

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шадрина Ольга Алексеевна

**РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ KU И SFRQ
В ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1**

03.01.03 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в отделе химии нуклеиновых кислот НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

- Научный руководитель** — *Готтих Марина Борисовна, доктор химических наук, профессор*
- Официальные оппоненты** — *Лаврик Ольга Ивановна, доктор химических наук, академик РАН, профессор, зав. Лабораторией биоорганической химии ферментов, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН*
Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, гл.н.с. лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН»
Шеваль Евгений Валерьевич, доктор биологических наук, зав. лабораторией ультраструктуры клеточного ядра, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита диссертации состоится «8» апреля 2021 года в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/356133754/>

Автореферат разослан «__» _____ 2021г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Существующая в настоящий момент антиретровирусная терапия (АРТ) достаточно эффективно снижает уровень вирусной нагрузки ниже детектируемого значения и позволяет продлевать жизнь и улучшать ее качество у ВИЧ-инфицированных людей. Однако она не позволяет полностью удалить вирус из организма человека. Причиной этого является наличие семейств клеток, содержащих интегрированный провирус в транскрипционно-неактивном (латентном) состоянии, на который не действуют компоненты АРТ. Предлагаются различные стратегии ликвидации «молчащего» провируса, включая стратегии “shock and kill” или “lock and block”. Стратегия “shock and kill” заключается в активации вирусной транскрипции на фоне АРТ и последующего элиминирования клеток, продуцирующих вирусные частицы, иммунной системой и/или в результате вирусной цитотоксичности. Стратегия “lock and block”, наоборот, заключается в подавлении вирусной транскрипции и введение провируса в состояние «глубокой латентности», предотвращающее его репликацию при отмене АРТ. Однако реализация обеих стратегий требует глубокого понимания молекулярных механизмов поддержания и выхода вируса из латентного состояния. Поэтому крайне актуальным остается изучение клеточных белков, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1.

Ранее было высказано предположение о влиянии клеточного ДНК-связывающего белка Ku на эффективность транскрипции с промотора ВИЧ-1. Однако в свете новых данных о положительной роли Ku в репарации повреждений генома на месте интеграции в него ДНК ВИЧ-1 интерпретация результатов исследований роли Ku в транскрипции генов ВИЧ-1 становится затруднительной. Влияния на транскрипцию ВИЧ-1 другого белка человека, SFPQ, изучено не было, хотя есть данные о его влиянии на репликацию вируса в целом, и предполагается его роль в нескольких стадиях репликации.

Цели и задачи работы. Целью данной работы стало изучение влияния клеточных белков Ku и SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 и выяснение потенциальных механизмов этого влияния. Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить, влияет ли белок SFPQ на экспрессию генов ВИЧ-1.
2. Изучить влияние субъединиц ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-PK, в состав которой, наряду с каталитической субъединицей DNA-PKcs, входит Ku, на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в единой тестовой системе. Выявить, на какую стадию транскрипции оказывает влияние белок Ku.
3. Охарактеризовать взаимодействие ДНК-связывающего гетеродимера Ku с РНК, для чего необходимо было разработать систему для получения рекомбинантного препарата

белка. Проверить, связано ли влияние Ku на транскрипцию ВИЧ-1 с его взаимодействием с TAR РНК.

4. Изучить взаимодействие Ku с рибонуклеопротеиновым комплексом 7SK РНП, который является важным регулятором транскрипции ВИЧ-1.

5. Проанализировать доступные данные изменения экспрессии белков на уровне транскриптома и протеома при нокауте субъединиц Ku70, Ku80 и DNA-PKcs с целью выявления факторов, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 и изменяющихся при снижении уровня Ku в клетке.

Научная новизна и практическая значимость. Неоднократно отмечалось влияние SFPQ на разные этапы репликации ВИЧ-1, однако единого мнения о механизме и даже степени влияния нет. В данной работе впервые показано, что SFPQ оказывает положительное влияние на экспрессию с промотора ВИЧ-1, причем это влияние зависит от наличия U3 региона в вирусном длинном концевом повторе (LTR). Также впервые установлено, что SFPQ способен взаимодействовать с U3 регионом и определен сайт посадки на нем.

Участие белка Ku в регуляции вирусной транскрипции до сих пор не было детально изучено, хотя влияние Ku и всего холофермента DNA-PK на экспрессию генов после интеграции провируса показано в нескольких работах. Однако позднее было показано участие Ku в процессе постинтеграционной репарации ДНК, что ставит под сомнение эти данные. В данной работе впервые проведено систематическое исследование влияния каждой из субъединиц Ku и каталитической субъединицы DNA-PKcs на уровень транскрипции с промотора ВИЧ-1. На репортерной системе и на уже интегрированном провирусе показано, что гетеродимер Ku является положительным фактором транскрипции, а каталитическая субъединица DNA-PKcs не влияет на экспрессию с промотора ВИЧ-1. Впервые обнаружено привлечение гетеродимера Ku к промотору ВИЧ-1 на плазмидном векторе и на уже интегрированном провирусе. Впервые установлено, что Ku важен для стадии инициации транскрипции.

Проведено исследование РНК-связывающих свойств гетеродимера Ku человека. Показано, что Ku предпочтительно взаимодействует со шпилечными РНК, содержащими выпетливание около G-богатой терминальной петли шпильки. Показано, что РНК связывается с Ku в его ДНК-связывающем сайте. Кроме того, впервые *in vitro* и в клеточной культуре обнаружено взаимодействие Ku с 7SK РНК – важным регулятором транскрипции ВИЧ-1. Показано, что Ku предпочтительно взаимодействует с первой консервативной шпилькой 7SK РНК. Обнаружено, что Ku взаимодействует с белками комплекса 7SK мРНК: HEXIM1 и Cdk9, и, возможно, именно это взаимодействие определяет привлечение Ku на промотор ВИЧ-1.

Поиск клеточных белков, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1, является важным этапом в понимании механизма установления и поддержания латентности, а также выхода из нее. Исследование этого механизма позволит расширить стратегии лечения ВИЧ-инфекции “shock and kill” или “lock and block”, которые, возможно, помогут полностью ликвидировать вирус в организме больного.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено взаимодействие белка человека SFPQ с U3 регионом длинного концевой повтора (LTR) ВИЧ-1 и обнаружен сайт посадки SFPQ внутри U3 региона. Показано, что U3-регион необходим для регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 белком SFPQ.

2. Установлено, что гетеродимерный белок Ku присутствует на промоторе ВИЧ-1 и положительно влияет на инициацию транскрипции с него. Это влияние не зависит от взаимодействия Ku с TAR РНК вируса. Показано, что каталитическая субъединица DNA-PKcs не оказывает влияния на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

3. Охарактеризованы РНК-связывающие свойства гетеродимера Ku человека: показано, что Ku предпочтительно связывается со шпилечными РНК, имеющими выпетливание рядом с терминальной петлей, содержащей G-богатую последовательность, а сайт связывания РНК в структуре Ku совпадает с сайтом связывания ДНК.

4. Обнаружено взаимодействие Ku с 7SK РНК и с белками комплекса 7SK РНП HEXIM1 и Cdk9, таким образом, Ku может рассматриваться в качестве нового компонента комплекса 7SK РНП – важного регулятора транскрипции генов ВИЧ-1.

5. На основе анализа транскриптомных данных для линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом одного из генов белков Ku70, Ku80, DNA-PKcs и протеомных данных для линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70 предложены новые возможные участники Ku-зависимой регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1, которые могут определять влияние Ku на транскрипцию, - белки: ATF3, CEBPB, TRIM56, SETD1A и TFAP4.

Методология исследования. Работа выполнена с использованием стандартных молекулярно биологических и биохимических методов. Исследования проводились на клеточной культуре НЕК 293Т (клетки эмбриональной почки) и микроглиальных клетках человека HC69.5. В работе использовался общепринятый подход по определению влияния изменения уровня белка на экспрессию с тестируемого промотора: был использован репортерный вектор, в котором ген люциферазы светлячка находится под контролем промотора ВИЧ-1. Также был использован вектор, кодирующий полный геном ВИЧ-1 и содержащий ген люциферазы светлячка в позиции гена *nef*. Репортерные вектора трансфицировали в клетки с повышенным и/или пониженным уровнем изучаемых белков. Повышение уровня белка проводилось с помощью временной суперэкспрессии белка с

трансфицированной плазмиды. Понижение уровня исследуемого белка достигалось методом РНК-интерференции с помощью трансфекции в клетки специфических siРНК. Также в работе применялись клеточные линии с моноаллельным нокаутом генов белков Ku70, Ku80, DNA-PKcs. Для работ по характеристике ДНК и/или РНК-связывающих свойств исследуемого белка *in vitro* белки экспрессировали в *E.coli* и очищали стандартными хроматографическими методами. Взаимодействие нуклеиновых кислот (НК) с белком изучали методом торможения комплекса в нативном геле. Определение сайта посадки белка на ДНК или РНК изучали *in vitro* с помощью футпринтинга НК-белкового комплекса ДНКазой I или РНКазой T1, соответственно. Для изучения ассоциации белков с фрагментами ДНК в клетке применялся метод иммунопреципитации хроматина. Для изучения взаимодействия белка Ku с 7SK РНК в клетке применялся метод иммунопреципитации РНК. Поиск транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию транскрипции с промотора ВИЧ-1, среди данных транскриптома и протеома проводился с помощью языка программирования Java.

Вклад автора. Личный вклад заключался в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов и их интерпретации, подготовке публикаций. Основные результаты, представленные в работе, получены самим автором.

Степень достоверности результатов. Результаты были получены с применением классических, а также новых современных методов, с использованием современного оборудования и качественных реактивов. Все эксперименты были поставлены в нескольких технических и биологических повторах с соответствующими контролями и хорошо воспроизводились.

