

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шадрина Ольга Алексеевна

РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ KU И SFRQ В ТРАНСКРИПЦИИ ВИЧ-1

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
03.01.03 «Молекулярная биология»

Научный руководитель:
д.х.н., профессор Готтих Марина Борисовна

Москва – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
I. ВВЕДЕНИЕ	5
II. РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ KU, SFPQ И NONO И ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1 В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ВИЧ-1.....	11
/ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ/.....	11
2. 1. Жизненный цикл вируса иммунодефицита человека	11
2.1.1. Ранние этапы жизненного цикла ВИЧ-1	11
2.1.2. Поздние этапы жизненного цикла ВИЧ-1	13
2.2. Белок Ku и его роль в транскрипции ВИЧ-1	19
2.3. SFPQ, NONO и NEAT1 - основные компоненты параспеклей	23
2.4. Роль SFPQ, NONO и NEAT1 в репликации ВИЧ-1.....	30
2.5. Заключение.....	39
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
3.1. Буферы.....	41
3.2. Олигонуклеотиды и плазмиды	42
3.3. Антитела	45
3.4. Вестерн-блот анализ.....	46
3.5. Культивирование эукариотических клеток и получение лизатов для Вестерн-блот анализа	46
3.6. Получение и очистка рекомбинантных белков	47
3.7. Введение ³² P метки в олигонуклеотиды.....	48
3.8. <i>In vitro</i> транскрипция 7SK РНК.....	48
3.9. Анализ взаимодействия Ku с нуклеиновыми кислотами	48
3.10. Футпринтинг РНКазой T1	49
3.11. Анализ взаимодействия SFPQ с U3 регионом вирусного LTR.....	49
3.12. Футпринтинг ДНКазой I	50
3.13. Иммунопреципитация	50
3.14. Метод соосаждения белков	52
3.15. Изучение влияния белков на активность промоторов в репортерной системе	52
3.16. Анализ влияния изучаемых белков на уровень мРНК репортера	53
3.17. Анализ влияния белка Ku на транскрипцию с интегрированного провируса.....	53
3.18. Иммунопреципитация хроматина (ChIP).....	54
3.18.1. Определение присутствия Ku на промоторе ВИЧ-1	54
3.18.2. Определение присутствия фосфорилированных форм РНК полимеразы II на промоторе ВИЧ-1	55
3.19. Обработка данных	57

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	58
4.1. Влияние SFPQ на экспрессию с промотора ВИЧ-1	58
4.1.1. Создание репортерной системы для определения влияния исследуемых белков на транскрипцию ВИЧ-1	58
4.1.2. Белок SFPQ влияет на транскрипцию с промотора ВИЧ-1	59
4.1.3. Влияние SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 опосредовано взаимодействием SFPQ с участком ДНК в U3 регионе LTR.....	61
4.2. Участие DNA-PK в регуляции транскрипции ВИЧ-1	64
4.2.1. Подходы по изменению уровня субъединиц DNA-PK в клетке	64
4.2.2. Влияние субъединиц комплекса DNA-PK на транскрипцию ВИЧ-1	65
4.3. Поиск механизма влияния Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1	69
4.3.1. Ассоциация Ku с промотором ВИЧ-1	70
4.3.2. Получение препарата рекомбинантного гетеродимера Ku70/Ku80.....	73
4.3.3. Характеристика взаимодействия гетеродимера Ku со шпилечными РНК <i>in vitro</i>	78
4.3.4. Влияние взаимодействия Ku с TAR РНК на транскрипцию ВИЧ-1	90
4.3.5. Ku - новый компонент комплекса 7SK мРНК.....	90
4.3.6. Определение стадии транскрипции, зависящей от Ku.....	96
4.4. Поиск возможных посредников Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1... ..	101
4.4.1. Поиск транскрипционных факторов, участвующих в регуляции транскрипции ВИЧ-1, в данных транскриптомного анализа	101
4.4.2. Поиск транскрипционных факторов, участвующих в регуляции транскрипции ВИЧ-1, в данных протеомного анализа	107
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
VI. ВЫВОДЫ.....	115
VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116
Дополнительные материалы	134

