
46. Huang C.C., Tang M., Zhang M.Y., Majeed S., Montabana E., Stanfield R.L., Dimitrov D.S., Korber B., Sodroski J., Wilson I.A., Wyatt R., Kwong P.D. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core // *Science*. 2005. Vol. 310. № 5750. P. 1025–1028.
47. Shaik M.M., Peng H., Lu J., et al. Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike // *Nature*. 2019. Vol. 565. P. 318–323.
48. Mostashari Rad T., Saghaie L., and Fassihi A. HIV-1 entry inhibitors: A review of experimental and computational studies // *Chem. Biodivers*. 2018. Vol. 15. № 10. P. e1800159.
49. Xiao T., Cai Y., and Chen B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors // *Viruses*. 2021. Vol. 13. № 5. P. 735.
50. Nuwagaba J., Li J.A., Ngo B., and Sutton R.E. 30 years of HIV therapy: Current and future antiviral drug targets // *Virology*. 2025. Vol. 603. P. 110362.
51. Peng Y., Zong Y., Wang D., et al. Current drugs for HIV-1: from challenges to potential in HIV/AIDS // *Front. Pharmacol.*. 2023. Vol. 14. P. 1294966.
52. Xue S., Xu W., Wang L., et al. Rational Design of Sulfonyl- $\gamma$ -AApeptides as Highly Potent HIV-1 Fusion Inhibitors with Broad-Spectrum Activity // *J. Med. Chem*. 2023. Vol. 66. № 18. P. 13319–13331.

- 
53. Xu W., Cong Z., Duan Q., et al. A Protein-Based, Long-Acting HIV-1 Fusion Inhibitor with an Improved Pharmacokinetic Profile // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022. Vol. 15. № 4. P. 424.
54. Bracq L., Xie M., Benichou S., Bouchet J. Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1 // *Front Immunol*. 2018. Vol. 9. P. 260.
55. Blumenthal R., Durell S., and Viard M. HIV entry and envelope glycoprotein-mediated fusion // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287. № 49. P. 40841–40849.
56. Gorai B., Sahoo A.K., Srivastava A., Dixit N.M., and Maiti P.K. Concerted Interactions between Multiple gp41 Trimers and the Target Cell Lipidome May Be Required for HIV-1 Entry // *J. Chem. Inf. Model*. 2021. Vol. 61. № 1. P. 444–454.
57. Ono A., Orenstein J.M., and Freed E.O. Role of the gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly // *J. Virol*. 2000. Vol. 74. № 6. P. 2855–2866.
58. Matthews S., Barlow P., Boyd J. Structural similarity between the p17 matrix protein of HIV-1 and interferon- $\gamma$  // *Nature*. 1994. Vol. 370. P. 666–668.
59. Hill C.P., Worthylake D., Bancroft D.P., Christensen A.M., and Sundquist W.I. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*. 1996. Vol. 93. № 7. P. 3099–3104.
60. Saad J.S., Miller J., Tai J., Kim A., Ghanam R.H., and Summers M.F. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*. 2006. Vol. 103. № 30. P. 11364–11369.
61. Chukkapalli V., Hogue I.B., Boyko V., Hu W.S., and Ono A. Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding // *J. Virol*. 2008. Vol. 82. № 5. P. 2405–2417.
62. Haffar O., Popov S., Dubrovsky L., Agostini I., Tang H., Pushkarsky T., Nadler S. G., Bukrinsky M. Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate

---

nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex // J. mol biol. 2000. Vol. 299. № 2. P. 359–368.

63. Bukrinskaia A., Vorkunova G., Tentsov I. HIV-1 p17 matrix protein is transported into the cell nucleus and binds with genomic viral RNA // Mol Biol (Mosk). 1993. Vol. 27. № 1. P. 49-57.

64. Fouchier R., Meyer B., Simon J., Fischer U., Malim M. HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import // EMBO J. 1997. Vol. 16. № 15. P. 4531-4539.

65. Mannioui A., Nelson E., Schiffer C., Felix N., Le Rouzic E., Benichou S., Gluckman J., Canque B. HIV-1 KK26-27 matrix mutants display impaired infectivity, circularization and integration but not nuclear import // Virology. 2005. Vol. 339. P. 21–30.