Апробация работы и научные публикации. По материалам работы опубликовано 5 статей в зарубежных и отечественных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» 2017 г., Frontiers of Retrovirology Conference 2018, IV междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике 2018, международная конференция EU4HIVCURE International meeting 2018, 42-ой, 43-ий и 44-ый Конгресс FEBS 2017, 2018 и 2019 г., соответственно; международная конференция Viruses 2020-Novel Concepts in Virology.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 135 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, Дополнительные материалы. Диссертация содержит 37 рисунков и 8 таблиц. Список литературы включает 181 источник.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Репортерная система для определения влияния исследуемых белков на транскрипцию ВИЧ-1

В первую очередь нам необходимо было создать достаточно простую систему, позволяющую исследовать влияние всех субъединиц DNA-PK (DNA-PKcs, Ku70, Ku80), а также белка SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, исключив их влияние на другие стадии жизненного цикла вируса. Для этого была использована система на основе вектора pGL3-Basic (Promega). Этот вектор кодирует ген люциферазы светлячка и сконструирован таким образом, что позволяет встроить в него любую промоторную последовательность для контроля экспрессии люциферазы. В качестве контрольной была получена конструкция pGL3-CMV с промотором цитомегаловируса (CMV). Для проверки влияния изучаемых белков на активность промотора ВИЧ-1 мы провели клонирование в вектор pGL3-Basic всего 5'-длинного концевой повтора LTR ВИЧ-1 (первые 634 п.о.), так чтобы были включены все регуляторные элементы (рис. 1А). Сам промотор расположен в конце региона U3, а транскрипция начинается примерно с 455 п.о. на границе регионов U3 и R, входящих в состав 5'LTR. Заклонированный нами в репортерный вектор регион 5'LTR также включал лидерный участок мРНК ВИЧ-1, несущий важные регуляторные последовательности. Каждая мРНК репортера начиналась со шпильки TAR, формирующейся из первых 60 нуклеотидов мРНК ВИЧ-1. В нашем распоряжении был также вектор pNL4-3.Luc.R-E-, кодирующий полный геном ВИЧ-1, в котором в ген *nef* встроена люцифераза светлячка (рис. 1Б). Используя этот вектор, можно оценить влияние изучаемых белков на экспрессию с промотора ВИЧ-1 в присутствии вирусных белков, но при этом, в случае если белки влияют не только на стадию транскрипции, наблюдается суммарный эффект.

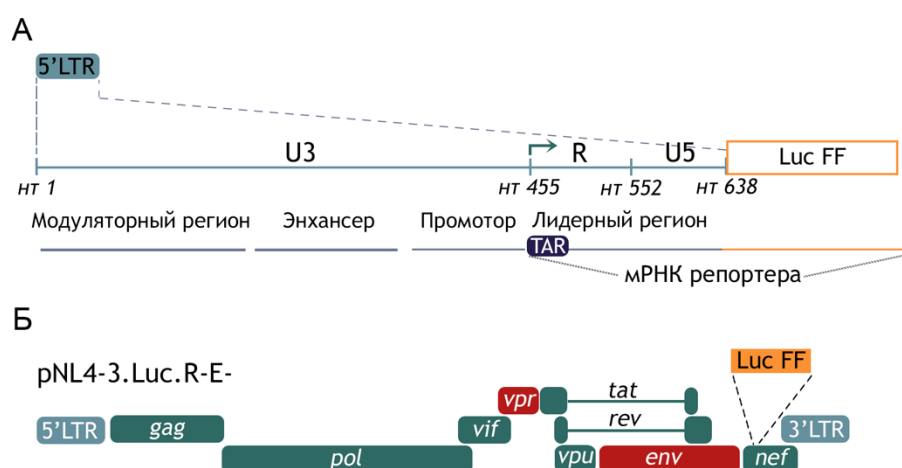


Рисунок 1. Схемы используемых в работе векторов для анализа влияния исследуемых белков на экспрессию с промотора ВИЧ-1. (А). Схематическое изображение части вектора pGL3-LTR-HIV, в котором под контролем 5'LTR региона генома ВИЧ-1 находится ген люциферазы светлячка (Luc FF). Указаны главные регуляторные элементы. **(Б).** Схематическое представление генома ВИЧ-1 со встроенным геном люциферазы светлячка (Luc FF) в векторе pNL4-3.Luc.R-E-. Сдвиг рамки считывания в генах *vpr* и *env* нарушает синтез белков оболочки и Vpr (отмечены красным).

2. Белок SFPQ влияет на транскрипцию с промотора ВИЧ-1

Для проверки влияния SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 использовали систему репортерных векторов, которыми трансфицировали клетки линии HEK 293T с повышенным или пониженным уровнем SFPQ. Для анализа влияния SFPQ использовали клетки с суперэкспрессией мус-тагированного SFPQ с вектора pcDNA3-SFPQ-мус, полученного из базы Addgene (рис. 2А). Оказалось, что суперэкспрессия SFPQ приводит к небольшому повышению (примерно на 30%) уровня экспрессии люциферазы с LTR промотора ВИЧ-1 и в репортерном векторе pGL-LTR-HIV, и в векторе pNL4.3-Luc.R-E- (рис. 2Б). Используя вектора pGL-LTR-HIV и pGL-CMV, мы выяснили, что повышение уровня люциферазы при суперэкспрессии SFPQ связано с увеличением уровня ее мРНК (рис. 2В).

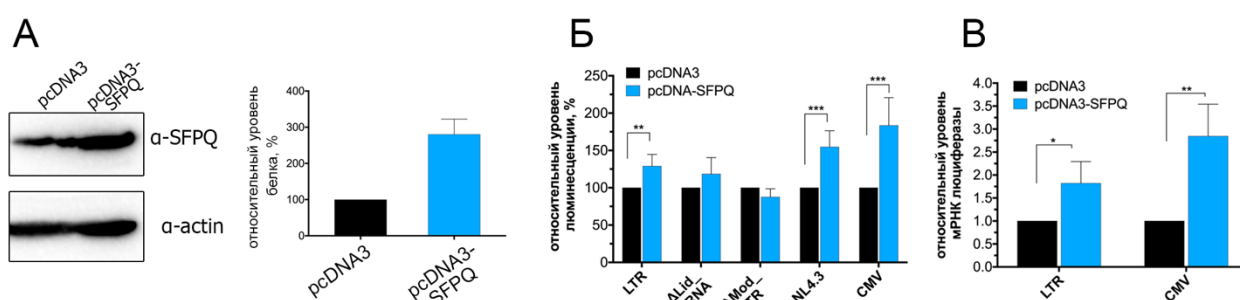


Рисунок 2. Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белка SFPQ на эффективность экспрессии люциферазы в клетках HEK 293T. (А). Вестерн-блот анализ экспрессии мус-меченного SFPQ при трансфекции клеток HEK 293T вектором pcDNA3-SFPQ (слева); обсчет результатов Вестерн-блота (справа). **(Б).** Влияние суперэкспрессии белка SFPQ на экспрессию люциферазы светлячка с промоторов ВИЧ-1 дикого типа (LTR), промотора ВИЧ-1 в векторе pNL4.3-Luc.R-E- (pNL4.3), и промотора цитомегаловируса (CMV). **(В).** Влияние суперэкспрессии SFPQ на уровень мРНК люциферазы, экспрессирующей с промоторов LTR и CMV. Относительный уровень мРНК люциферазы светлячка в клетках, трансфицированных пустым вектором pcDNA3 принят за 1. Приведено среднее минимум 3 независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

Используемый репортерный вектор pGL-LTR-HIV содержит весь вирусный длинный концевой повтор, включая модуляторный регион, взаимодействующий с транскрипционными факторами, промотор и лидерный регион вирусной мРНК (рис. 1А). Мы проанализировали регион U3 LTR ВИЧ-1 до места старта транскрипции и нашли последовательность, аналогичную предсказанной консенсусной последовательности сайта связывания SFPQ в промоторе гена IL-8: ²⁶⁷-GACAGC**CGC**-²⁷⁵ (K. Imamura, Mol.Cell., 2014) (красным цветом выделены нуклеотиды, которые не совпадают с консенсусной последовательностью (рис. 3А)). Мы предположили, что взаимодействие SFPQ с этим сайтом определяет его позитивный эффект на экспрессию люциферазы с промотора LTR ВИЧ-1. Для проверки взаимодействия SFPQ с ДНК вируса, мы проверили связывание рекомбинантного белка Strep-SFPQ с регионом U3 вирусного LTR (1-454 нт) методом

торможения в геле (схема целого LTR приведена на рис. 3Б). Было установлено, что Strep-SFPQ взаимодействует с U3 регионом вирусной ДНК *in vitro* (рис. 3В). Для определения места посадки Strep-SFPQ на этом участке LTR, была проведена обработка 5'-³²P-меченного региона U3 с помощью ДНКазы I в присутствии и в отсутствии Strep-SFPQ (рис. 3Г). Видно, что в присутствии Strep-SFPQ есть защита довольно длинного участка между 150-454 нуклеотидами, однако наиболее защищенный от гидролиза ДНКазой I регион располагается в районе 230-300 нуклеотидов. Примечательно, что именно он включает предполагаемый сайт связывания SFPQ, аналогичный определенному для гена IL8 (К. Imamura, Mol.Cell., 2014).

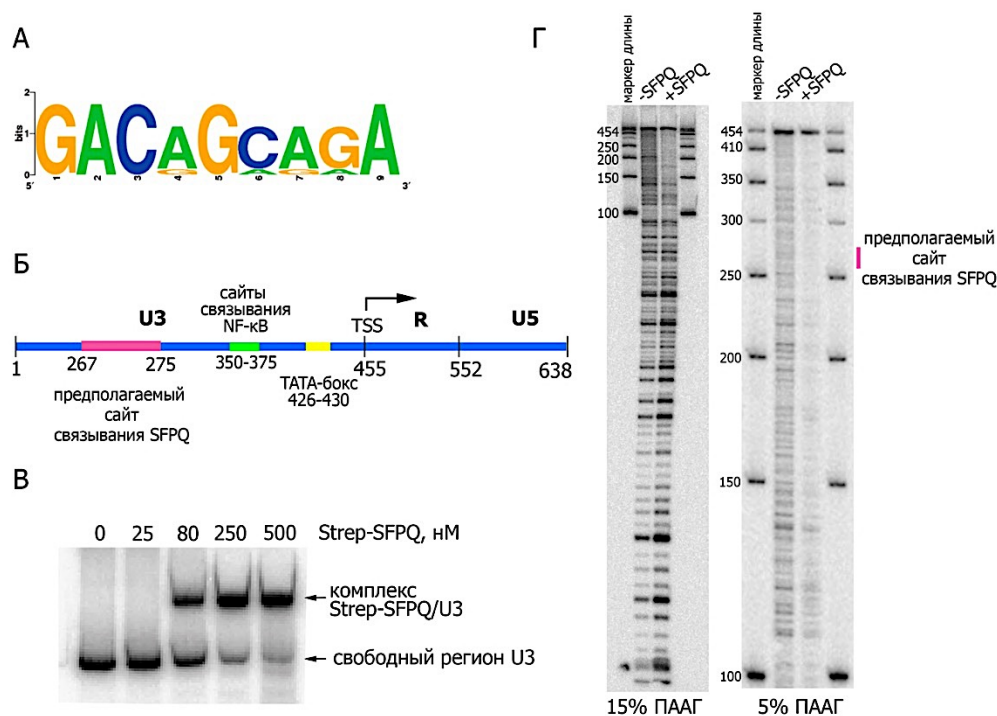


Рисунок 3. Взаимодействие SFPQ с ДНК. (А). Консенсусная последовательность сайта связывания SFPQ, присутствующая в промоторном регионе гена IL8 (К. Imamura, Mol.Cell., 2014). (Б). Схематическое представление LTR участка вирусной ДНК: содержит регионы U3, R, U5 со стартом транскрипции (TSS) на границе U3 и R. Обозначены предполагаемый сайт связывания SFPQ, сайты связывания активатора NF-κB и ТАТА-бокс. (В). Анализ связывания ³²P-меченного U3 участка LTR (1-454) с препаратом рекомбинантного белка Strep-SFPQ (концентрация белка указана над дорожками) электрофорезом в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях. (Г). Анализ сайта связывания SFPQ в участке LTR (1-454) методом футпринтинга с использованием ДНКазы I. 28 нМ ³²P-меченная ДНК инкубировалась с ДНКазой I в присутствии и отсутствии 300 нМ Strep-SFPQ. Продукты футпринтинга были проанализированы в денатурирующем ПААГ. Радиоавтографы 15% геля (слева) и 5% (справа). В качестве контроля подвижности нанесены 5'-³²P-меченные участки LTR разной длины.

