

МГУ имени М.В. Ломоносова

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени  
А.Н.Белозерского

№ госрегистрации  
АААА-А17-117120820044-4

УТВЕРЖДАЮ  
Директор/декан

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ г.

УДК  
577.1 Химические основы жизни. Биохимия и биорганическая химия.  
Общие вопросы

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Структура и функции биологических макромолекул и макромолекулярных  
комплексов. Биокатализ.

по теме:

Создание нового класса регуляторов активности белков нуклеинового  
обмена - потенциальных биомедицинских препаратов на основе  
модифицированных нуклеиновых кислот  
(промежуточный)

Зам. директора/декана  
по научной работе

\_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ г.

Руководитель темы  
Готтих М.Б.

\_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ г.

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

главный научный сотрудник,  
доктор химических наук, профессор по специальности

\_\_\_\_\_ (Готтих М.Б.)

Исполнители темы:

ведущий научный сотрудник,  
кандидат химических наук, доцент/с.н.с. по специальности

\_\_\_\_\_ (Друца В.Л.)

ведущий специалист

\_\_\_\_\_ (Елкина Д.А.)

ведущий научный сотрудник,  
кандидат химических наук

\_\_\_\_\_ (Королев С.П.)

главный научный сотрудник,  
доктор химических наук, профессор по специальности

\_\_\_\_\_ (Кубарева Е.А.)

инженер 1-ой категории

\_\_\_\_\_ (Мальцева Л.В.)

ведущий научный сотрудник,  
доктор химических наук, профессор по кафедре

\_\_\_\_\_ (Монахова М.В.)

старший научный сотрудник,  
кандидат химических наук

\_\_\_\_\_ (Орецкая Т.С.)

\_\_\_\_\_ (Романова Е.А.)

## РЕФЕРАТ

Ключевые слова:

днк-узнающие белки, модифицированные олигонуклеотиды, ферменты нуклеинового обмена, реакционноспособные группировки, днк-белковые взаимодействия, интегразы, вирус иммунодефицита человека, система репарации неканонических пар нуклеотидов днк, регулирование активности белков

Ключевые слова по-английски:

human immunodeficiency virus, integrase, mmr, modulating of the protein activity, enzymes of nucleic acid metabolism, dna-recognizing proteins, dna-protein interaction, modified oligonucleotides

Основная проблема современной терапии ВИЧ-инфекции - появление устойчивых к лекарствам штаммов вируса, что приводит к необходимости постоянной смены препаратов. Одним из наиболее перспективных подходов к созданию соединений, которые не вызывают появления резистентных штаммов ВИЧ-1 и/или обладают ингибирующей активностью в отношении них, является подход, основанный на подавлении взаимодействия вирусных белков с клеточными белками, необходимыми для успешной репликации вируса. Этот подход еще мало разработан в основном из-за недостаточного знания механизмов взаимодействия вирусных и клеточных белков. Нами установлено, что вирусный фермент интегразы (ИН), который катализирует наиболее важный этап жизненного цикла ВИЧ-1 - интеграцию ДНК-копии вирусного генома в геном инфицированной клетки - взаимодействует с белком Ku70 человека, и это взаимодействие чрезвычайно важно для успешной репарации повреждений клеточного генома, возникающих в результате интеграции. Соответственно, комплекс вирусной ИН и белка Ku70 может рассматриваться в качестве новой мишени для создания анти-ВИЧ препаратов. За отчетный период мы проводили работы по выяснению характера взаимодействия этих белков. Ранее мы показали, что аминокислоты E212 и L213 в составе  $\alpha$ 6-спирали ИН важны для связывания с Ku70, теперь мы определили район в составе Ku70, который вовлечен в связывание интегразы ВИЧ-1, и показали, что замены аминокислот Ku70\_S69A/I72A и Ku70\_S73A/I76A приводят к существенному снижению аффинности Ku70 к ИН. Для поиска ингибиторов взаимодействия этих белков разработан подход, основанный на использовании генетически закодированных флуоресцентных белков, присоединенных к ИН и Ku70. Проверка взаимодействия полученных гибридных белков His6-Ku70-tRFP и GST-mCер-ИН методом Вестерн-блоттинга показала, что устойчивость образуемого ими комплекса сравнима с устойчивостью комплекса исходных ИН и Ku70. Разработанный подход к скринингу ингибиторов может быть реализован не только в классическом варианте, в пробирке, с последующим анализом флуоресценции в геле, но и в высокопроизводительном планшетном формате. Белок Ku70 входит в состав гетеродимера Ku, наиболее изученной функцией которого в клетке является репарация двуцепочечных разрывов в ДНК по механизму негомологичного соединения концов. Гетеродимер Ku связывается с возникающим в результате разрыва концом ДНК и привлекает каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеин киназы (DNA-PKcs), форми-