66. Kaushik R., Ratner L. Role of HIV-1 matrix phosphorylation in an early postentry step of virus replication // J. Virol. 2004. Vol. 78. P. 2319–2326.

67. Bukrinsky M. A hard way to the nucleus // Mol Med. 2004. Vol. 10. P. 1-5.

68. Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L., Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap // Cell. 2000. Vol. 101. № 2. P. 173-185.

69. Giroud C., Chazal N., Briant L. Cellular kinases incorporated into HIV-1 particles: passive or active passengers? // Retrovirology. 2011. Vol. 8. P. 71.

70. Ono A., Freed E. Cell-type dependent targeting of HIV-1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body // J. Virol. 2004. Vol. 78. P. 1552–1563.

71. Vlach J., Samal A., Saad J. Solution structure of calmodulin bound to the binding domain of the HIV-1 matrix protein // J Biol Chem. 2014. Vol. 289 №12. P. 8697–8705.

72. Dick, A., Cocklin, S. Subtype Differences in the Interaction of HIV-1 Matrix with Calmodulin // Biomolecules. 2021. Vol. 11. №9. P. 1294.

- 
73. Gaines C., Tkacik E., Rivera-Oven A., Somani P., Achimovich A., Alabi T., Zhu A., Getachew N., Yang A., McDonough M., Hawkins T., Spadaro Z., Summers M. HIV-1 Matrix Protein Interactions with tRNA: Implications for Membrane Targeting // *J Mol Biol.* 2018. Vol. 430. №14. P. 2113-2127.
74. Bou-Nader C., Muecksch F., Brown J., Gordon J., York A., Peng C., Ghirlando R., Summers M., Bieniasz P., Zhang J. HIV-1 matrix-tRNA complex structure reveals basis for host control of Gag localization // *Cell Host Microbe.* 2021. Vol. 29. № 9. P. 1421–1436.e7.
75. Lama J., Trono D. Human immunodeficiency virus type 1 matrix protein interacts with cellular protein HO3 // *J Virol.* 1998. Vol. 72. № 2. P. 1671-1676.
76. Shen Q., Wu C., Freniere C., Tripler T.N., and Xiong Y. Nuclear Import of HIV-1 // *Viruses.* 2021. Vol. 13. № 11. P. 2242.
77. Dharan A. and Campbell E.M. Teaching old dogmas new tricks: Recent insights into the nuclear import of HIV-1 // *Curr. Opin. Virol.* 2022. Vol. 53. P. 101203.
78. Mamede J.I., Cianci G.C., Anderson M.R., and Hope T.J. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. Vol. 114. № 31. P. E7169–E7178.
79. Francis A.C., Marin M., Shi J., Aiken C., and Melikyan G.B. Time-Resolved Imaging of Single HIV-1 Uncoating In Vitro and in Living Cells // *PLOS Pathog.* 2016. Vol. 12. № 6. P. e1005709.
80. Francis A.C., Melikyan G.B. Single HIV-1 Imaging Reveals Progression of Infection through CA-Dependent Steps of Docking at the Nuclear Pore, Uncoating, and Nuclear Transport // *Cell Host Microbe.* 2018. Vol. 23. № 4. P. 536–548.e6.
81. Burdick R.C., Li C., Munshi M.H., Rawson J.M.O., Nagashima K., Hu W.S., and Pathak V.K. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. Vol. 117. № 10. P. 5486–5493.
82. Li C., Burdick R.C., Nagashima K., Hu W.S., and Pathak V.K. HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. Vol. 118. № 13. P. e2019467118.