С целью проверить, что взаимодействие SFPQ с ДНК в U3 регионе вирусного LTR может определять влияние SFPQ на экспрессию люциферазы с LTR промотора, мы сконструировали делеционный вариант вектора pGL-LTR-HIV, в котором отсутствовала модуляторная часть U3 региона с его начала до сайтов посадки фактора NF-κB и ТАТА-

бокса, содержащая определенный нами участок связывания SFPQ (Δ Mod_LTR - Δ 1-322 нуклеотиды LTR). Кроме того, был получен еще один вариант вектора pGL-LTR-HIV, в котором отсутствовали фрагменты R и U5 вирусного LTR, которые кодируют лидерный регион мРНК вируса (Δ Lid_mRNA - Δ 456-638). При повторе эксперимента по влиянию суперэкспрессии SFPQ на экспрессию люциферазы с обоих делеционных вариантов вектора pGL-LTR-HIV в клетках линии HEK 293T оказалось, что суперэкспрессия SFPQ перестала стимулировать экспрессию люциферазы только с вектора Δ Mod_LTR, в котором отсутствовал модуляторный регион, содержащий предложенный нами сайт связывания SFPQ (рис. 4). Таким образом, впервые нами было показано влияние SFPQ на экспрессию люциферазы с промотора LTR в клеточной линии HEK 293T, которое, по нашему мнению, определяется взаимодействием SFPQ с участком ДНК в модуляторном регионе LTR ВИЧ-1.

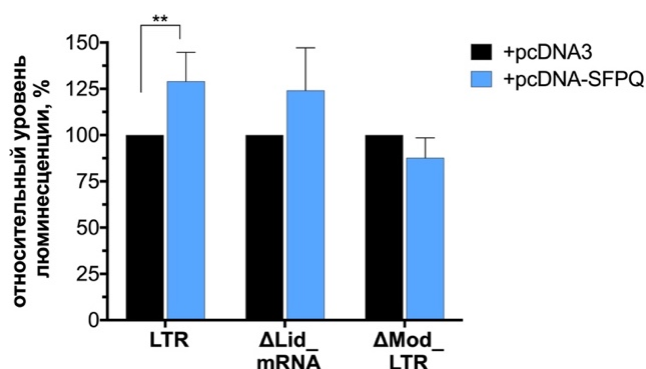


Рисунок 4. Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белка SFPQ на эффективность экспрессии люциферазы с репортерного вектора pGL-LTR-HIV дикого типа (LTR) и его делеционных вариантов (Δ Lid_mRNA и Δ Mod_LTR) в клетках HEK 293T. Приведено среднее не менее 4 независимых экспериментов со стандартным отклонением. ** - $p < 0,01$; (согласно t-критерию Стьюдента).

3. Влияние субъединиц комплекса DNA-ПК на транскрипцию ВИЧ-1

Мы изучили влияние субъединиц комплекса DNA-ПК на экспрессию люциферазы с промотора ВИЧ-1, используя репортерные вектора и несколько систем изменения уровня субъединиц в клетке: снижение их уровня достигалось моноаллельным нокаутом (линии Cr_KO Ku70, Cr_KO Ku80, Cr_KO DNA-PKcs,) или с помощью временного нокдауна трансфекцией клеток HEK 293T короткими интерферирующими РНК к Ku70 (siKu70) и к Ku80 (siKu80) (рис. 5). Для исследования влияния повышенной внутриклеточной концентрации белков Ku70 и Ku80 с промотора LTR ВИЧ-1 мы трансфицировали клетки HEK 293T полученными ранее в лаборатории конструкциями pcDNA3.1-Ku70-3xFLAG и pcDNA3.1-Ku80-3xFLAG, кодирующими гены белков Ku70 и Ku80, маркированных FLAG-тагом.

Было установлено, что снижение уровня Ku70 и Ku80 в клетке приводит к падению экспрессии люциферазы с промотора LTR примерно вдвое (рис. 5А,В). С другой стороны, повышение уровня обеих субъединиц Ku путем их суперэкспрессии в равной степени активирует экспрессию люциферазы с этого промотора, причем этот эффект является дозозависимым (рис. 5Г,Д). Анализ уровня мРНК люциферазы в клетках дикого типа и с

моноаллельным нокаутом субъединиц Ku, трансфицированных репортерными векторами, показал, что наблюдаемое снижение уровня люциферазы связано со снижением уровня ее мРНК (рис. 5Б). Снижение уровня Ku в клетке также оказывало негативный эффект на промотор CMV, но он не был настолько сильным как эффект на промотор LTR. Важно также, что мы не обнаружили значительного влияния Ku на уровень мРНК люциферазы, синтезируемой с промотора CMV (рис. 5Б). Таким образом, оказалось, что Ku является положительным фактором транскрипции с промотора LTR ВИЧ-1.

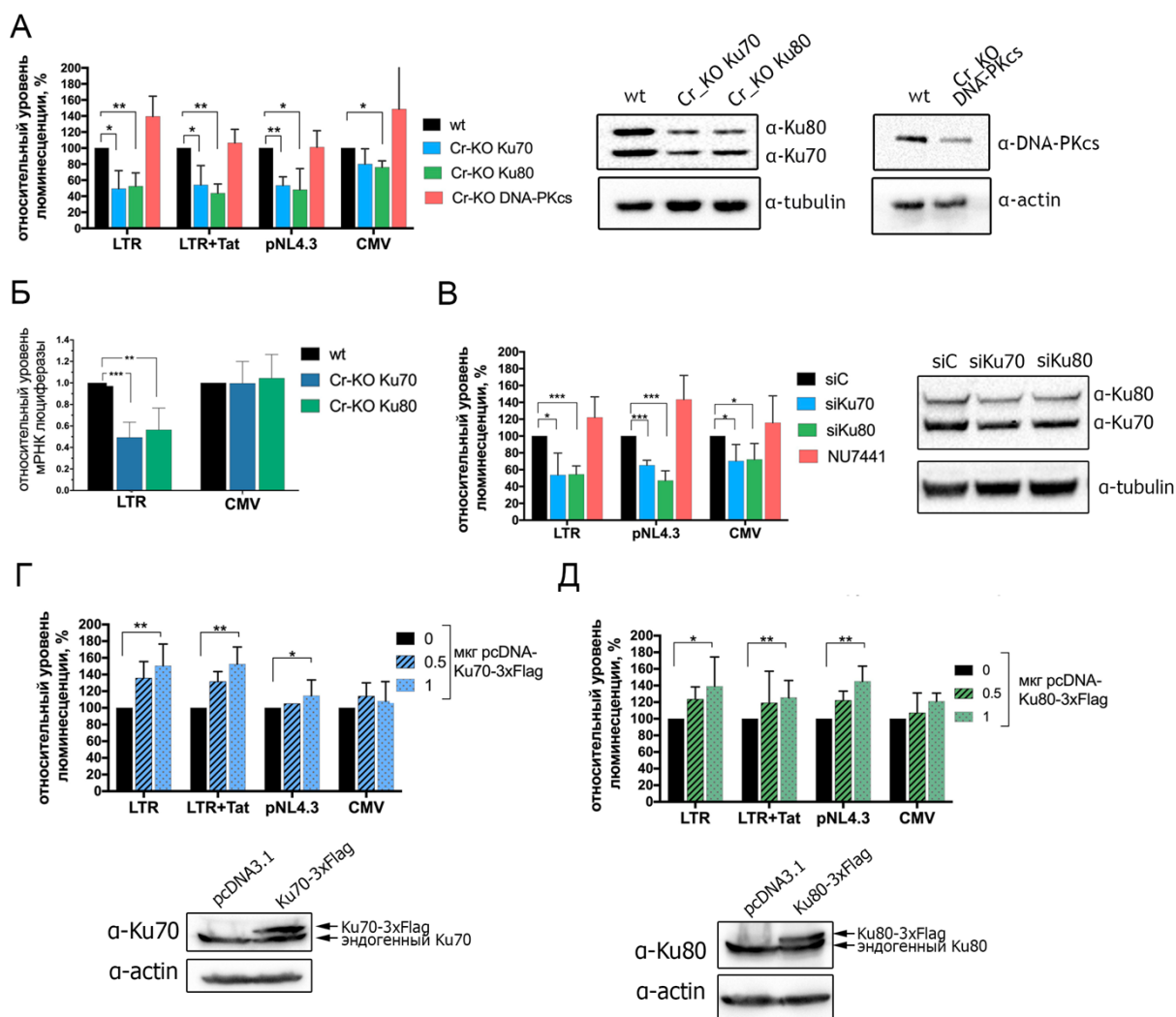


Рисунок 5. Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs в клетках HEK 293T на эффективность экспрессии люциферазы. (А). Влияние моноаллельного нокаута белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs на активность промоторов ВИЧ-1 (LTR), LTR промотора ВИЧ-1 при ко-трансфекции вектора, кодирующего белок Tat (LTR+Tat), промотора ВИЧ-1 в составе вектора pNL4-3.Luc.R-E- и промотора цитомегаловируса (CMV). **(Б).** Анализ уровня мРНК люциферазы, транскрибирующейся с промоторов LTR и CMV, в клетках дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70 и Ku80. Относительный уровень мРНК люциферазы светлячка в клетках дикого типа принят за 1. **(В).** Влияние нокадауна Ku70 (siKu70) и Ku80 (siKu80) с помощью siРНК и ингибитора каталитической субъединицы DNA-PKcs NU7441 на активность промотора LTR, промотора ВИЧ-1 в векторе pNL4-3.Luc.R-E- и промотора CMV. **(Г-Д).** Влияние суперэкспрессии Ku70 (Г) и Ku80 (Д) на активность промоторов LTR, LTR при суперэкспрессии Tat (LTR+Tat), промотора ВИЧ-1 в составе вектора pNL4-3.Luc.R-E- и промотора (CMV). Рядом с графиками приведен соответствующий Вестерн-блот анализ уровня субъединиц DNA-PK. Во всех