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

7SK мяРНП	малый ядерный рибонуклеопротеин 7SK
Cdk9	циклин-зависимая киназа 9
ChIP	иммунопреципитация хроматина
CRS	cis-действующие репрессирующие последовательности
CycT1	циклин T1
DBHS	Семейство Drosophila behavior/human splicing
DNA-PK	ДНК-зависимая протеинкиназа
DNA-PKcs	Каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы
DSIF	5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor
eCLIP	enhanced crosslinking and immunoprecipitation
GST	glutathione S-transferase, глутатион-S-трансфераза;
INS	регионы нестабильности
LTR	long terminal repeat, длинный концевой повтор
NELF	negative elongation factor
NHEJ	non-homologous end joining, нехомологичное объединение концов;
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
PSP1	paraspeckle protein 1
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
RRE	Rev-responsive element
SFPQ	PSF polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor
SIM	микроскопия структурированного освещения
SINE	short interspersed nuclear element ретротранспозона
TAR	trans-activation response element
Tat	trans-activator of transcription
VSV-G	гликопротеин вируса везикулярного стоматита
APT	антиретровирусная терапия
BART	высокоактивная антиретровирусная терапия
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ДСН-ПААГ	Полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия
НТО	нетранслируемая область
ПИК	прединтеграционный комплекс
РНКП II	РНК-полимераза II
СКД	С-концевой домен РНК-полимеразы II
СПИД	Синдром приобретенного иммунодефицита

I. ВВЕДЕНИЕ

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. Прерывание приема препаратов АРТ неизбежно приводит к возобновлению вирусной репликации и повышению титра вируса в крови. 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 трансплантацию костного мозга для замены стволовых клеток крови на невосприимчивые к ВИЧ-1 инфекции, редактирование вирусного генома, а также стратегии “shock and kill” или “lock and block”. В отличие от первых двух стратегий, две последние заключаются в воздействии на вирусную транскрипцию химическими соединениями и могут более легко и широко применяться для лечения миллионов ВИЧ-инфицированных. 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.

Изучение клеточных белков, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1, крайне актуально, поскольку в перспективе поможет детально понять особенности процесса регуляции транскрипции ВИЧ-1 и, в частности, механизм поддержания и выхода из латентности, что может позволить найти подходы к его регуляции.

Хотя влияние многих факторов, участвующих в транскрипции генов ВИЧ-1, уже детально исследовано, все еще есть такие, влияние которых на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 достоверно не изучено. В частности, 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. В связи с этим, в настоящей работе проведено исследование роли белков SFPQ и Ku в регуляции транскрипции генов ВИЧ-1.

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.

Учитывая, что для белка SFPQ ранее не предполагалось влияния на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, а для Ku такие данные существуют, и они достаточно противоречивы, основное внимание в данной работе уделяется поиску механизма влияния Ku на транскрипцию генов ВИЧ-1.

Для достижения цели были поставлены 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

Белок SFPQ является РНК-связывающим белком и ключевым компонентом ядерных структур - параспеклей. Неоднократно отмечалась его роль в регуляции разных этапов репликации ВИЧ-1, однако единого мнения о механизме и даже степени влияния нет. В данной работе впервые проведено исследование влияния SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в репортерной системе. Впервые показано, 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 интегрированного провируса показано в нескольких работах. В них эффект Ku на экспрессию вирусных генов наблюдался только непосредственно после интеграции вирусного генома в геном клетки-хозяина, 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 также 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, это взаимодействие определяет привлечение Ku на промотор ВИЧ-1. Впервые установлено, что Ku важен для стадии инициации транскрипции.

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: ATF3, CEBPG, 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. Плазмидные конструкции, использованные в работе, были получены стандартными методами молекулярного клонирования. В работе использовался общепринятый подход по определению влияния белка на экспрессию с тестируемого промотора: был использован репортерный вектор на базе вектора pGL3, 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, полученные ранее методом CRISPR/Cas9 редактирования. Эффективность изменения уровня белка оценивали методом Вестерн-блот. Влияние

изменения концентрации исследуемого белка на экспрессию люциферазы оценивали по уровню люминесценции лизата и/или по уровню синтезированной мРНК люциферазы. Для работ по характеристике ДНК и/или РНК-связывающих свойств исследуемого белка *in vitro* белки экспрессировали в *E.coli* и очищали стандартными хроматографическими методами. В нуклеиновые кислоты (НК) вводили радиоактивную метку ^{32}P на 5'-конец, а взаимодействие 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 с соответствующими антителами с последующей детекцией фрагмента ДНК с помощью ПЦР в реальном времени. Для изучения взаимодействия белка Ku с 7SK РНК в клетке применялся метод иммунопреципитации РНК с соответствующими антителами с последующей детекцией 7SK РНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Анализ последовательностей белков и генов проводился с помощью программы Blast, анализ и визуализация структуры белков проводились в программах ChimeraX или PyMol. Анализ и статистическая обработка результатов экспериментов проводились в Microsoft Excel и GraphPad Prism7. 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. Анализ данных эксперимента eCLIP был выполнен Гараниной И.Д. (Лаборатория протеомного анализа ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Россия).