- 
83. Dharan A., Bachmann N., Talley S., Zwickelmaier V., and Campbell E.M. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus // *Nat. Microbiol.* 2020. Vol. 5. № 9. P. 1088–1095.
84. Selyutina A., Persaud M., Lee K., KewalRamani V., and Diaz-Griffero F. Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating // *Cell Rep.* 2020. Vol. 32. № 7. P. 108201.
85. Zila V., Margiotto E., Turoňová B., Müller T.G., Zimmerli C.E., Mattei S., Allegretti M., Börner K., Rada J., Müller B., et al. Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores // *Cell.* 2021. Vol. 184. № 4. P. 1032–1046.e18.
86. Müller T.G., Zila V., Peters K., Schifferdecker S., Stanic M., Lucic B., Laketa V., Lusic M., Müller B., and Kräusslich H.G. HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells // *Elife.* 2021. Vol. 10. P. e64776.
87. Biomedcentral: official cite. URL: <https://www.biomedcentral.com/collections/capsid-hiv/> (дата обращения: 20.08.2025).
88. Frankel D.H. Structure of HIV p24 capsid protein revealed // *The Lancet.* 1996. Vol. 348. № 9021. P. 184.
89. Sato Y., Matsugami A., Watanabe S., Hayashi F., Arai M., Kigawa T., and Nishimura C. Changes in dynamic and static structures of the HIV-1 p24 capsid protein N-domain caused by amino-acid substitution are associated with its viral viability // *Protein Sci.* 2021. Vol. 30. № 11. P. 2233–2245.
90. Pornillos O., Ganser-Pornillos B.K., Kelly B.N., et al. X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid // *Cell.* 2009. Vol. 137. № 7. P. 1282–1292.
91. Malikov V., da Silva E.S., Jovasevic V., Bennett G., de Souza Aranha Vieira D.A., Schulte B., Diaz-Griffero F., Walsh D., and Naghavi M.H. HIV-1 capsids bind and exploit the kinesin-1 adaptor FEZ1 for inward movement to the nucleus // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 6660.
92. Chua J.J., Butkevich E., Warseck J.M., Kittelmann M., Grønborg M., Behrmann E., Stelzl U., Pavlos N.J., Lalowski M.M., Eimer S., et al. Phosphorylation-regulated axonal

---

dependent transport of syntaxin 1 is mediated by a Kinesin-1 adaptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. Vol. 109. P. 5862–5867.

93. Malikov V. and Naghavi M.H. Localized Phosphorylation of a Kinesin-1 Adaptor by a Capsid-Associated Kinase Regulates HIV-1 Motility and Uncoating // *Cell Rep*. 2017. Vol. 20. P. 2792–2799.

94. Dharan A., Opp S., Abdel-Rahim O., Keceli S.K., Imam S., Diaz-Griffero F., and Campbell E.M. Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. Vol. 114. P. E10707–E10716.

95. Carnes S.K., Zhou J., and Aiken C. HIV-1 Engages a Dynein-Dynactin-BICD2 Complex for Infection and Transport to the Nucleus // *J. Virol*. 2018. Vol. 92. P. 10–1128.

96. Dickson C.F., Hertel S., Tuckwell A.J., et al. The HIV capsid mimics karyopherin engagement of FG-nucleoporins // *Nature*. 2024. Vol. 626. № 8000. P. 836–842.

97. Kane M., Rebensburg S.V., Takata M.A., et al. Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2 // *Elife*. 2018. Vol. 7. P. e35738.

98. Eriksson S., Graf E.H., Dahl V., et al. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies // *PLoS Pathog*. 2013. Vol. 9. № 2. P. e1003174.

99. Xue G., Yu H.J., Buffone C., et al. The HIV-1 capsid core is an opportunistic nuclear import receptor // *Nat. Commun*. 2023. Vol. 14. P. 3782.

100. Schaller T., Ocwieja K.E., Rasaiyaah J., Price A.J., Brady T.L., Roth S.L., Hue S., Fletcher A.J., Lee K., KewalRamani V.N., et al. HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency // *PLoS Pathog*. 2011. Vol. 7. P. e1002439.

101. Bichel K., Price A.J., Schaller T., Towers G.J., Freund S.M., and James L.C. HIV-1 capsid undergoes coupled binding and isomerization by the nuclear pore protein NUP358 // *Retrovirology*. 2013. Vol. 10. P. 81.