руя полноразмерный фермент ДНК-зависимую протеин киназу (DNA-ПК), которая фосфорилирует факторы, необходимые для репарации и запускает этот процесс. Однако, при интеграции вирусной ДНК в геном клетки двуцепочечных разрывов не возникает, а образуются одноцепочечные бреши, фланкирующие вновь интегрированную ДНК вируса, а также неспаренные динуклеотиды СА на 5'-концах вирусной ДНК. Тем не менее, по нашим данным, каталитическая активность DNA-ПК необходима для успешной пост-интеграционной репарации ДНК. С целью выяснить, каким образом DNA-ПК может участвовать в репарации повреждений, возникающих в геноме после интеграции в него вирусной ДНК, на базе генома ВИЧ-1 получен набор генетических конструкций для продукции однораундных псевдовирусов, содержащих мутации в составе ИН, которые нарушают один из ранних этапов репликативного цикла ВИЧ-1. Определены временные интервалы протекания всех ранних этапов репликации ВИЧ-1 и установлено, что активация DNA-ПКcs начинается синхронно с интеграцией вирусной ДНК. Таким образом, процесс пост-интеграционной репарации запускается сразу после появления интеграционного интермедиата с повреждениями в ДНК. На основании этих экспериментов сделан вывод, что DNA-ПК участвует в пост-интеграционной репарации по пути, отличному от пути негомологичного объединения концов. Каталитическая субъединица DNA-ПКcs принадлежит к семейству фосфатидилинозитол-3 подобных киназ PI3K, в состав которого также входят ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) и ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein). Все эти киназы являются сенсорами повреждений ДНК и запускают каскад событий, направленных на восстановление целостности ДНК, а также остановку клеточной репликации, преимущественно за счет фосфорилирования широкого спектра мишеней, вовлеченных в эти процессы. Анализ участия в пост-интеграционной репарации ВИЧ-1 киназ ATM и ATR показал, что ATM участвует в этом процессе. Причем, активация ATM также происходит синхронно с интеграцией, и, также, как в случае с DNA-ПК, зависит от взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. Установлено также, что активация DNA-ПКcs и ATM в процессе пост-интеграционной репарации ДНК происходит последовательно. Важность этой работы обусловлена тем, что понимание детального механизма пост-интеграционной репарации ВИЧ-1 будет в дальнейшем способствовать созданию новых анти-ВИЧ препаратов со сниженным риском развития резистентности.