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.

II. РОЛЬ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ KU, SFRQ И NONO И ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1 В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ВИЧ-1

/ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ/

2. 1. Жизненный цикл вируса иммунодефицита человека

2.1.1. Ранние этапы жизненного цикла ВИЧ-1

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) принадлежит к роду лентивирусов (*Lentivirus*) семейства ретровирусов (*Retroviridae*). Он поражает иммунную систему организма человека и вызывает синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Как и в случае других лентивирусов, геном ВИЧ-1 представлен одноцепочечной молекулой (+)РНК, на основе которой вирусным ферментом обратной транскриптазой синтезируется ДНК, которая затем в ходе процесса интеграции встраивается в геном клетки, образуя провирус. Геном встроенного провируса включает гены *gag* (кодирует капсидный белок p24, нуклеокапсидные белки p6 и p7 и матриксный белок p17), *pol* (кодирует ферменты: обратную транскриптазу, протеазу и интегразу) и *env* (кодирует белок внешней оболочки вируса gp160, процессируемый протеазами до gp120 и gp41). Кроме них, в составе генома есть еще гены *tat*, *rev*, *vpr*, кодирующие белки, участвующие в регуляции экспрессии вирусных генов, и *nef*, *vif*, *vpr*, отвечающие за способность ВИЧ-1 инфицировать клетки, подавлять системы внутриклеточной защиты. На концах провирусной ДНК имеются 2 одинаковых длинных концевых повтора (LTR – long terminal repeat), необходимые для интеграции вирусной ДНК в геном клетки и содержащие последовательности для регуляции экспрессии генов ВИЧ-1 (Рисунок 1) [1].

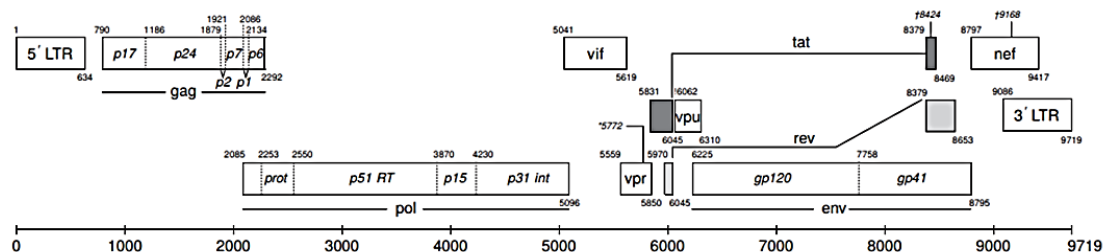


Рисунок 1. Схема строения генома ВИЧ-1 в составе встроенного провируса [1].

Репликативный цикл ВИЧ-1 условно можно разделить на две фазы: раннюю и позднюю. Ранняя фаза начинается с узнавания клетки-мишени зрелым вирионом и включает все процессы, ведущие к интеграции вирусной ДНК в геном зараженной клетки.

Поздняя начинается с регулируемой экспрессии интегрированного провирусного генома и заканчивается отпочковыванием и созреванием вируса.

Во время ранней фазы поверхностный гликопротеин gp120 вирионов ВИЧ-1 связывается с рецептором CD4 на поверхности клеток, что обеспечивает его взаимодействие с корецепторами CCR5 или CXCR4. Взаимодействие с корецепторами запускает ряд конформационных изменений в трансмембранной части гликопротеинов gp120 и gp41, обеспечивая слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны [1,2].

Вирион содержит две молекулы РНК, ассоциированные с нуклеокапсидными белками, обратной транскриптазой и интегразой. Генетический материал упакован в капсид, состоящий из капсидного белка р24. Вслед за проникновением вируса в клетку следуют процессы «распаковки» вируса и высвобождения в цитоплазму клетки пред-транскрипционного комплекса. Обратная транскрипция геномной РНК осуществляется вирусной обратной транскриптазой в цитоплазме. Результатом этого процесса является получение ДНК-копии геномной РНК вируса. Эта двухцепочечная ДНК транспортируется в ядро в составе прединтеграционного комплекса (ПИК). По данным разных исследований, ПИК кроме вирусных белков (обратная транскриптаза, интеграза, Vpr, p7, p17 [3]) включает и ряд клеточных белков, при этом от исследования к исследованию состав прединтеграционного комплекса меняется из-за использования разных подходов для определения его компонентов [4–10]. Наиболее часто встречающиеся участники ПИКа – клеточные белки LEDGF [7], BAF [9], Ku70 [8], HMG-I/Y [10]. После транспорта в ядро вирусная ДНК встраивается в геном зараженной клетки благодаря каталитической активности вирусного фермента интегразы с образованием провирусной ДНК.