экспериментах люминесценция в лизатах нормирована на общий уровень белка в них, относительный уровень люминесценции в клетках дикого типа или трансфицированных контрольным вектором или контрольной siРНК принят за 100%. Приведено среднее минимум 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

Известно, что сильным активатором элонгации транскрипции ВИЧ-1 является вирусный белок Tat. Белок Tat закодирован в векторе pNL4-3.Luc.R-E-, соответственно, при использовании этого вектора мы наблюдали влияние Ku на экспрессию с промотора LTR в присутствии Tat. Мы предположили, что Ku влияет и на Tat-активированную транскрипцию. Для проверки этого предположения, мы вместе с репортером в клетки ко-трансфицировали вектор, кодирующий Tat. Оказалось, что негативный эффект от снижения уровня Ku и позитивный эффект от суперэкспрессии Ku в присутствии Tat такой же, как и без него (рис. 5А,Г и Д). Таким образом, мы достоверно показали, что белок Ku является положительным фактором транскрипции с промотора ВИЧ-1, причем его влияние не зависит от присутствия активатора транскрипции Tat.

В работах (S.Tyagi, J. Gen. Virol., 2011; S.Zicari, Oncotarget, 2020) было высказано предположение, что каталитическая субъединица DNA-PKcs на промоторе ВИЧ-1 может фосфорилировать РНКП II и/или некоторые транскрипционные факторы для активации транскрипции. Также сообщалось, что DNA-PKcs является активатором экспрессии с промотора ВИЧ-1 в клетках линии Jurkat, трансдуцированных лентивирусными векторами, несущими ген люциферазы под контролем LTR. Мы проверили в нашей репортерной системе, как влияет на экспрессию люциферазы снижение уровня DNA-PKcs и ингибирование ее каталитической активности с помощью коммерчески-доступного соединения NU7441. Оказалось, что для всех тестируемых промоторов снижение уровня и ингибирование DNA-PKcs оказывали лишь незначительный неспецифичный положительный эффект (рис. 5А, В). Возможно, разница с литературными данными в наблюдаемом эффекте DNA-PKcs на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 обусловлена использованием разных клеточных линий и репортерных систем.

Ранее в работе (G. Manic, PLoS One, 2013) было показано положительное влияние Ku на экспрессию вирусных генов, причем эффект Ku наблюдался лишь сразу после заражения клеток вирусом и интеграции его ДНК в геном. Позже было показано, что Ku способствует репарации ДНК на месте интеграции провируса, привлекаемый туда вирусным белком интегразой (Е.Кныазханская, Retrovirology, 2019), причем для этого процесса важна фосфорилирующая активность DNA-PKcs. Следовательно, эффект Ku на экспрессию вирусных генов, описанный в работе (G. Manic, PLoS One, 2013), мог хотя бы отчасти быть связан со стадией репарации. Нами впервые было обнаружено влияние Ku на экспрессию люциферазы с LTR промотора в составе репортерных плазмид и показано, что Ku влияет именно на стадию транскрипции. Для дополнительной проверки участия Ku в

регуляции транскрипции с уже интегрированного провируса клетки линии НЕК 293Т инфицировались репликативно-некомпетентными VSV-G псевдотипированными вирусными частицами, собранными на основе вектора pNL4-3.Luc.R-E- и культивировались в течение 2 недель, чтобы элиминировать все неинтегрированные формы вирусной ДНК. Затем клетки трансфицировались либо плазмидами для суперэкспрессии Ku70 и Ku80, либо siРНК для их подавления и siРНК к каталитической субъединице DNA-PKcs (рис. 6). Оказалось, что Ku является положительным фактором для экспрессии люциферазы и с интегрированного провируса, в то время как DNA-PKcs не оказывает значительного влияния. Таким образом, во всех наших репортерных системах Ku участвует в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 вне комплекса с DNA-PKcs.

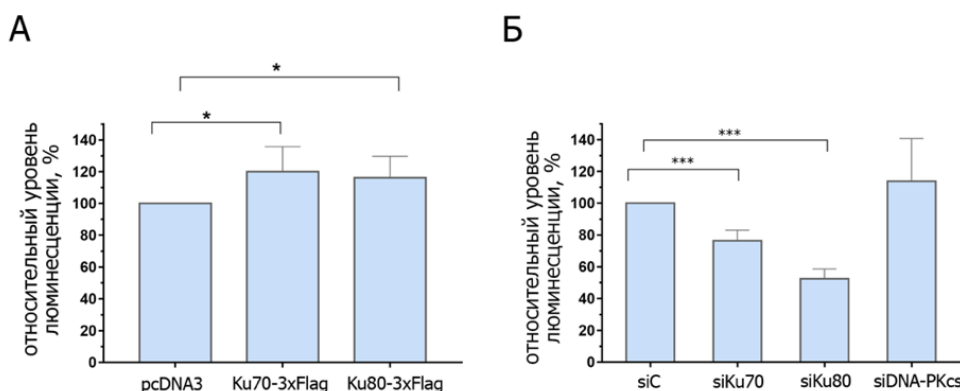


Рисунок 6. Влияние субъединиц DNA-PK на экспрессию интегрированного провируса NL4-3.Luc.R-E- в клетках линии НЕК 293Т. (А). Влияние суперэкспрессии Ku70 (Ku70-3xFlag) и Ku80 (Ku80-3xFlag). **(Б).** Влияние нокдауна субъединиц DNA-PK с помощью siРНК. Клетки НЕК 293Т инфицировались репликативно-некомпетентными вирусными частицами на основе вектора pNL4-3.Luc.R-E- и культивировались в течение двух недель для элиминации неинтегрированных вирусных ДНК. Инфицированные клетки трансформировались векторами pcDNA3 (А) и siРНК (Б). Уровень люминесценции лизатов нормировался на тотальный уровень белка в них, за 100% принят относительный уровень люминесценции в клетках, трансфицированных пустым вектором pcDNA3 (для гистограммы А) и контрольной siРНК (для гистограммы Б). Приведено среднее минимум 3 независимых экспериментов со стандартным отклонением, * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

4. Поиск механизма влияния Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1

Ассоциация Ku с промотором ВИЧ-1

На сегодняшний день нет четких доказательств ассоциации Ku с промотором ВИЧ-1 в отсутствии интегразы, хотя, как было описано выше в разделе 1.2.2, мы наблюдали влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 на уже интегрированном провирусе и на репортерном векторе, где интеграции и пост-интеграционной репарации не происходит. Мы решили проверить, ассоциирован ли гетеродимер с вирусным LTR в отсутствии интегразы. Для этого мы провели иммунопреципитацию хроматина на клетках линии НЕК 293Т, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV (рис. 7А), и клеточной линии НС69.5 (рис. 7Б, В). НС69.5 — это микроглиальные клетки человека, несущие

интегрированный репликативно-некомпетентный провирус со встроенным геном белка EGFP (зеленого флюоресцентного белка) (рис. 7Б). При иммунопреципитации с антителами к Ku80 мы детектировали приблизительно 4-х кратное обогащение участка ДНК, соответствующего вирусной промоторной области в LTR, и небольшое обогащение участков ДНК, соответствующих телу репортерного гена в обеих клеточных линиях. Таким образом, Ku ассоциирован с промотором ВИЧ-1 и в плазмидной ДНК, и в уже интегрированном латентном провирусе.

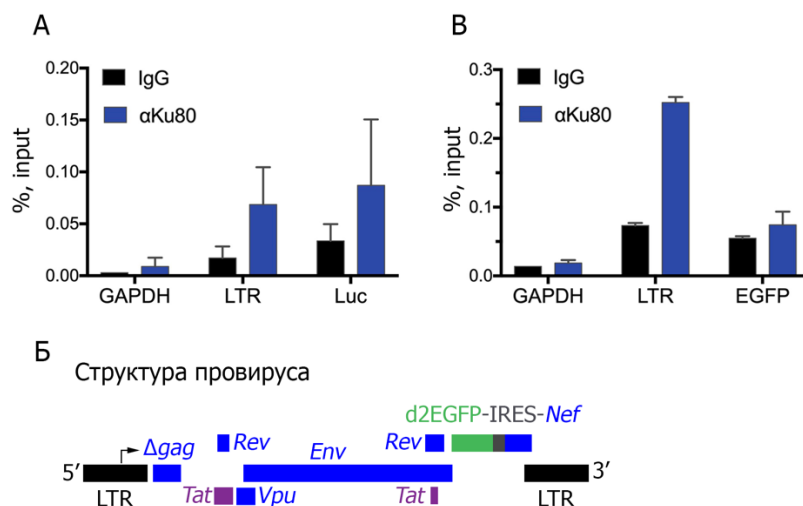


Рисунок 7. Ассоциация Ku с промотором ВИЧ-1 в клеточных линиях НЕК 293Т и НС69.5. А. Иммунопреципитация хроматина с антителами против эндогенного Ku80 в клеточной линии НЕК 293Т, трансфицированной вектором pGL-LTR-HIV. **(Б).** Структура интегрированного в геном микроглиальных клеток человека НС69.5 репликативно-некомпетентного провируса ВИЧ-1, содержащего ген EGFP. **(В).** Иммунопреципитация хроматина с антителами против эндогенного Ku80 в клеточной линии НС69.5, несущей интегрированный провирус. ПЦР анализ на промотор LTR, кодирующую часть гена люциферазы (Luc) или EGFP, и кодирующую часть гена GAPDH в качестве контроля. Приведено среднее значение 2-х независимых экспериментов со стандартным отклонением.