## ВВЕДЕНИЕ

Основная проблема современной терапии ВИЧ-инфекции - появление устойчивых к лекарствам штаммов вируса, что приводит к необходимости постоянной смены препаратов. Для создания соединений, которые не вызывают появления резистентных штаммов ВИЧ-1 и/или обладают ингибирующей активностью в отношении них, предлагаются различные подходы, и одним из наиболее перспективных является подход, основанный на подавлении взаимодействия вирусных белков с клеточными белками-помощниками, необходимыми для успешной репликации вируса. Это новый подход, который еще мало разработан, в первую очередь из-за недостаточного знания механизмов взаимодействия вирусных и клеточных белков. Ранее нами было установлено, что вирусный фермент интегразы (ИН), который катализирует наиболее важный этап жизненного цикла ВИЧ-1 - интеграцию ДНК-копии вирусного генома в геном инфицированной клетки - взаимодействует с белком Ku70 человека, и это взаимодействие чрезвычайно важно для успешной репарации повреждений клеточного генома, возникающих в результате интеграции (Anisenko A.N. et al., *Scientific reports*, 2017, 7:5649., Knyazhanskaya E. et al., *Retrovirology*, 2019, 16(1):30.). Белок Ku70 входит в состав гетеродимера Ku и участвует во многих клеточных процессах, наиболее изученным из которых является репарация двуцепочечных разрывов в ДНК по механизму негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) (Mahaney B.L. et al. *Biochem. J.* 2009; Lee S.H. et al. *Mol. Cell.* 2002). При возникновении разрывов в ДНК гетеродимер Ku связывается с возникающим в результате разрыва концом ДНК и привлекает каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеин киназы (DNA-PKcs), формируя полноразмерный фермент ДНК-зависимую протеин киназу (DNA-PK), которая фосфорилирует факторы, необходимые для репарации и запускает этот процесс. Однако, при интеграции вирусной ДНК в геном клетки двуцепочечных разрывов не возникает: встраивание обоих концов вирусной ДНК идет в комплементарные цепи клеточной ДНК на расстоянии пяти пар нуклеотидов друг от друга, в результате в клеточной ДНК возникают одноцепочечные 5-тинуклеотидные бреши, фланкирующие вновь интегрированную ДНК вируса, а также неспаренные динуклеотиды CA на 5'-концах вирусной ДНК. Тем не менее, по нашим данным, каталитическая активность DNA-PK необходима для успешной пост-интеграционной репарации ДНК. Каким образом DNA-PK может участвовать в репарации этих повреждений непонятно, и именно на этот вопрос мы попытались ответить в нашей работе. Важность этой работы обусловлена тем, что понимание детального механизма пост-интеграционной репарации ВИЧ-1 будет в дальнейшем способствовать созданию новых анти-ВИЧ препаратов со сниженным риском развития резистентности.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Ранее мы показали важность взаимодействия ИН ВИЧ-1 с белком Ku70 для эффективной пост-интеграционной репарации (Knyazhanskaya E. et al., *Retrovirology*, 2019, 16(1):30). Соответственно, комплекс вирусной ИН и белка Ku70 может рассматриваться в качестве новой мишени для создания анти-ВИЧ препаратов. Однако, разработка ингибиторов взаимодействия двух белков невозможна без детального знания структуры сайта их связывания. За отчетный период мы проводили работы по выяснению характера взаимодействия этих белков с целью дальнейшего поиска соединений, способных это взаимодействие блокировать. Мы полагаем, что такие соединения смогут стать основой для нового подхода к терапии ВИЧ-инфекции. Ранее мы показали, что аминокислоты E212 и L213 в составе  $\alpha$ 6-спирали ИН важны для связывания с Ku70; установлено также, что для связывания с ИН важен N-концевой домен Ku70, включающий аминокислотные остатки с 1 по 250 (Anisenko A.N., *Scientific reports*, 2017, 7:5649). Для выявления аминокислотных остатков, важных для связывания ИН, в составе белка Ku70, за отчетный период методом пептидного «фишинга» проводился поиск фрагментов Ku70, образующих прочные комплексы с ИН. Для этого Ku70 подвергался обработке эндопептидазой трипсином, образовавшиеся продукты соосаждались с ИН и связавшиеся с ИН пептиды анализировались на MALDI-TOF масс-спектрометре. Оказалось, что с ИН ВИЧ-1 соосаждались пептид 81-92 а.о. и пептид 47-74 а.о. Анализ структуры белка Ku70 показал, что пептид 81-92 находится внутри глобулярного N-концевого домена и экранирован другими остатками, следовательно, в составе нативного Ku70 он не может взаимодействовать с ИН ВИЧ-1. Соответственно пептид 81-92 из дальнейшего рассмотрения был исключен. Напротив, большая часть аминокислотных остатков пептида 47-74 экспонированы в раствор, следовательно, доступны для связывания с ИН. Для проверки возможного участия отобранного нами пептида Ku70 47-74 во взаимодействии с ИН получены делеционные мутанты Ku70: Ku70\_1-78, Ku70\_1-64, Ku70\_1-44. Проверка способности мутантных вариантов N-концевого домена Ku70 связываться с ИН показала, что мутант Ku70\_1-78, содержащий в своем составе последовательность пептида 47-74, взаимодействует с ИН также, как и весь N-концевой домен Ku70\_1-250. Удаление части исследуемой последовательности (Ku70\_1-64) снижает эффективность взаимодействия с ИН ВИЧ-1 минимум в 4-5 раз, а полное удаление исследуемого фрагмента (Ku70\_1-44) и вовсе не позволяет ИН взаимодействовать с Ku70. Следовательно, идентифицированный нами в ходе пептидного фишинга пептид 47-74 а.о. действительно является минимальным и достаточным фрагментом, необходимым для взаимодействия с ИН ВИЧ-1. Далее нами были получены варианты N-концевого домена Ku70, содержащие замены 2-х аминокислот: Ku70\_Q65A/Q68A, Ku70\_S69A/I72A, Ku70\_S73A/I76A, и мутант Ku70\_delta51-57\_ins\_AG, представляющий собой N-концевой домен Ku70 из которого удалена петля 51-57 и вместо нее встроена последовательность AG для снижения напряженности структуры белка. Проверка способности этих мутантных белков показала, что только замены аминокислот Ku70\_S69A/I72A и Ku70\_S73A/I76A приводят к существенному снижению аффинности Ku70 к ИН. В дальнейшем мы планируем получить точечные мутанты, в которых будет заменена только одна из идентифицированных аминокислот, с тем чтобы точно установить те из них, которые