- 
102. Xie L., Chen L., Zhong C., et al. MxB impedes the NUP358-mediated HIV-1 pre-integration complex nuclear import and viral replication cooperatively with CPSF6 // *Retrovirology*. 2020. Vol. 17. P. 16.
103. Liu C., Perilla J., Ning J., et al. Cyclophilin A stabilizes the HIV-1 capsid through a novel non-canonical binding site // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 10714.
104. Dettwiler S., Aringhieri C., Cardinale S., Keller W., Barabino S. Distinct sequence motifs within the 68-kDa subunit of cleavage factor Im mediate RNA binding, protein-protein interactions, and subcellular localization // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279 № 34 P. 35788-35797.
105. Sowd G., Serrao E., Wang H., et al. A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. Vol. 113. № 8. P. E1054-E1063.
106. Zhong Z., Ning J., Boggs E., Jang S., Wallace C., Telmer C., Bruchez M., Ahn J., Engelman A., Zhang P., Watkins S., Ambrose Z. Cytoplasmic CPSF6 Regulates HIV-1 Capsid Trafficking and Infection in a Cyclophilin A-Dependent Manner // *mBio*. 2021. Vol. 12. №2. P. e03142-20.
107. Ning J., Zhong Z., Fischer D., et al. Truncated CPSF6 Forms Higher-Order Complexes That Bind and Disrupt HIV-1 Capsid // *J Virol*. 2018. Vol. 92. №13. P. e00368-18.
108. Rebensburg S., Wei G., Larue R., et al. Sec24C is an HIV-1 host dependency factor crucial for virus replication // *Nat Microbiol*. 2021. Vol. 6. №4. P. 435-444.
109. McArthur C., Gallazzi F., Quinn T., Singh K. HIV Capsid Inhibitors Beyond PF74 // *Diseases*. 2019. Vol. 7. № 4. P. 56.
110. Bester S., Wei G., Zhao H., et al. Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor // *Science*. 2020. Vol. 370. №6514. P. 360-364.
111. Gupta S., Berhe M., Crofoot G., 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.



- 
112. Margot N., Vanderveen L., Naik V., et al. Phenotypic resistance to lenacapavir and monotherapy efficacy in a proof-of-concept clinical study // *J. Antimicrob. Chemother.* 2022. Vol. 77. № 4. P. 989–995.
113. Bester S.M., Adu-Ampratwum D., Annamalai A.S., et al. Structural and Mechanistic Bases of Viral Resistance to HIV-1 Capsid Inhibitor Lenacapavir // *mBio.* 2022. Vol. 13. № 5. P. e0180422.
114. Sarafianos S.G., Marchand B., Das K., 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.
115. Larder B.A., Purifoy D.J., Powell K.L., and Darby G. Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase // *Nature.* 1987. Vol. 327. № 6124. P. 716–717.
116. Boyer P.L., Ferris A.L., and Hughes S.H. Mutational analysis of the fingers domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase // *J. Virol.* 1992. Vol. 66. № 12. P. 7533–7537.
117. Kleiman L. tRNA(Lys3): the primer tRNA for reverse transcription in HIV-1 // *IUBMB Life.* 2002. Vol. 53. P. 107–114.
118. Engelman A. Isolation and analysis of HIV-1 preintegration complexes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 485. P. 135–149.
119. Meyerhans A., Breinig T., Vartanian J.P., and Wain-Hobson S. Forms and function of intracellular HIV DNA // *HIV Sequence Compendium.* 2004. Vol. 14.
120. Brussel A. and Sonigo P. Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species // *J. Virol.* 2004. Vol. 78. P. 11263–11271.
121. Wu Y. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA // *Retrovirology.* 2004. Vol. 1. P. 1–10.
- 11271.
122. Gurgo C., Fenizia C., McKinnon K., Hsia R.C., and Franchini G. Expression of HIV from a 1-LTR circular DNA in the absence of integration // *Retrovirology.* 2025. Vol. 22. № 1. P. 2.