Основной функциональной формой вирусной ДНК при ВИЧ-1 инфекции является линейный интегрированный провирус, тем не менее, при заражении клетки подавляющее количество вирусной ДНК остается невстроенной [11]. Такая ДНК в ядре существует как в линейной форме, которая быстро деградирует, так и в кольцевой. Концы вирусной ДНК могут соединяться путем негомологичного объединения и образовывать так называемые 2-LTR кольца. Может происходить гомологичная рекомбинация между двумя LTR, в результате чего образуется кольцевая форма с одним LTR участком. Также может происходить автоинтеграция вирусной линейной ДНК (Рисунок 2). С кольцевых форм вирусной ДНК может осуществляться транскрипция, однако основной матрицей для синтеза вирусных белков служит именно интегрированная форма провируса [12,13]. Следовательно, формирование интегрированного провируса – необходимый шаг для эффективной транскрипции и репликации ВИЧ-1.

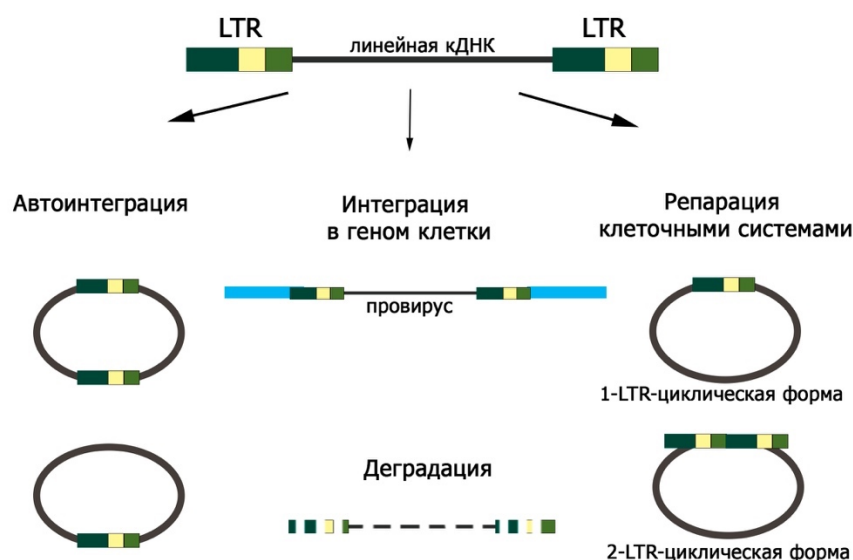


Рисунок 2. Формы существования ДНК ВИЧ-1 в зараженной клетке. В результате обратной транскрипции получается линейная кДНК, которая может быть интегрирована в геном с образованием функционального провируса, или образовывать кольцевые формы вирусной ДНК через разные механизмы. Оставшиеся линейные молекулы вирусной ДНК подвергаются дегградации. (По работе [13]).

2.1.2. Поздние этапы жизненного цикла ВИЧ-1

Поздние этапы жизненного цикла ВИЧ-1 начинаются после интеграции вирусной ДНК в геном. Провирус может находиться в латентном (молчащем) состоянии, когда с вирусного промотора идет базальная транскрипция, без активации вирусными и/или клеточными белками, что приводит к образованию только коротких abortивных продуктов. В таком случае инфекция протекает латентно, пока не произойдет активация транскрипции провируса. Провирус, находящийся в латентном состоянии, не подвергается воздействию применяемой в настоящее время антиретровирусной терапии и содержащие его клетки не могут быть распознаны иммунной системой. Активная транскрипция генов ВИЧ-1 приводит к накоплению полноразмерной вирусной РНК и сборке новых вирусных частиц.