вовлечены во взаимодействие с ИН ВИЧ-1.

2. Вторым направлением работы была оптимизация системы поиска ингибитора связывания ИН ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70. Для высокопроизводительного скрининга ингибиторов взаимодействия этих белков разработан тест-система, основанная на присоединении флуоресцентных белков mCер и tRFP к концам GST-меченой ИН и His6-меченого Ku70, соответственно. Выбор именно этих флуоресцентных белков осуществлялся исходя из двух критериев: минимальное перекрытие спектров возбуждения и испускания для предотвращения искажений сигналов от FP из-за Förster resonance energy transfer (FRET), а также невозможность образования гетеродимеров между флуоресцентными белками. При дизайне гибридов ИН и Ku70 с флуоресцентными белками мы учитывали ранее полученные данные о том, что в связывании ИН и Ku70 в первую очередь участвует N-концевой домен Ku70 с 1 по 250 а.о. и район с 200 по 220 а.о. ИН. Для того чтобы минимально влиять на взаимодействие ИН и Ku70 мы решили присоединить tRFP на C-конец Ku70, а mCер на N-конец ИН, для чего на базе векторов pET-15b-Ku70 и pGGWA-GST\_IN путем клонирования генов флуоресцентных белков tRFP и mCер были получены бактериальные экспрессионные вектора для продукции His6-Ku70-tRFP и GST-mCер-IN, соответственно. Гибридные белки были выделены и очищены аффинной хроматографией, соответственно, на Ni-NTA-agarose and глутатион-сефарозе. Их чистота составляла 35-45 % для His6-Ku70-tRFP и 80-90 % для GST-mCер-IN. Проверка взаимодействия полученных гибридных белков методом Вестерн-блоттинга показала, что устойчивость образуемого ими комплекса сравнима с устойчивостью комплекса исходных ИН и Ku70. Разработанный нами подход к скринингу ингибиторов связывания флуоресцентно-меченных белков может быть реализован как в высокопроизводительном планшетном формате, так и в классическом варианте, в пробирке, с последующим анализом флуоресценции в геле. Результаты по созданию системы для высокопроизводительного скрининга опубликованы в статье Galkin S. et al. *Biomolecules*, 2020, 10(9):E1236. doi: 10.3390/biom10091236 в журнале из списка Q1.