Далее нам необходимо было выяснить, обусловлена ли ассоциация Ku с вирусным LTR непосредственным связыванием Ku с ДНК. Ku сиквенс-неспецифично взаимодействует с концами двуцепочечной ДНК, но не с внутренними последовательностями. Сотрудником нашей лаборатории Королевым С.П. был проведен поиск новых возможных специфичных сайтов связывания Ku на LTR участке вирусного генома и было установлено, что Ku из ядерных лизатов клеток линии НЕК 293Т не взаимодействует с внутренними участками ДНК в LTR. Следовательно, мы стали рассматривать другие варианты привлечения Ku к промотору ВИЧ-1. Еще в 1993 г. было показано взаимодействие эндогенного Ku в ядерных лизатах клеток линии HeLa с синтетической TAR РНК ВИЧ-1 (W.Kaczmariski, Biochem. Res. Commun, 1993). TAR РНК представляет собой РНК-шпильку, формирующуюся из первых 60 рибонуклеотидов на 5'-конце вирусной мРНК при транскрипции и имеющую выпетливание вблизи терминальной петли. TAR РНК важна для Tat-опосредованного привлечения фактора транскрипции Р-TEFb на вирусный промотор и активации элонгации

(K.Fujinaga, Mol. Cell. Biol., 2004). Мы предположили, что Ku может привлекаться к промотору за счет связывания с TAR РНК.

Хотя Ku в первую очередь является ДНК-связывающим белком, тем не менее есть ряд работ, в которых сообщается о взаимодействии белка Ku человека с РНК (N.S.Y.Ting, Nucleic Acids Res., 2005; A.Lamaa, EMBO Rep., 2016). Однако к моменту начала нашей работы не существовало полной картины взаимодействия белка Ku человека с РНК, поэтому мы решили изучить структурно-функциональные особенности взаимодействия Ku с РНК вообще и с TAR РНК в частности.

Характеристика взаимодействия гетеродимера Ku со шпилечными РНК *in vitro*

Для изучения свойств и функций Ku *in vitro* требуется препарат очищенного белка. Мы сконструировали вектор для прокариотической ко-экспрессии белков Ku70 с 6хHis-меткой на N-конце и Ku80 с одной бицистронной мРНК. В ней рамки считывания первого и второго цистрона перекрывались на 1 нуклеотид: старт-кодон Ku80 начинался внутри стоп-кодона Ku70 (рис. 8А), а внутри 3'-конца первого цистрона располагались последовательность Шайна-Дальгарно и А/У-богатая последовательность. После оптимизаций условий экспрессии и выделения белка с использованием двух последовательных хроматографических очисток на Ni-активированной смоле и на гепарин-сефарозе, мы получили выход полноразмерного белка около 0,5 мг/л культуры.

Методом торможения в геле мы изучили РНК-связывающие свойства рекомбинантного гетеродимера Ku с использованием набора синтетических ³²P-меченных РНК, обладающих разными структурами (Таблица 1), и установили, что препарат полученного белка Ku не взаимодействует с двуцепочечным РНК-дуплексом (дцРНК), но эффективно связывается с синтетической TAR РНК (рис. 8Б).

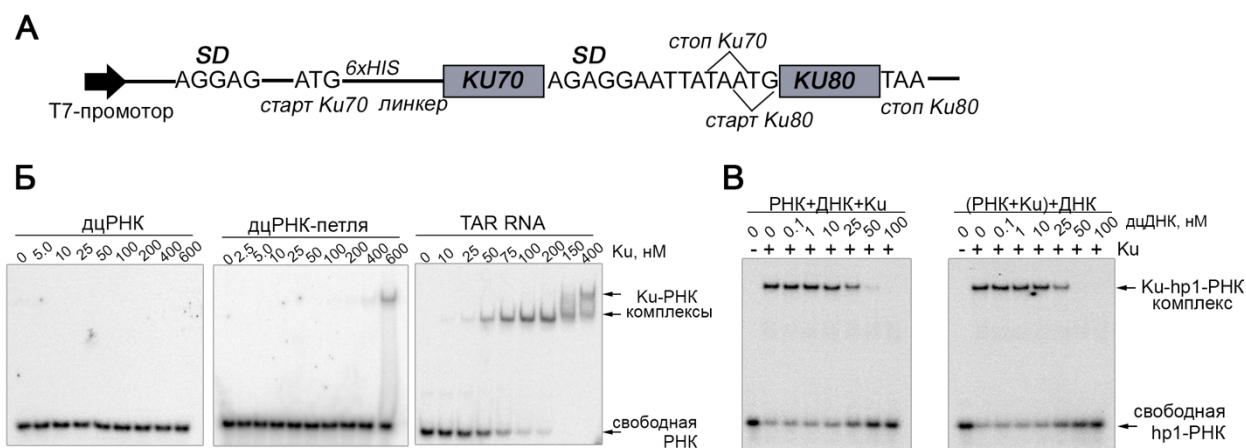


Рисунок 8. Получение и характеристика РНК-связывающей активности рекомбинантного гетеродимера 6хHis-Ku70/Ku80. (А). Схема строения части вектора pET15b-bicis-Ku, кодирующего белки Ku70 и Ku80. **(Б).** Анализ связывания 0.1 нМ двуцепочечной РНК (дцРНК), двуцепочечной РНК, содержащей выпетливание (дцРНК-петля) и TAR РНК с белком 6хHis-Ku70/Ku80 (концентрация белка указана над дорожками) электрофорезом в 5% ПААГ в

неденатурирующих условиях. (В). Взаимодействие 0.1 нМ 32Р-меченной hr1-РНК с 6хHis-Ku-70/Ku80 в присутствии возрастающей концентрации немеченого ДНК-дуплекса (левый гель) и вытеснение ³²Р-меченной hr1-РНК из комплекса с Ku возрастающей концентрацией ДНК-дуплекса (правый гель).

Для исследования особенностей взаимодействия рекомбинантного белка Ku с РНК мы использовали шпильки на основе TAR РНК: TAR-M1 в которой отсутствовало выпетливание, и TAR-M2 с заменой UGGG > CAAA в терминальной петле. Ku хуже связывал TAR-M2, чем TAR РНК дикого типа, однако наибольшее отрицательное влияние на связывание оказала делеция выпетливания: константа диссоциации комплекса Ku с TAR-M1 была выше почти в 3 раза.

Кроме того, среди всех протестированных РНК-шпилек (табл. 1) наибольшую аффинность Ku имел к шпильке hr1-РНК, которая обладает схожей с TAR вторичной структурой, однако первичные структуры у них разные. Аффинность Ku к hr2-РНК и микроРНК mir-504, у которых отсутствовало выпетливание около терминальной петли, близка к аффинности Ku к TAR-M1, которая также не имеет выпетливания. Анализ связывания Ku с дцРНК, не образующей шпильку (дцРНК-петля) (табл. 1, рис. 8Б) показал, что неспаренный участок в РНК дуплексе хоть и улучшает его взаимодействие с Ku по сравнению с совершенным РНК дуплексом, но для прочного связывания его недостаточно.

Таблица 1. Структура РНК-лигандов, использованных для изучения взаимодействия с гетеродимером Ku, а также константы диссоциации Ku-РНК комплексов

Название	Структура	Kd, нМ*	Коэффициент Хилла
дцРНК	5'-аусаусааассгуиуагс-3' 3'-уагуагуиуугсaaaaусг-5'	--	--
дцРНК-петля	5'-гуугугсусс усуагсгус-3' 3'-саасасгagg агаугсгсг-5' a _{ccu}	--	--
TAR	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c u ^g 3'-gaусааус ggucu ^c усг ^a g ^g	54 ± 6	3,2 ± 0,3
TAR-M1	5'-cugguuag ^a ccagagagc ^c u ^g 3'-gaусааус ggucucucg ^a g ^g	145 ± 17	5,1 ± 0,5
TAR-M2	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c a ^a 3'-gaусааус ggucu ^c усг ^a g ^g	85 ± 16	2,5 ± 0,2
hr1-РНК	5'-gg cгуcc ^c ус ccga ^a гс ^u g ^g 3'-cc ^a гсagg ас ^a ggcu ^u гс ^c g ^g	45 ± 10	1,9 ± 0,2
hr2-РНК	5'-гуccуc ^a ccacc ^c cc ^u g ^a 3'-cagggag ^c gggu ^g ac ^c cc ^u	125 ± 20	2,9 ± 0,3
mir-504	5'-gagaccуg ^g усгсacуcu ^a ус ^u гуа ^u u ^u 3'-cuуgggac ^g ggacгуagg ^g ag ^u cau ^u c ^c	115 ± 11	2,9 ± 0,2

* Приведено среднее значение как минимум трех независимых экспериментов со стандартным отклонением

В базе проекта ENCODE есть данные eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) экспериментов для белка Ku70 на клеточных линиях HepG2 и K562.

eCLIP анализ позволяет получить последовательности РНК, которые были со-осаждены с белком при его иммунопреципитации. Для отобрали последовательности с обогащением за антитела к Ku70 относительно контроля (IgG) более 6.3 и длиннее 10 нуклеотидов, и для них с помощью сервиса RNAstructure была предсказана вторичная структура. Мы отметили, что, среди 25 отобранных, 22 РНК имели в структуре хотя бы одну шпильку и примерно у половины из них терминальная петля имела G-богатую последовательность, в частности GpG динуклеотид (10 структур из 22). По всей видимости, наличие G-богатой терминальной петли важно для взаимодействия Ku с РНК: в частности, как было нами установлено, замена в терминальной петле UGGG->CAAA в TAR РНК приводила к снижению аффинности Ku к такой РНК.

С целью проверить, что дцДНК и РНК-шпильки связываются в одном сайте у белка Ku человека, мы провели анализ связывания 6xHis-Ku-70/Ku80 с ³²P-меченной hp1-РНК в присутствии возрастающей концентрации 40-звенного ДНК-дуплекса. В другом эксперименте hp1-РНК сначала пре-инкубировалась с Ku, а затем добавлялся ДНК-дуплекс в возрастающей концентрации. Оказалось, что в обоих случаях ДНК вытесняет РНК из комплекса с белком, таким образом подтверждая общий сайт связывания (рис. 8B). Проведенное исследование позволяет сделать вывод, что мотив структуры РНК, необходимый для эффективного связывания Ku, представляет собой шпильку с выпетливанием, расположенным рядом с ее терминальной петлей. Следовательно, структура РНК крайне важна для ее распознавания белком Ku человека, и это согласуется с наблюдениями, сделанными для белка Ku дрожжей (A.B.Dalby, RNA, 2013). Характер связывания белка Ku человека и дрожжей отличается, однако, тем, что для дрожжевого белка не важна последовательность петли, а Ku человека лучше связывает РНК-шпильки с G-богатой последовательностью петли.