- 
123. El Safadi Y., Vivet-Boudou V., Marquet R. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. Vol. 75. № 4. P. 723-737.
124. Valuev-Elliston V., Kochetkov S. Novel HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors: A Combinatorial Approach // *Biochemistry (Mosc).* 2017. Vol. 82. № 13. P. 1716-1743.
125. Warren K., Wei T., Li D., Qin F., Warrilow D., Lin M., Sivakumaran H., Apolloni A., Abbott C.M., Jones A., Anderson J.L., and Harrich D. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109. № 24. P. 9587–9592.
126. Li D., Wei T., Jin H., et al. Binding of the eukaryotic translation elongation factor 1A with the 5'UTR of HIV-1 genomic RNA is important for reverse transcription // *Virology*. 2015. Vol. 52. P. 118.
127. Rawle D., Li D., Wu Z., et al. Oxazole-Benzenesulfonamide Derivatives Inhibit HIV-1 Reverse Transcriptase Interaction with Cellular eEF1A and Reduce Viral Replication // *J Virol.* 2019. Vol. 93. № 12. P. e00239-19.
128. Giroud C., Chazal N., Gay B., Eldin P., Brun S., and Briant L. HIV-1-associated PKA acts as a cofactor for genome reverse transcription // *Retrovirology*. 2013. Vol. 10. P. 157.
129. Lemay J., Maidou-Peindara P., Cancio R., et al. AKAP149 binds to HIV-1 reverse transcriptase and is involved in the reverse transcription // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 383. № 4. P. 783–796.
130. Engelman A., Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights // *Nat Rev Microbiol.* 2012. Vol. 10. № 4. P. 279-290.
131. Ballandras-Colas A., Maskell D.P., Serrao E., et al. A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration // *Science*. 2017. Vol. 355. № 6320. P. 93–95.
132. Bukrinsky M.I., Sharova N., Dempsey M.P., Stanwick T.L., Bukrinskaya A.G., Haggerty S., and Stevenson M. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89. P. 6580–6584.

- 
133. Mbhele N., Chimukangara B., Gordon M. HIV-1 integrase strand transfer inhibitors: a review of current drugs, recent advances and drug resistance // *Int J Antimicrob Agents*. 2021. Vol. 57. № 5. P. 106343.
134. Pant A., Chikhale R., Menghani S., Khedekar P. LEDGF/p75 IN interaction inhibitors: in silico studies of an old target with novel approach // *BMC Infect Dis*. 2014 Vol. 14. Suppl 3. P. 18.
135. Hare S., Cherepanov P. The Interaction Between Lentiviral Integrase and LEDGF: Structural and Functional Insights // *Viruses*. 2009. Vol. 1. №. 3. P. 780-801. doi: 10.3390/v1030780.
136. Tsiang M., Jones G., Niedziela-Majka A., Kan E., Lansdon E., Huang W., Hung M., Samuel D., Novikov N., Xu Y., Mitchell M., Guo H., Babaoglu K., Liu X., Geleziunas R., Sakowicz R. New class of HIV-1 integrase (IN) inhibitors with a dual mode of action // *J Biol Chem*. 2012. Vol. 287. № 25. P. 21189–21203.
137. Skalka A.M. and Katz R.A. Retroviral DNA integration and the DNA damage response // *Cell Death Differ*. 2005. Vol. 12. Suppl 1. P. 971–978.
138. Daniel R., et al. A Role for DNA-PK in Retroviral DNA Integration // *Science*. 1999. Vol. 284. № 5414. P. 644–647.
139. Anisenko A.N., Knyazhanskaya E.S., Zalevsky A.O., 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.
140. Ilgova E., Galkin S., Khrenova M., Serebryakova M., Gottikh M., and Anisenko A. 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
141. Anisenko A., Galkin S., Mikhaylov A.A., Khrenova M.G., Agapkina Y., Korolev S., Garkul L., Shirokova V., Ikonnikova V.A., Korlyukov 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.
142. Anisenko A.N., Nefedova A.A., Kireev I.I., and Gottikh M.B. Post-Integrational DNA Repair of HIV-1 Is Associated with the Activation of DNA-PK and ATM Cellular

---

Protein Kinases and Phosphorylation of Their Targets // Biokhimiya [Biochemistry (Moscow)]. 2024. Vol. 89. № 6. P. 1117–1128.

143. Yadav P., Sur S., Desai D., et al. Interaction of HIV-1 integrase with polypyrimidine tract binding protein and associated splicing factor (PSF) and its impact on HIV-1 replication // Retrovirology. 2019. Vol. 16. P. 12.