Регуляция транскрипции генома ВИЧ-1 - сложный процесс, зависящий от места интеграции вирусного генома в геном клетки хозяина, клеточных транскрипционных факторов, вирусного транс-активатора Tat, эпигенетических модификаций и степени конденсации хроматина [14–16]. Как уже упоминалось, на обоих концах вирусной ДНК, интегрированной в клеточный геном, располагаются длинные концевые повторы (LTR). Они включают три региона: U3, R, U5 (Рисунок 3). Промотор вируса, узнаваемый РНК-полимеразой II (РНКП II) находится рядом с границей U3 и R, и транскрипция начинается на их границе. 5'LTR можно разделить на 4 функциональных участка: модуляторный

регион, энхансер, промотор и лидерный регион [17]. Многие клеточные транскрипционные факторы имеют сайты связывания в 5'LTR, среди них для активации инициации транскрипции с вирусного промотора наиболее важны– NF-κB, NFAT, Sp1, AP-1 (Рисунок 3) [14,15,17] .

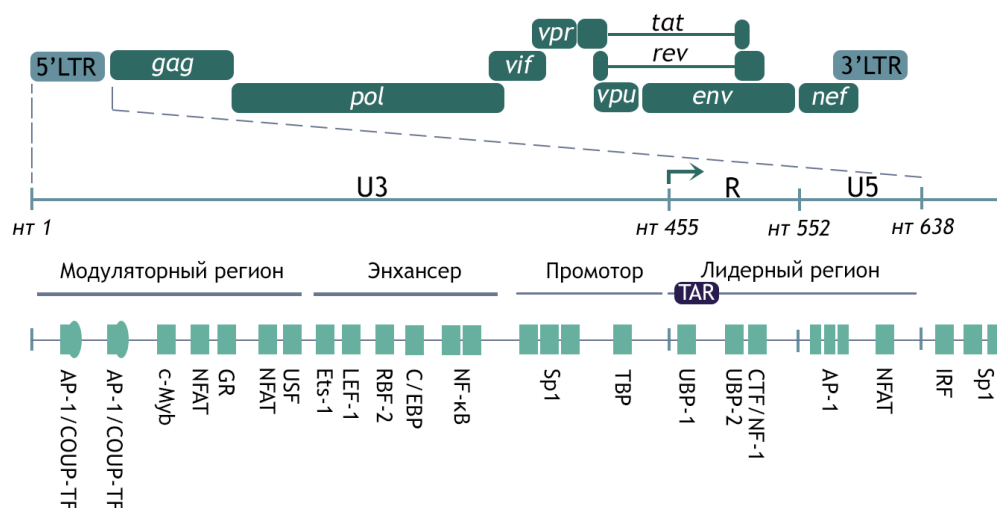


Рисунок 3. Сайты связывания транскрипционных факторов в 5'LTR ВИЧ-1. Схематичное представление провируса ВИЧ-1 и основных сайтов связывания факторов транскрипции. Указано положение регионов 5'LTR: U3 (1-455 нт), R (456-552 нт), U5 (553-638). Старт транскрипции показан стрелкой и соответствует границе регионов U3 и R. Из [16].

В транскрипционно-неактивном состоянии с вирусным промотором связана неактивная форма NF-κB – гомодимер p50/p50. При перемещении в ядро активной формы NF-κB – гетеродимера p50/RelA – происходит вытеснение p50/p50 с 5'LTR [18,19]. Взаимодействие RelA и киназы Cdk7, входящей в состав фактора транскрипции TFIIH, стимулирует фосфорилирование Ser5 в гептапептидных повторах (YSPTSPS)₅₂ С-концевого домена РНКП II (СКД). Таким образом, запускается инициация транскрипции (Рисунок 4) [18,19].

При транскрипции активность РНКП II напрямую связана с фосфорилированием остатков серина в ее СКД. В составе прединициаторного комплекса СКД не модифицирован. Его частичное фосфорилирование по Ser5 осуществляет фактор транскрипции TFIIH. В результате РНКП II покидает промотор и начинает транскрипцию, но после синтеза короткой цепи мРНК наступает пауза. РНКП II останавливается, с ней связаны репрессирующие элонгационные факторы NELF (negative elongation factor) и DSIF (5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor) [20].

Переход в стадию активной элонгации происходит после гиперфосфорилирования остатков Ser2 в СКД, которое осуществляет фактор элонгации транскрипции P-TEFb

(positive transcription elongation factor b). Также P-TEFb фосфорилирует NELF и DSIF [21]. После фосфорилирования NELF диссоциирует с промотора, без которого DSIF может быть положительным фактором транскрипции. При этом снимается элонгационный блок и фосфорилированная РНКП II продолжает эффективно транскрибировать полноразмерную мРНК [22,23].