3. Для детального выяснения важности участия ДНК-зависимой протеинкиназы в процессе пост-интеграционной репарации, получен набор генетических конструкций для продукции однораундных псевдовирусов на базе генома ВИЧ-1, содержащих мутации в составе ИН, которые нарушают один из ранних этапов репликативного цикла ВИЧ-1. С использованием этих генетических конструкций получены и охарактеризованы псевдовirusы. Псевдовirus ВИЧ-1\_E212A/L213A, содержащий мутантную форму ИН с аминокислотными заменами E212A/L213A, демонстрирует нарушения в постинтеграционной репарации ДНК, т.к. такая форма ИН не взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с клеточным белком Ku70. В случае псевдовirusа ВИЧ-1\_E152A нарушена интеграция вирусной ДНК, а в случае ВИЧ-1\_N16C содержимое вириона проникает в цитоплазму, но ни обратная транскрипция, ни интеграция не происходят, поскольку замена N16C в составе ИН нарушает функционирование обратной транскриптазы ВИЧ-1. В качестве контрольных были собраны псевдовirusные частицы ВИЧ-1\_wt с природным вариантом ИН. При трансдукции клеток этим псевдовirusом успешно проходят все ранние этапы репликации ВИЧ-1: обратная транскрипция, интеграция и постинтеграционная репарация ДНК, - что в результате приводит к образованию стабильно интегрированного провirusа. Пре-

параты всех псевдовирюсов были сконцентрированы и для них проведена нормировка по уровню антигена ВИЧ-1 - p24. С помощью ранее опубликованных методов, в том числе разработанного нами (Anisenko A.N. et al., J. Virol. Methods, 2018, 262:12), полученные псевдовирюсные частицы были охарактеризованы. Во всех случаях были определены уровни синтеза тотальной ДНК ВИЧ-1, что соответствует эффективности обратной транскрипции, интегрированной ДНК, что соответствует эффективности интеграции, а также эффективность пост-интеграционной репарации провирюсной ДНК в клетках HEK293T, трансдуцированных нашими псевдовирюсами. Для всех них показано совпадение ожидаемых и реальных нарушений ранних этапов репликации. Эти результаты еще раз убедительно показывают, что образование устойчивого комплекса между ИН ВИЧ-1 и белком Ku человека принципиально важно для успешного протекания пост-интеграционной репарации. Далее с использованием подхода «время добавления лекарства» («time of drug addition») определены временные интервалы протекания обратной транскрипции и интеграции - как референсные процессы в ранних этапах репликации ВИЧ-1. Применение низкомолекулярного специфического ингибитора киназной активности DNA-PKcs позволило определить кинетические параметры активации DNA-PKcs в репликации ВИЧ-1. Установлено, что активация DNA-PKcs начинает происходить синхронно с интеграцией вирусной ДНК. Таким образом, процесс пост-интеграционной репарации запускается сразу после появления интеграционного интермедиата с повреждениями в ДНК. Этот результат важен по следующей причине: долгое время в работах, исследовавших роль DNA-PK в репликации ВИЧ-1, высказывалось предположение, что DNA-PK может принимать участие в репликации на стадии пост-интеграционной репарации провирюсной ДНК только по пути негомологичного объединения концов. Поскольку нерепарированный провирюс не содержит двуцепочечных разрывов, а лишь однонитевые бреши по краям интегрированной ДНК, предполагалось, что двуцепочечные разрывы могут возникать при прохождении репликативной вилки через однонитевые бреши, и уже к этим возникшим двунитевым разрывам привлекается Ku и весь DNA-PK комплекс. Наши данные однозначно демонстрируют, что процесс интеграции и активации DNA-PK неразрывно связаны между собой. Следовательно, DNA-PK участвует в пост-интеграционной репарации по пути, отличному от пути негомологичного объединения концов.