Влияние взаимодействия Ku с TAR РНК на транскрипцию ВИЧ-1

Мы предположили, что Ku, взаимодействуя с TAR РНК, может привлекаться на LTR промотор ВИЧ-1 и за счет этого стимулировать транскрипцию с него. С целью проверить это предположение, мы создали репортерный вектор на основе pGL3-LTR_HIV, в котором был делетирован регион в LTR, кодирующий TAR РНК - pGL3-LTR_ΔTAR, и вектор pGL3-LTR_mTAR, в котором был удален участок, кодирующий выпетливание в шпильке TAR. Оказалось, что снижение эффективности транскрипции при моноаллельном нокауте Ku никак не зависело от структуры LTR в зоне TAR РНК. Таким образом, эффект Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 не зависит от наличия TAR РНК на 5'-конце синтезирующихся мРНК и, очевидно, не опосредован взаимодействием Ku с этой структурой (рис. 9).

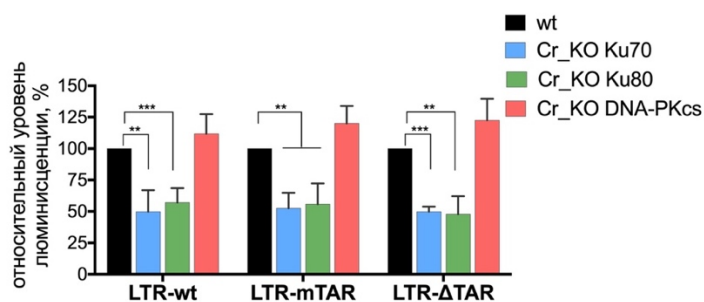


Рисунок 9. Влияние моноаллельного нокаута белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs в клетках НЕК 293Т на экспрессию с промоторов ВИЧ-1 дикого типа (LTR-wt), LTR с делецией региона, кодирующего выпетливание в TAR РНК (LTR-mTAR), и региона, кодирующего TAR РНК (LTR-ΔTAR). Приведено среднее минимум 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

Ки - новый компонент комплекса 7SK мяРНК

Клеточная 7SK РНК является малой ядерной некодирующей РНК, участвующей в регуляции элонгации транскрипции РНК полимеразой II, в частности транскрипции с промотора ВИЧ-1. Показано, что 7SK РНК имеет в составе структурные мотивы, похожие на TAR РНК (M.A.Durney, J. Mol. Biol., 2010; S.C.Sedore, Nucleic Acids Res., 2007). Мы провели РНК-иммунопреципитацию за антитела к Flag-пептиду в клетках НЕК 293Т с суперэкспрессией Flag-меченных Ku70 и Ku80 и показали, что при суперэкспрессии Flag-меченного Ku на анти-Flag смоле наблюдается 2-3-кратное обогащение эндогенной 7SK РНК, но не U6 РНК (малая ядерная некодирующая РНК, которая также содержит шпильки, однако в них нет выпетливания) (рис. 10А,Б). Таким образом, мы впервые показали, что белок Ku способен связывать эндогенную 7SK РНК, будучи суперэкспрессированным в клетках НЕК 293Т.

С целью подтвердить, что Ku способен связывать 7SK РНК напрямую, а не опосредованно за счет взаимодействия с белками комплекса 7SK РНК, методом торможения в геле мы изучили связывание рекомбинантного препарата белка Ku и 32 P-меченной полноразмерной 7SK РНК, полученной Т7-транскрипцией *in vitro* (рис. 10В). Оказалось, что Ku взаимодействует с 7SK РНК *in vitro*, константа диссоциации комплекса оценена в 30 нМ и сравнима с константой диссоциации комплекса Ku с TAR РНК. В структуре 7SK РНК выделяют 4 шпильки (рис. 10Д). Для того чтобы выяснить, с какой из них преимущественно взаимодействует гетеродимер Ku, мы использовали метод футпринтинга и провели расщепление 32 P-меченной 7SK РНК в отсутствии и в присутствии 100 нМ белка Ku с помощью РНКазы T1, гидролизующей одноцепочечные участки РНК после остатков гуанина. Четко видно, что в присутствии Ku наблюдается защита остатков G50-G52 и G55, расположенных в терминальной петле первой шпильки (рис. 10Г). Это указывает на преимущественное связывание гетеродимера с этим регионом 7SK РНК. Также заметна небольшая защита остатков гуанина, расположенных в шпильке 3.

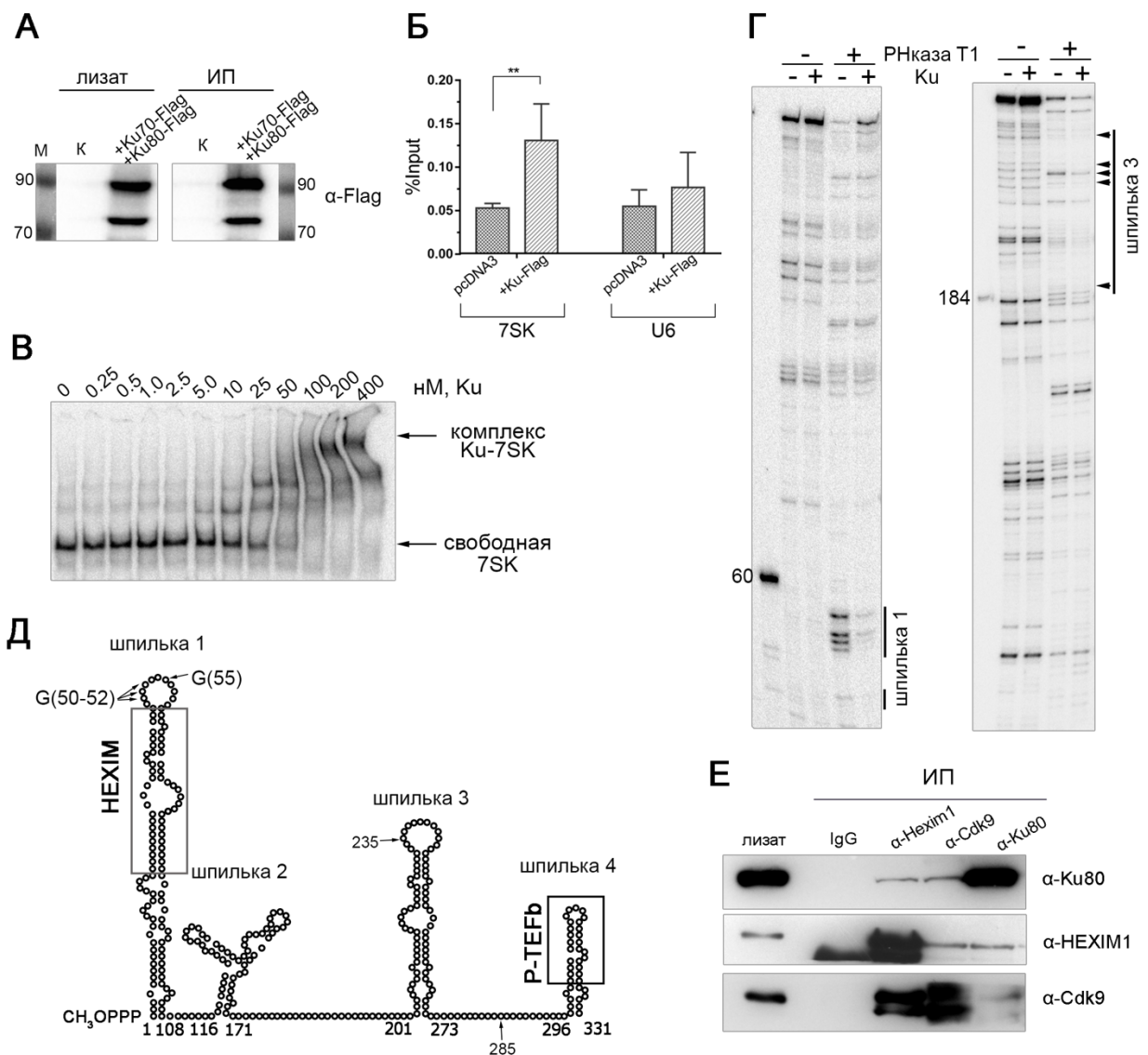


Рисунок 10. Взаимодействие Ku с комплексом 7SK мРНК. (А-Б). РНК-иммунопреципитация Ku70-Flag/Ku80-Flag на анти-Flag агарозу из клеток линии НЕК 293Т, трансфицированных векторами pcDNA3-Ku70-Flag и pcDNA3-Ku80-Flag или контрольным вектором pcDNA3.1 (дорожка К). Часть иммунопреципитированной фракции анализировалась методом Вестерн-блот (А) на присутствие Ku-Flag с помощью анти-Flag антител. Другая часть анализировалась на присутствие 7SK РНК и U6 РНК среди РНК, со-осажденных с Ku. (Б). Приведено среднее и стандартное отклонение 3 независимых экспериментов, ** - $p < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента). (В). Анализ методом изменения подвижности в геле связывания рекомбинантного гетеродимера 6xHis-Ku70/Ku80 с 32 Р-меченной 7SK РНК. 5 нМ РНК инкубировалась с возрастающими концентрациями Ku, указанными над гелем. Радиоавтограф 5% нативного ПААГ. (Г). Анализ сайта связывания Ku в 7SK РНК методом футпринтинга с использованием РНКазы Т1. 5нМ 32 Р-меченная 7SK РНК инкубировалась с РНКазой Т1 в присутствии и отсутствии 100 нМ гетеродимера Ku. Радиоавтографы 10-15% денатурирующего ПААГ (слева) и 6-10% (справа). В качестве контроля подвижности нанесены 60 и 184-звенные 32 Р-меченные РНК. (Д). Структура 4 петель 7SK РНК человека, выделены участки связывания с белками HEXIM и Р-ТЕFb комплекса 7SK РНК. (Е). Иммунопреципитация эндогенных белков HEXIM1, Cdk9 и Ku80. Лизаты и фракции с иммунопреципитацией (ИП) были проанализированы Вестерн-блотом на наличие HEXIM1, Cdk9 и Ku80.