P-TEFb человека состоит из циклин-зависимой киназы 9 (Cdk9) и циклина T1 (CycT1). Количество P-TEFb в клетке регулируется за счет его включения в малый ядерный рибонуклеопротеин 7SK (7SK мяРНП). Этот комплекс состоит из некодирующей ядерной РНК 7SK и ассоциированных с ней белков: HEXIM1 или HEXIM2, LARP-7 и MEPS. В составе 7SK мяРНП HEXIM ингибирует киназную активность фактора P-TEFb за счет взаимодействия с CycT1 и не позволяет обеспечивать элонгацию транскрипции [24,25].

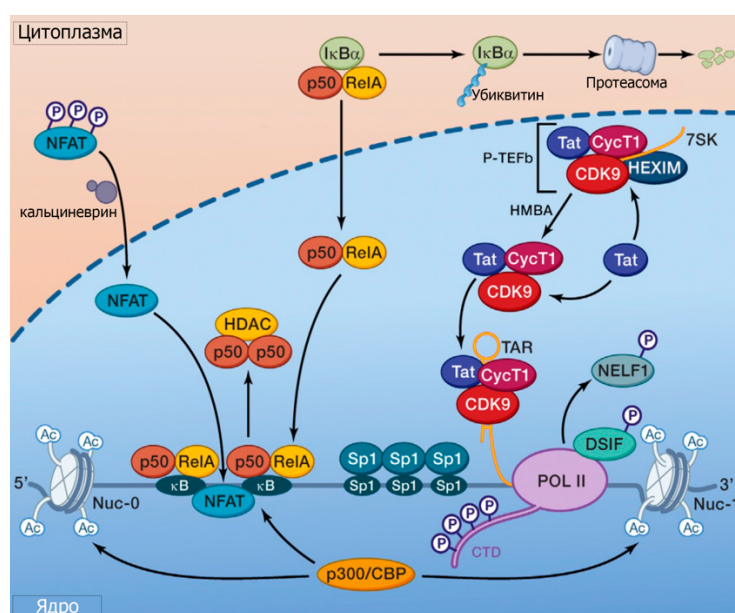


Рисунок 4. Инициация и элонгация транскрипции на 5'LTR ВИЧ-1. После получения внешнего стимула NFAT и NF-κB перемещаются в ядро и связываются с сайтами в составе 5'LTR ВИЧ-1. При Tat-зависимой элонгации белок Tat привлекает к TAR РНК комплекс P-TEFb. Cdk9 фосфорилирует С-концевой домен РНКП II, факторы транскрипции DSIF и NELF. Это приводит к удалению NELF из комплекса с РНКП II, превращению DSIF в активатор транскрипции и повышению процессивности РНКП II [18].

Такой же элонгационный блок происходит и при транскрипции с промотора ВИЧ-1. После инициации синтезируются короткие abortивные транскрипты длиной около 60-80 нуклеотидов, которые формируют РНК-шпильку TAR (trans-activation response element). Вирусный белок Tat (trans-activator of transcription) специфично связывается с TAR РНК и является сильным активатором элонгации транскрипции, в присутствии которого эффективность синтеза вирусной РНК возрастает на порядки: до 99% транскриптов получаются полноразмерными [18]. Tat конкурирует с HEXIM1 за субъединицу CycT1

фактора Р-TEFb и способствует диссоциации Р-TEFb из комплекса с 7SK мРНК. Tat, связываясь с TAR РНК, привлекает активный Р-TEFb на вирусный промотор, тем самым обеспечивая гиперфосфорилирование РНКП II и, как следствие, элонгацию транскрипции (Рисунок 4) [22,23].

Терминация транскрипции происходит в конце региона R в 3'-концевом LTR, содержащем последовательность AAUAAA, являющуюся сигналом 3'-процессинга и полиаденилирования пре-мРНК [26,27]. Получившийся транскрипт длиной порядка 9 kb в дальнейшем проходит альтернативный сплайсинг для получения мРНК, кодирующих все вирусные белки. Вирусная пре-мРНК содержит 4 различных донорных сайта сплайсинга и 8 акцепторных [27]. В каждой сплайсированной мРНК присутствует главный донорный сайт D1, расположенный после окончания 5'LTR, таким образом, все мРНК ВИЧ-1 имеют в 5'-нетранслируемой области первый экзон со сложной вторичной структурой (Рисунок 5). Сплайсированные формы включают неполностью-сплайсированные мРНК (длиной порядка 4 kb), кодирующие Env и Vpu, Vif, Vpr, и полностью сплайсированные мРНК, кодирующие регуляторные белки Tat, Rev, Nef. Полноразмерный несплайсированный транскрипт служит матрицей для трансляции полипептидов Gag и Pol, а также является геномной РНК, включаемой в вирионы.