144. Knott G.J., Bond C.S., Fox A.H. The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44. № 9. P. 3989–4004.

145. Knott G.J., Lee M., Passon D.M., Fox A.H., and Bond C.S. Caenorhabditis elegans NONO-1: Insights into DBHS protein structure, architecture and function // Protein Sci. 2015. Vol. 24. P. 2033–2043.

146. Dong B., Horowitz D.S., Kobayashi R., and Krainer A.R. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6 // Nucleic Acids Res. 1993. Vol. 21. P. 4085–4092.

147. Patton J.G., Porro E.B., Galceran J., Tempst P., and Nadal-Ginard B. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor // Genes Dev. 1993. Vol. 7. № 3. P. 393–406.

148. Gozani O., Patton J.G., and Reed R. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction // EMBO J. 1994. Vol. 13. P. 3356–3367.

149. Zhang Z. and Carmichael G.G. The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs // Cell. 2001. Vol. 106. P. 465–475.

150. Mathur M., Tucker P., Samuels H. PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors // Mol Cell Biol. 2001. Vol. 21. № 7. № 2298-2311.

151. Sewer M.B., Nguyen V.Q., Huang C.J., Tucker P.W., Kagawa N., and Waterman M.R. Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells

---

depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription // *Endocrinology*. 2002. Vol. 143. № 4. P. 1280–1290.

152. Straub T., Knudsen B.R., and Boege F. PSF/p54(nrb) stimulates 'jumping' of DNA topoisomerase I between separate DNA helices // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. P. 7552–7558.

153. Udayakumar D. and 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.

154. Jaafar L., Li Z., Li S., and Dynan W.S. SFPQ·NONO and XLF function separately and together to promote DNA double-strand break repair via canonical nonhomologous end joining // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45. № 3. P. 1848–1859.

155. Bladen C.L., Udayakumar D., Takeda Y., and Dynan W.S. Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280. № 7. P. 5205–5210.

156. Ha K., Takeda Y., and Dynan W.S. Sequences in PSF/SFPQ mediate radioresistance and recruitment of PSF/SFPQ-containing complexes to DNA damage sites in human cells // *DNA Repair (Amst)*. 2011. Vol. 10. № 2. P. 252–259.

157. Li S., Kuhne W.W., Kulharya A., Hudson F.Z., Ha K., Cao Z., and Dynan W.S. Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. № 20. P. 6746–6753.

158. Passon D.M., Lee M., and Rackham O. Structure of the heterodimer of human NONO and paraspeckle protein component 1 and analysis of its role in subnuclear body formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Vol. 109. № 13. P. 4846–4850.

159. Morchikh M., Cribier A., Raffel R., et al. HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response // *Mol. Cell*. 2017. Vol. 67. № 3. P. 387–399.