Известно, что 7SK РНК в клетках формирует малый ядерный рибонуклеопротеиновый комплекс 7SK мяРНП. Мы проанализировали, может ли Ku взаимодействовать с такими компонентами 7SK мяРНП, как белок HEXIM1 и протеинкиназа Cdk9, входящая в состав регулятора транскрипции Р-TEFb. При иммунопреципитации эндогенных белков HEXIM1 и Cdk9 из клеток НЕК 293Т с использованием специфических анти-HEXIM1 или анти-Cdk9 антител среди осажженных и с HEXIM1, и с Cdk9 белков была обнаружена субъединица Ku80. Кроме того, эндогенные HEXIM1 и Cdk9 были также найдены при иммунопреципитации эндогенного Ku80 с использованием антител против Ku80 (рис. 10Е).

Ранее в работе (H.Liu, Biochem., 2010) было показано взаимодействие Ku70 в клетках линии HeLa с 55-кДа изоформой белка Cdk9, которая составляет его очень малую долю. В свою очередь, мы впервые продемонстрировали взаимодействие Ku с главной 42-кДа изоформой Cdk9. Таким образом, мы показали взаимодействие Ku как с 7SK РНК, так и с белками комплекса 7SK мяРНП, что позволяет рассматривать Ku как новый компонент комплекса 7SK мяРНП, участвующий в регуляции элонгации транскрипции клеточных генов и генов ВИЧ-1. Возможно, при снижении уровня Ku в клетке происходит меньшее привлечение комплекса 7SK РНК и Р-TEFb к промотору ВИЧ-1, что могло бы объяснять негативное влияние снижения уровня Ku на транскрипцию. Учитывая, что Р-TEFb является активатором стадии элонгации транскрипции, при таком предполагаемом механизме участия Ku в транскрипции генов ВИЧ-1 его влияние должно наблюдаться главным образом на стадии элонгации.

Определение стадии транскрипции, зависящей от Ku

После инициации транскрипции ВИЧ-1 сначала синтезируется небольшой фрагмент мРНК, который складывается в шпильку TAR, после чего наступает элонгационный блок. Связывание вирусного белка Tat с TAR РНК приводит к привлечению к промотору из комплекса 7SK мяРНП фактора Р-TEFb, который активирует элонгацию транскрипции, что приводит к синтезу полноразмерного вирусного транскрипта (K. Fujinaga, Mol. Cell. Biol., 2004). Следовательно, по изменению уровня синтезированных TAR и полноразмерной мРНК можно оценить стадию, на которую влияет тот или иной фактор. Мы измерили уровни вирусной полноразмерной мРНК и фрагмента TAR, синтезирующихся с вектора pNL4-3.Luc.R-E-, в клетках дикого типа и в клетках с моноаллельным нокаутом Ku70 и Ku80, трансфицированных этим вектором. Праймеры на TAR РНК показывают, насколько эффективно иницируется транскрипция, а праймеры на 3'НТО - уровень полноразмерной синтезированной мРНК, т.е. общую эффективность транскрипции (рис. 11А). Оказалось, что при нокауте Ku снижается и количество TAR РНК, и количество полноразмерной

вирусной РНК. Это свидетельствует о положительном влиянии Ku на стадию инициации транскрипции (рис. 11Б).

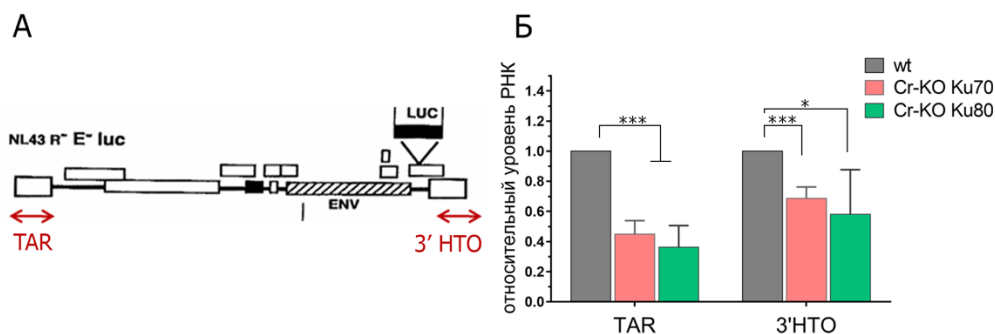


Рисунок 11. Влияние Ku на уровень разных фрагментов вирусной мРНК. (А). Схема вирусного генома в векторе pNL4-3.Luc.R-E- с указанием регионов TAR и 3'-нетранслируемой области (3'НТО), детектируемых праймерами при анализе уровня вирусной мРНК. **(Б).** Анализ уровня TAR РНК и полноразмерной вирусной РНК (3'НТО) в клетках дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70 и Ku80. Относительный уровень мРНК в клетках дикого типа принят за 1. Приведено среднее 3-х независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

При транскрипции активность РНКП II напрямую связана с фосфорилированием остатков серина в гептапептидных повторах С-концевого домена (СКД). В составе прединициаторного комплекса СКД не модифицирован. Форму РНКП II, фосфорилированную по Ser5 в СКД, называют инициаторной. Для активации элонгации транскрипции СКД РНКП II гиперфосфорилируется по Ser2, и такая форма называется элонгационной. По изменению количества фосфорилированных форм РНКП II, ассоциированных с промотором, можно судить об эффективности протекания той или иной стадии транскрипции. Для дополнительной проверки мы провели эксперимент по иммунопреципитации хроматина за антитела к фосфорилированным по Ser2 и Ser5 формам РНК полимеразы II (РНКП II-PhSer2 и РНКП II-PhSer5) из клеток линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV (рис. 12).

Во-первых, было установлено, что при снижении уровня Ku70 в клетках степень ассоциации гистона H3 с участками репортерного вектора (с промотором ВИЧ-1 и с геном люциферазы светлячка) и с участками геномной ДНК (ген GAPDH) не меняется (рис. 12А,Б). Во-вторых, нокаут Ku70 приводит к значительному снижению (примерно в 3 раза) уровня обеих фосфорилированных форм РНКП II на промоторе LTR ВИЧ-1, а также вдоль тела гена люциферазы светлячка, экспрессирующегося с промотора ВИЧ-1 (рис. 12В). При этом нокаут Ku70 не влияет на ассоциацию обеих фосфорилированных форм РНКП II с геном GAPDH (рис. 12Г). Таким образом, репрессия транскрипции с промотора ВИЧ-1 при снижении уровня Ku в клетке наблюдается в связи с пониженным количеством фосфорилированной РНКП II. Очевидно, Ku влияет на стадию инициации, в результате чего

при его снижении падает количество фосфорилированной по Ser5 инициаторной формы РНКП II и в результате этого также снижается количество и элонгационной формы. Таким образом, с помощью двух подходов было показано, что Ku, главным образом, влияет на инициацию транскрипции с промотора ВИЧ-1.

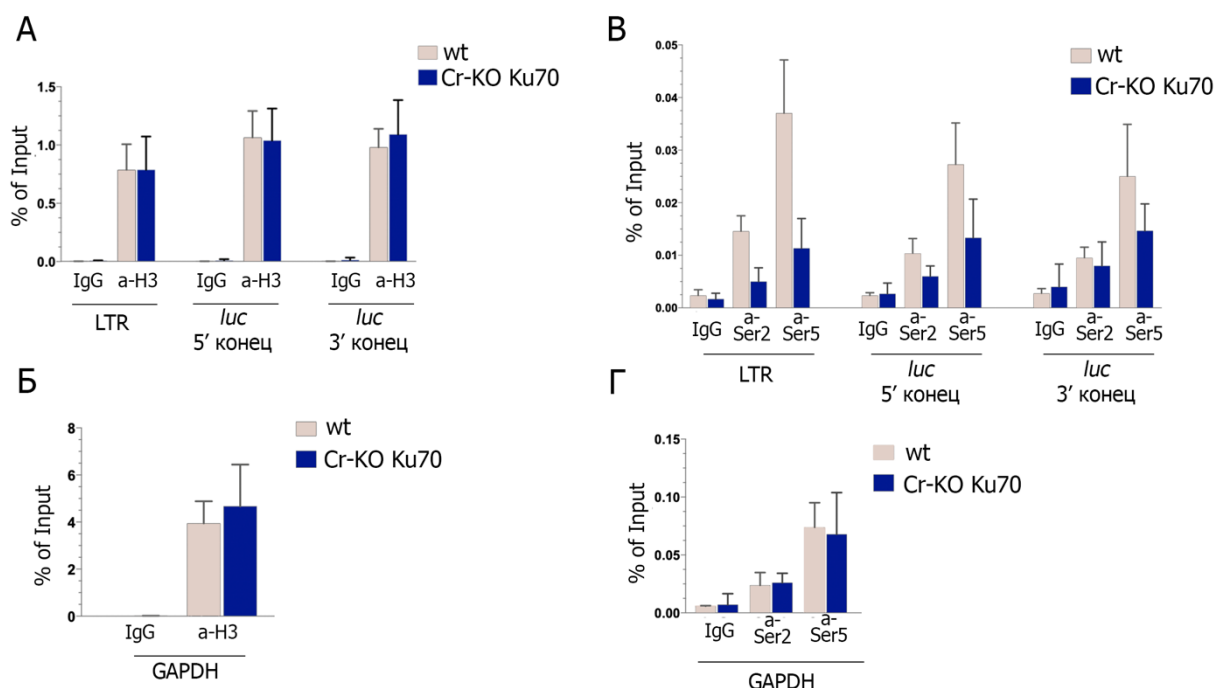


Рисунок 12. Иммунопреципитация хроматина в клетках НЕК 293Т дикого типа (wt) и с моноаллельным нокаутом Ku70 (Cr-KO Ku70). (А-Б). За антитела к гистону H3 с детекцией соосажденной ДНК количественной ПЦР с праймерами к участкам репортерного вектора (А) и к участкам геномной ДНК (гену GAPDH) (Б). **(В-Г).** За антитела к фосфорилированным формам РНКП II: к элонгационной (a-Ser2) и инициаторной (a-Ser5) с детекцией соосажденной ДНК количественной ПЦР с праймерами к участкам репортерного вектора (В) и к участкам геномной ДНК (гену GAPDH) (Г). Приведено среднее минимум 3 независимых повторов со стандартным отклонением.