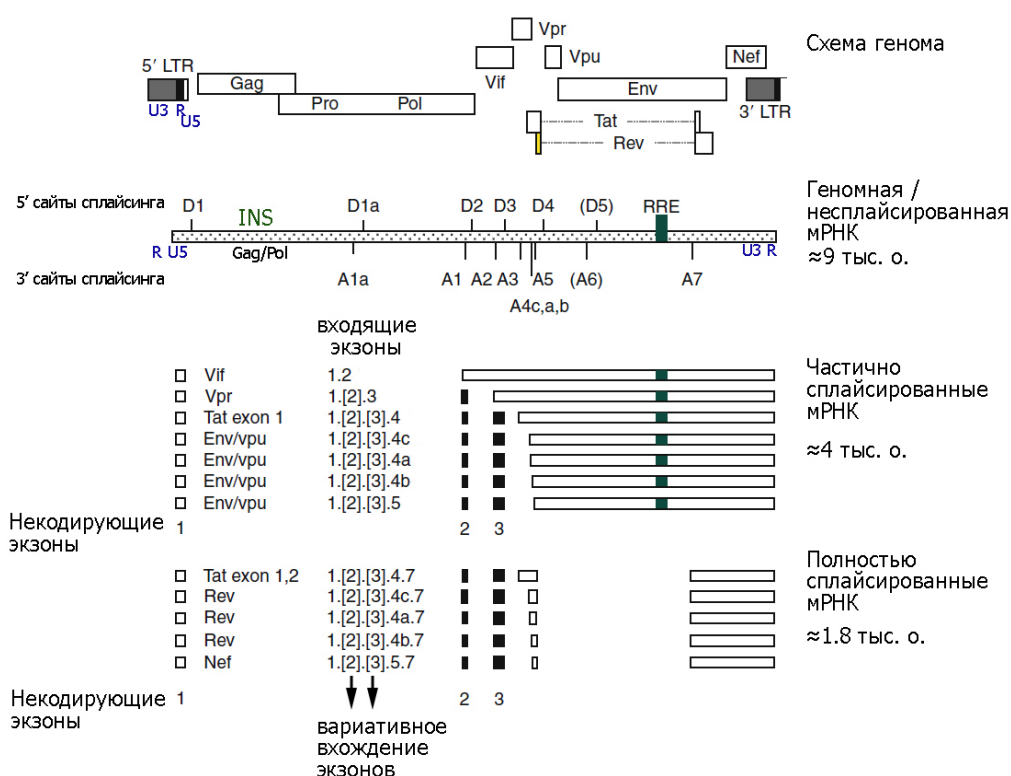


Рисунок 5. Положение сайтов сплайсинга и экзонов в геноме ВИЧ-1. Схематично обозначены донорные (D1-D5) и акцепторные (A1-A7) сайты сплайсинга. Указаны номера экзонов, входящих в разные сплайсированные формы вирусной мРНК. Экзоны в квадратных скобках могут

присутствовать оба, по одному или не присутствовать вообще в составе соответствующей мРНК. Адаптировано из [28].

Полностью сплайсированные мРНК, кодирующие Tat, Rev, Nef, экспортируются в цитоплазму, как и обычные клеточные мРНК. Несплайсированная и неполностью сплайсированные мРНК содержат интроны, и для экспорта таких РНК из ядра вирус использует свой регуляторный белок Rev (Рисунок 6) [26,27,29,30]. Он взаимодействует со структурированной областью в РНК, названной Rev-responsive element (RRE), расположенной в гене *env*. Первая молекула Rev, связавшись с RRE последовательностью, привлекает следующие мономеры белка. Степень олигомеризации Rev на RRE коррелирует с эффективностью экспорта этой РНК из ядра. Rev в комплексе с РНК взаимодействует с экспортином 1 (Crm1) и, таким образом, обеспечивает экспорт вирусной РНК через ядерную пору. В цитоплазме после диссоциации от РНК Rev взаимодействует с импортином-β и импортируется обратно в ядро. В цитоплазме начинается синтез вирусных белков, необходимых для сборки новых вирионов, и поздние этапы репликативного цикла завершаются сборкой и отпочковыванием вирусных частиц [26,29,30].