4. Каталитическая субъединица DNA-PKcs принадлежит к семейству фосфатидилинозитол-3 подобных киназ PI3K, в состав которого также входят ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) и ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein). Все эти киназы являются сенсорами повреждений ДНК и запускают каскад событий, направленных на восстановление целостности ДНК, а также остановку клеточной репликации, преимущественно за счет фосфорилирования широкого спектра мишеней, вовлеченных в эти процессы. Для DNA-PK мы провели анализ фосфорилируемых ею мишеней, результаты которого опубликованы в работе Anisenko A.N. et al., Cells. 2020, 9(8):E1907. Структурная организация киназ ATM, ATR и DNA-PKcs очень похожа, однако, их специфичность сильно отличается. ATM и DNA-PKcs активируются в ответ на двуцепочечные разрывы ДНК, но к сайтам повреждений привлекаются разными белковыми комплексами: ATM привлекается к месту повреждения комплексом MRN, а DNA-PKcs - гетеродимером Ku70/Ku80. Долгое время считалось, что эти две киназы направ-

ляют репарацию двуцепочечного разрыва по разным путям: АТМ в комплексе с MRN вызывает репарацию по пути гомологичной рекомбинации (HR), которая возможна исключительно в S и G2 фазе клеточного цикла, поскольку для нее требуется наличие неповрежденной сестринской хроматиды, а DNA-РКс в комплексе с Ku70/Ku80 – по пути негомологичного объединения концов (NHEJ), который может осуществляться на любом этапе клеточного цикла, но менее точен с точки зрения сохранения целостности генетической информации. Работы последних лет демонстрируют, однако, что и АТМ, и DNA-РКс привлекаются к месту двуцепочечного разрыва и регулируют активность друг друга, а выбор механизма репарации (HR или NHEJ) осуществляется не привлеченным к месту репарации белком, а окружением: в активно-транскрибируемых областях генома отдается предпочтение HR, в спящих регионах – NHEJ, даже в S и G2 фазе клеточного цикла. Мы решили изучить, как родственные киназы АТМ и АТР влияют на репликативный цикл ВИЧ-1 в целом и на пост-интеграционную репарацию ВИЧ-1 в частности. Для этого была выбрана стратегия подавления киназных активностей этих ферментов специфичными ингибиторами: Ku55933 для АТМ и AZ20 для АТР. В качестве положительного контроля был выбран ингибитор DNA-РКс – Nu7441, – эффекты которого на репликацию ВИЧ-1 были подробно охарактеризованы ранее (А. Anisenko et al., 2018). Мы определили, что подавление активности АТМ, негативно влияет на эффективность трансдукции псевдовирусом ВИЧ-1<sub>wt</sub>, в то время ингибирование АТР не оказывает никакого влияния на этот процесс. Эффект ингибирования имеет доз-зависимый характер: увеличение концентрации ингибитора DNA-РКс или АТМ приводит к снижению уровня продукции люциферазы светлячка, закодированной в псевдовирусном геноме. Следовательно, в процессе пост-интеграционной репарации участвуют две киназы из семейства PI3K: АТМ и DNA-РКс. Ранее на примере Nu7441 ранее мы показали, что мутантный псевдовиром ВИЧ-1<sub>E212A/L213A</sub>, в составе которого ИН неспособна взаимодействовать с Ku70, нечувствителен к подавлению активности DNA-РКс (Е. Knyazhanskaya et al., 2019). В случае ингибитора АТМ мы обнаружили аналогичные эффекты, т.е. участие АТМ в пост-интеграционной репарации зависит от возможности связывания ИН и Ku70. Иными словами, АТМ вместе с DNA-РКс участвует в пост-интеграционной репарации ВИЧ-1, и для их активации необходимо взаимодействие между ИН и Ku70 – компонентом DNA-РК комплекса. Для подтверждения этого предположения мы оценили влияние ингибиторов этих ферментов на эффективность пост-интеграционной репарации модифицированным вариантом Alu-специфичной ПЦР. В наших условиях ингибитор АТМ, также как и ингибитор DNA-РКс, снижал эффективность пост-интеграционной репарации, но не влиял на уровень тотальной и интегрированной ДНК. Мы также провели эксперимент «time of drug addition» с ингибитором АТМ Ku55933, который продемонстрировал в этом эксперименте полную аналогию с ингибитором DNA-РКс, т.е. активация АТМ и DNA-РКс происходит на ранних этапах пост-интеграционной репарации. Активация и участие обеих киназ в пост-интеграционной репарации ДНК может происходить по независимому пути (параллельная активация), либо активация одного фермента вызывает активацию другого (последовательная активация). Для выяснения путей активации мы провели эксперименты по совместному ингибированию этих ферментов, для чего клетки, обработанные ингибитором Nu7441, Ku55933