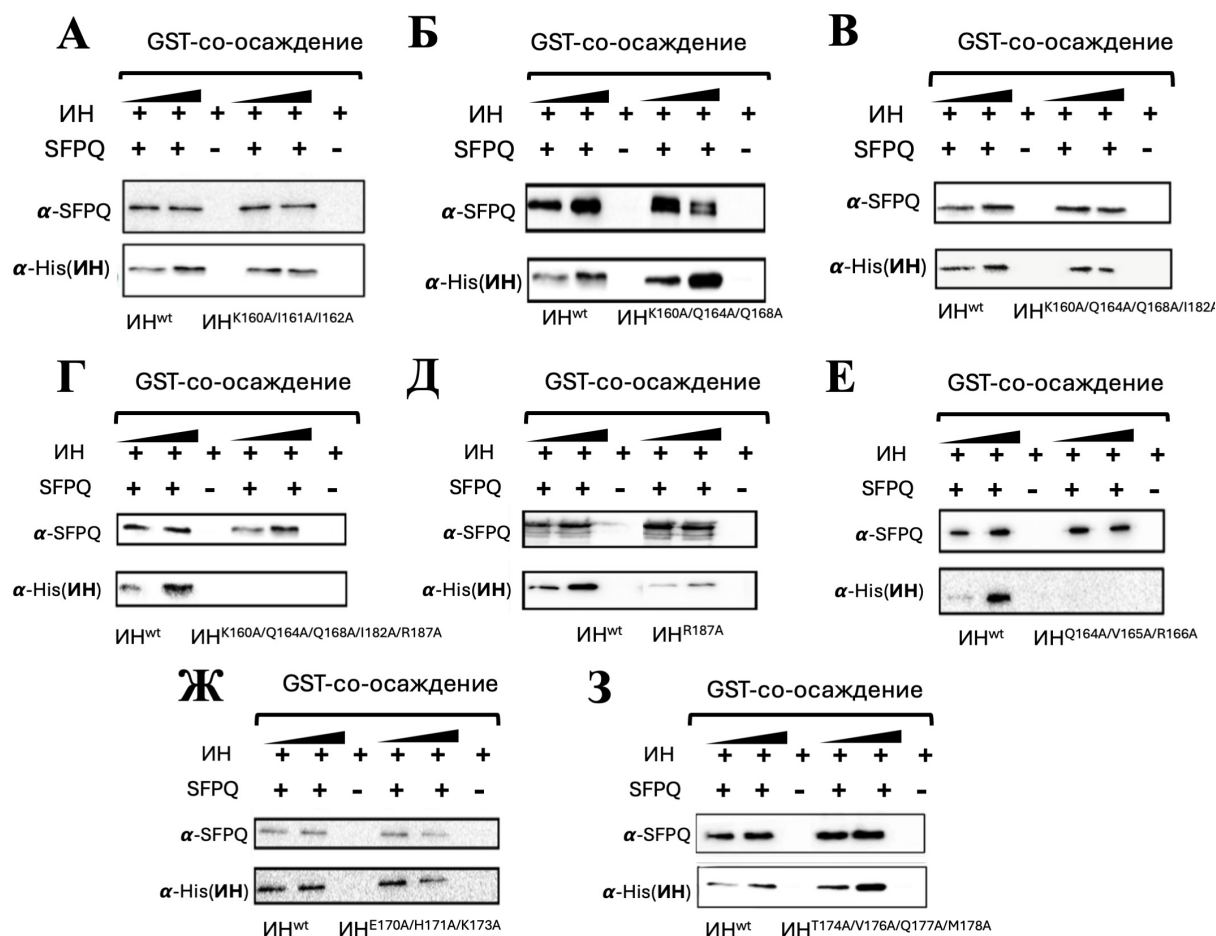
- 
160. Spagnolo L., Rivera-Calzada A., Pearl L.H., and Llorca O. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair // *Mol. Cell*. 2006. Vol. 22. № 4. P. 511–519.
161. Raghavendra N.K., Shkriabai N., Graham R.L.J., Hess S., Kvaratskhelia M., and Wu L. Identification of host proteins associated with HIV-1 preintegration complexes isolated from infected CD4<sup>+</sup> cells // *Retrovirology*. 2010. Vol. 7. P. 66
162. Schweitzer C.J., Jagadish T., Haverland N., Ciborowski P., and Belshan M. Proteomic analysis of early HIV-1 nucleoprotein complexes // *J. Proteome Res*. 2013. Vol. 12. № 2. P. 559–572.
163. St Gelais C., Roger J., and Wu L. Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein Negatively Regulates HIV-1 Infection in CD4(+) T Cells // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015. Vol. 31. № 8. P. 806–816.
164. Lahaye X., Gentili M., Silvin A., Conrad C., Picard L., Jouve M., Zueva E., Maurin M., Nadalin F., Knott G.J., Zhao B., Du F., Rio M., Amiel J., Fox A.H., Li P., Etienne L., Bond C.S., Colleaux L., and Manel N. NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation // *Cell*. 2018. Vol. 175. № 2. P. 488–501.e22.
165. Komissarov V.V., Knyazhanskaya E.S., and Atrokhova A.V. The search of novel inhibitors of HIV-1 integrase among 5-(4-halogenophenyl)-5-oxopentyl derivatives of nucleic bases // *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2014. Vol. 40. P. 532–540.
166. Lyupina Y.V., et al. Proteomics of the 26S proteasome in *Spodoptera frugiperda* cells infected with the nucleopolyhedrovirus AcMNPV // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1864. № 6. P. 738–746.
167. Kingston R., Chen C., Okayama H. Calcium phosphate transfection. // *Curr Protoc Immunol*. 2001 C.10: U.10.13.
- 168 Vandergeeten C. and Fromentin R. Cross-clade ultrasensitive PCR-based assays to measure HIV persistence in large-cohort studies // *J. Virol*. 2014. Vol. 88. № 21. P. 85–96.