Как было описано выше, Ku взаимодействует с комплексом 7SK мяРНП, который участвует в регуляции элонгации транскрипции. Мы предполагали, что это взаимодействие могло бы определять Ku-зависимую регуляцию транскрипции генов с промотора ВИЧ-1. Однако, учитывая обнаруженное нами влияние Ku, в первую очередь, на инициацию транскрипции, сложно объяснить положительный эффект Ku его участием в составе 7SK мяРНП. С другой стороны, существуют данные, демонстрирующие привлечение всего комплекса 7SK мяРНП к промотору ВИЧ-1 во время инициации транскрипции до образования TAR РНК и без участия белка Tat (G.Mousseau, Curr. Pharm. Des., 2017). Возможно, Ku привлекается на промотор в составе 7SK мяРНП и в этом заключается функциональная роль их взаимодействия.

Таким образом, нами впервые была показана ассоциация белка Ku с промотором ВИЧ-1 на плазмидном векторе и на интегрированном провире, где Ku стимулирует

инициацию транскрипции. В этом процессе Ku участвует без каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы и по TAR-независимому механизму. Ku взаимодействует с 7SK РНК, а также белками HEXIM1 и Cdk9, и, возможно, это взаимодействие определяет привлечение Ku к промотору ВИЧ-1.

5. Поиск возможных посредников Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1

Мы описали возможные направления поиска механизма Ku-опосредованной регуляции экспрессии ВИЧ-1, основанного на непосредственном участии Ku в этом процессе. Однако, есть еще и другой подход к объяснению причины влияния внутриклеточного уровня Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Возможно, что наблюдаемое влияние изменения уровня Ku на транскрипцию вызвано изменением уровня какого-нибудь другого клеточного фактора, который, в свою очередь, регулирует транскрипцию генов ВИЧ-1. В этой связи мы дополнительно провели аналитическую работу по поиску такого возможного фактора в данных транскриптомного и протеомного анализа клеточных линий с пониженным уровнем субъединиц Ku.

Поиск транскрипционных факторов, участвующих в регуляции транскрипции ВИЧ-1, в данных транскриптомного анализа

Мы решили проверить, экспрессия каких транскрипционных факторов меняется при изменении уровня Ku в клетках НЕК 293Т. Было проведено РНК-секвенирование транскриптомов клеточной линии НЕК 293Т в 4-х состояниях: клетки дикого типа, клетки с моноаллельным нокаутом Ku70, или Ku80, или DNA-PKcs.

Мы хотели из всех ДЕ генов для каждой из клеточных линий отобрать те, которые изменились при нокауте Ku70 и Ku80, но не DNA-PKcs, так как влияние на транскрипцию ВИЧ-1 оказывали именно Ku70 и Ku80, а не каталитическая субъединица. Мы считали дифференциально экспрессированными (ДЕ) гены с порогом на p-value с поправкой на множественное тестирование (padj) меньше, чем 0.05. Мы выбрали ДЕ гены по нокаутам Ku70 и Ku80, которые достоверно отличались по уровню экспрессии в обоих нокаутах от уровня в клетках дикого типа минимум в 1.4 раза и у которых изменение при нокауте DNA-PKcs было статистически незначимым. Таких генов оказалось 124. Поскольку в рамках этой работы мы искали изменения в экспрессии транскрипционных факторов, которые потом могли бы повлиять на транскрипцию ВИЧ-1, то из 124 генов мы отобрали те, которые согласно их GO (gene ontology) аннотации ассоциированы с регуляцией транскрипции. Таким образом, в нашей выборке осталась 21 гипотетическая ген-мишень. Поиск опубликованных работ по взаимосвязи каждого выбранного гена и ВИЧ-1 показал, что для 4 генов была показана их роль в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1: ATF3, TRIM56, CEBPG и JUND. При этом ATF3, CEBPG и JUND могут являться положительными регуляторами транскрипции ВИЧ-1, в то время как для TRIM56 данные противоречивы. Из

положительных регуляторов транскрипции в наших клетках с нокаутом по Ku снизилась экспрессия ATF3 (почти в 2 раза в клетках с нокаутом Ku70) и СЕВРР (почти в 1,5 раза в клетках с нокаутом Ku70), это позволило нам предположить, что негативный эффект нокаута Ku на промотор ВИЧ-1 мог быть вызван снижением уровня ATF3 и/или СЕВРР. Также интересным является ген гистон-метилтрансферазы SETD1A, уровень мРНК которой, с одной стороны, в 1,5 раза повышен в клетках с нокаутом Ku, с другой стороны, эта метилтрансфераза ассоциирована с репрессированным состоянием промотора ВИЧ-1. Таким образом, в результате проведенного исследования изменения транскриптома в ответ на снижение уровня Ku в клетке, гены ATF3, СЕВРР, TRIM56 и SETD1A могут быть предложены в качестве кандидатов, которые опосредуют влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

Поиск транскрипционных факторов, участвующих в регуляции транскрипции ВИЧ-1, в данных протеомного анализа

Кроме данных транскриптомного анализа, у нас также были данные и протеомного анализа изменения уровня белков в клетках с моноаллельным нокаутом Ku70 относительно клеток дикого типа, среди которых нам было необходимо найти факторы, участвующие в регуляции транскрипции ВИЧ-1 и со значительным изменением уровня белка.

Из идентифицированных 4315 уникальных находок-белков мы отобрали только те 388, у которых уровень в двух клеточных линиях отличался статистически значимо минимум в 1.4 раза (с Т-тест p-value менее 0.05). Среди всех идентифицированных белков не было белков ATF3, СЕВРР, TRIM56 и SETD1A, которые имели изменения уровня мРНК и были предложены нами в качестве возможных посредников Ku-зависимой регуляции ВИЧ-1. Из базы взаимосвязей между белками и процессами ВИЧ-1 и клеточными генами «HIV-1 Human Interaction Database» (NCBI) были получены списки генов, для которых известно влияние на репликацию ВИЧ-1 (1583 гена). Из них мы выбрали все те, которые вошли в список 388 генов со статистически значимым изменением уровня белка в клетках с нокаутом Ku70. Таких генов оказалось всего 38, включая сам ген белка Ku70. Среди них, надежные данные про участие белка в регуляции транскрипции ВИЧ-1 есть для 4: это две субъединицы комплекса Медиатор (MED4 и MED28), одна из субъединиц РНК полимеразы II (POLR2K) и транскрипционный фактор AP-4 (TFAP4). Субъединицы Медиатора и субъединица РНКП II необходимы для транскрипции ВИЧ-1 (A.Ruiz, J. Biol. Chem, 2014; H.Zhou, Cell. Host Microbe., 2008), однако, их уровень в клетке при подавлении Ku70 повышен в 2-3 раза. Следовательно, маловероятно, что повышение уровня этих белков при подавлении Ku может приводить к снижению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1. Отметим ген TFAP4, кодирующий транскрипционный фактор AP-4, поскольку вот этот белок как раз может выступать в качестве посредника Ku-зависимой регуляции транскрипции. Во-первых, его уровень возрастает почти в 2 раза при моноаллельном

нокауте Ku70. Во-вторых, он негативно регулирует транскрипцию с промотора ВИЧ-1, связываясь со своим сайтом на промоторе и мешая посадке ТАТА-бокс связывающего белка (TBP), что, соответственно, должно нарушать инициацию транскрипции (S.H.Ou, J.Virol., 1994; K.Imai, J. Biol. Chem., 2006), эффективность которой, как было нами показано, снижается в клетках с моноаллельным нокаутом Ku70. Таким образом, исходя из анализа данных протеомов клеток НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70, мы можем предложить в качестве потенциального фактора, который опосредует влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, белок AP-4, кодируемый геном TFAP4.

Описанный в этом разделе анализ открывает новое направление в поиске механизма Ku-зависимой регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что суперэкспрессия белка SFPQ приводит к повышению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1 в клеточной линии НЕК 293Т. Идентифицирован сайт связывания белка SFPQ внутри U3 региона вирусного LTR, который важен для регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 белком SFPQ.

2. Изучено влияние всех субъединиц ДНК-зависимой протеинкиназы на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Установлено, что гетеродимер Ku присутствует на промоторе ВИЧ-1 и положительно влияет на инициацию транскрипции с него. Это влияние не зависит от взаимодействия Ku с TAR РНК. Показано, что каталитическая субъединица DNA-PKcs не оказывает влияния на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

3. Получен препарат рекомбинантного белка His-Ku70/Ku80 и охарактеризованы его РНК-связывающие свойства. Показано, что Ku предпочтительно связывается со шпильчатыми РНК, имеющими выпетливание рядом с терминальной петлей, содержащей G-богатую последовательность, а сайт связывания РНК в структуре Ku совпадает с сайтом связывания ДНК.

4. Впервые показано взаимодействие Ku в клетке с белками комплекса 7SK РНП HEXIM1 и Cdk9 – важными регуляторами транскрипции генов ВИЧ-1. Обнаружено непосредственное взаимодействие Ku с 7SK РНК и определен сайт связывания Ku в первой петле 7SK РНК.

5. Проведен анализ транскриптомных данных для линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом одного из генов белков Ku70, Ku80, DNA-PKcs и протеомных данных для линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70. Предложены новые возможные участники Ku-зависимой регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1, которые могут определять влияние Ku на транскрипцию: ATF3, CEBPG, TRIM56, SETD1A и TFAP4.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Соискатель имеет опубликованных работ по теме диссертации 5, из них 5 статей, опубликованных, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 - молекулярная биология:

1. **Шадрина О.А.**, Княжанская Е.С., Королев С.П., Готтих М.Б. Клеточные белки Ku и HMGA1 как участники транскрипции ВИЧ-1 // Acta Naturae. – 2016. – Т.8 №1. – С.29-43., IF 1.360 (Web of Science)
2. Княжанская Е.С., **Шадрина О.А.**, Анисенко А.Н., Готтих М.Б. Роль ДНК-зависимой протеинкиназы в репликации ВИЧ-1 // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50, No 4. – С.639-654., IF 1.023 (Web of Science)
3. Knyazhanskaya E., Anisenko A., **Shadrina O.**, Kalinina A., Zatsepin T., Zalevsky A., Mazurov D., Gottikh M. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase // Retrovirology – 2019. – №16. – P.1-17. IF 4.183 (Web of Science)
4. **Shadrina O.**, Garanina I., Korolev S., Zatsepin T., Assche J.V., Daouad F., Wallet C., Rohr O., Gottikh M. Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex // Biochimie. – 2020. – №171-172. – P.110-123. IF 3.413 (Web of Science)
5. Anisenko A., Kan M., **Shadrina O.**, Brattseva A., Gottikh M. Phosphorylation Targets of DNA-PK and Their Role in HIV-1 Replication // Cells. – 2020. – V.9 №8. IF 4.366 (Web of Science)