или их комбинацией, трансдуцировали псевдовиром ВИЧ-1\_wt, а через 24 часа клетки лизировали и измеряли уровень люминесценции люциферазы светлячка. Результаты этого эксперимента показали, что активации DNA-PKcs и ATM происходят последовательно, однако, мы пока не можем точно сказать, какая из киназ активируется первой.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проделанной работы мы определили район в составе Ku70, который вовлечен в связывание интегразы ВИЧ-1, и показали, что замены аминокислот Ku70\_S69A/I72A и Ku70\_S73A/I76A приводят к существенному снижению аффинности Ku70 к ИН. Был также разработан подход к поиску ингибиторов взаимодействия этих белков, основанный на использовании генетически закодированных флуоресцентных белков, присоединенных к ИН и Ku70. Проверка взаимодействия полученных гибридных белков His6-Ku70-tRFP и GST-mCcr-ИН методом Вестерн-блоттинга показала, что устойчивость образуемого ими комплекса сравнима с устойчивостью комплекса исходных ИН и Ku70. Разработанный подход к скринингу ингибиторов может быть реализован не только в классическом варианте, в пробирке, с последующим анализом флуоресценции в геле, но и в высокопроизводительном планшетном формате. Для детального выяснения важности участия ДНК-зависимой протеинкиназы в процессе пост-интеграционной репарации, получен набор генетических конструкций для продукции однораундных псевдовирусов на базе генома ВИЧ-1, содержащих мутации в составе ИН, которые нарушают один из ранних этапов репликативного цикла ВИЧ-1. Определены временные интервалы протекания всех ранних этапов репликации ВИЧ-1 и установлено, что активация DNA-РКс начинается синхронно с интеграцией вирусной ДНК. Таким образом, процесс пост-интеграционной репарации запускается сразу после появления интеграционного интермедиата с повреждениями в ДНК. На основании этих экспериментов сделан вывод, что DNA-РК участвует в пост-интеграционной репарации по пути, отличному от пути негомологичного объединения концов. Анализ участия в пост-интеграционной репарации ВИЧ-1 других ферментов из семейства фосфатидилинозитол-3 подобных киназ PI3K: ATM и ATR, - показал, что из них только ATM участвует в этом процессе. Причем, активация ATM, как в случае с DNA-РК, происходит синхронно с интеграцией и зависит от взаимодействия между интегразой ВИЧ-1 и клеточным белком Ku70. Установлено также, что активация DNA-РКс и ATM в процессе пост-интеграционной репарации ДНК происходит последовательно.

ПРИЛОЖЕНИЕ А  
Объем финансирования темы в 2020 году  
Таблица А.1

Источник финанси- рования	Объем (руб.)	
	Получено	Освоено собственными силами