- 
169. Anisenko A.N., Knyazhanskaya E.S., Isaguliants M.G., and Gottikh M.B. A qPCR assay for measuring the post-integrational DNA repair in HIV-1 replication // *J. Virol. Methods*. 2018. Vol. 262. P. 12–19.
170. Shadrina O.A., Zatsepin T.S., Agapkina Yu.Yu., Isaguliants M.G., and Gottikh M.B. Influence of drug resistance mutations on the activity of HIV-1 sub types A and B integrases: a comparative study // *Acta Naturae*. 2015. Vol. 7. № 1. P. 78–86.
171. Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G., Lloyd P., and Derse D. 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.
172. Limón A., Devroe E., Lu R., Ghory H.Z., Silver P.A., and Engelman A. Nuclear Localization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes (PICs): V165A and R166A Are Pleiotropic Integrase Mutants Primarily Defective for Integration, Not PIC Nuclear Import // *J. Virol.*. 2002. Vol. 76. № 21. P. 10598–10607.
173. Elliott J.L., Eschbach J.E., Koneru P.C., et al. Integrase-RNA interactions underscore the critical role of integrase in HIV-1 virion morphogenesis // *Elife*. 2020. Vol. 9. P. e54311.
174. Kessl J.J., Kutluay S.B., Townsend D., Rebensburg S., Slaughter A., Larue R.C., Shkriabai N., Bakouche N., Fuchs J.R., Bieniasz P.D., and Kvaratskhelia M. HIV-1 integrase binds the viral RNA genome and is essential during virion morphogenesis // *Cell*. 2016. Vol. 166. № 5. P. 1257–1268.e12.
175. Takahata T., Takeda E., Tobiume M., et al. Critical Contribution of Tyr15 in the HIV-1 Integrase (IN) in Facilitating IN Assembly and Nonenzymatic Function through the IN Precursor Form with Reverse Transcriptase // *J. Virol*. 2016. Vol. 91. № 1. P. e02003-16.
176. Passos D.O., Li M., Yang R., et al. Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome // *Science*. 2017. Vol. 355. № 6320. P. 89–92.
177. Passos D.O., Li M., Yang R., Rebensburg S.V., Ghirlando R., Jeon Y., et al. Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome // *Science*. 2017. Vol. 355. № 6320. P. 89–92.

- 
178. Thandapani P., O'Connor T.R., Bailey T.L., and Richard S. Defining the RGG/RG Motif // *Mol. Cell*. 2013. Vol. 50. № 5. P. 613–623.
179. Bhargava R., Sandhu M., Muk S., Lee G., Vaidehi N., and Stark J.M. C-NHEJ without indels is robust and requires synergistic function of distinct XLF domains // *Nat. Commun*. 2018. Vol. 9. № 1. P. 2484.



## VIII. ПРИЛОЖЕНИЕ



**Приложение 1.** Анализ связывания точечных мутантов ИН ВИЧ-1 с GST-SFPQ. А) Анализ взаимодействия ИН K160A/I161A/I162A; Б) Анализ взаимодействия ИН K160A/I161A/I162A; В) Анализ взаимодействия ИН K160A/Q164A/Q168A/I182A; Г) Анализ взаимодействия ИН K160A/Q164A/Q168A/I182A/R187A; Д) Анализ взаимодействия ИН R187A; Е) Анализ взаимодействия ИН Q164A/V165A/R166A; Ж) Анализ взаимодействия ИН E170A/H171A/K173A; З) Анализ взаимодействия ИН T174A/V176A/Q177A/M178A