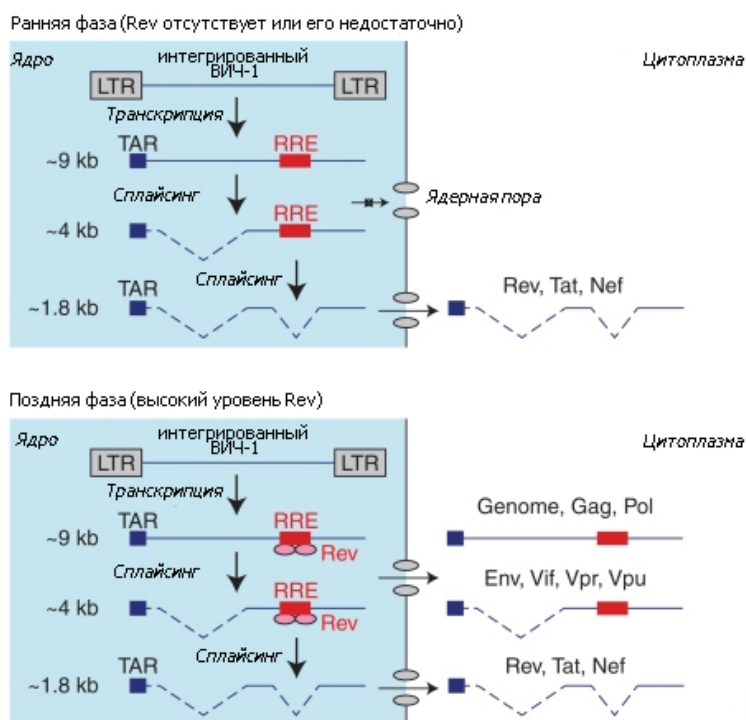


Рисунок 6. Ранняя и поздняя стадии экспрессии генов ВИЧ-1. Вирусная мРНК проходит стадии сплайсинга, в раннюю фазу в отсутствие в клетке Rev или при его недостаточном количестве геномная мРНК и частично сплайсированные формы удерживаются в ядре, сплайсируются дальше или деградируют. Полностью сплайсированная мРНК экспортируется из ядра для трансляции Rev, Tat, Nef. В поздней фазе Rev связывается с RRE элементом в геномной и частично-сплайсированных мРНК и способствует их экспорту из ядра. Адаптировано из [27].

В отсутствие Rev несплайсированная и неполностью сплайсированные мРНК удерживаются в ядре и деградируют [27,31]. Они содержат *cis*-действующие репрессирующие последовательности (CRS) и регионы нестабильности (INS), расположенные в *gag/pol* и *env* генах [31–34]. Эти элементы понижают стабильность мРНК, мешают транспорту мРНК из ядра в цитоплазму, ухудшают трансляцию этих РНК в отсутствие Rev. Некоторые из элементов INS содержат AU-богатые последовательности AUUUA, являющиеся сигналом для деградации мРНК [33]. Элементы взаимодействуют с рядом ядерных белков (включая поли(А)-связывающий белок PABP1, гетерогенный рибонуклеопротеин A1 hnRNP A1 [35,36]). Предполагается, что эти белки мешают распознаванию частично сплайсированных мРНК сплайсосомой и способствуют взаимодействию РНК с белком Rev, однако точные механизмы регуляции жизненного цикла мРНК, содержащих INS, неясны [31].

Во время жизненного цикла ВИЧ-1 взаимодействует со многими клеточными белками, которые могут участвовать в регуляции репликации вируса как негативно, так и позитивно. С развитием высокопроизводительных технологий для скрининга становятся известны все новые клеточные белки, взаимодействующие с вирусными белками и/или влияющие на эффективность репликации ВИЧ-1. Не для всех из них однозначно определена роль в жизненном цикле вируса, а их изучение необходимо для понимания механизмов взаимодействия вируса с клеткой. В нашей лаборатории изучается роль в репликации ВИЧ-1 клеточного белка Ku – одного из компонентов системы репарации двуцепочечных разрывов ДНК по классическому пути негомологичного объединения концов (non homologous end-joining, cNHEJ).

Так, было показано, что белок Ku взаимодействует с интегразой ВИЧ-1 и это взаимодействие важно для репарации повреждений ДНК в месте интеграции провируса [37–39]. Участие Ku в репликации ВИЧ-1 было нами уже описано в нескольких опубликованных обзорах [16,40,41], поэтому в данной главе диссертации приведены лишь краткие сведения о роли белка Ku в транскрипции ВИЧ-1 для ознакомления читателя с проводимыми в настоящее время исследованиями. С другой стороны, в ходе выполнения диссертационной работы были найдены белки SFPQ и NONO, которые взаимодействуют с Ku и являются положительными факторами в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по пути NHEJ. Существует ряд работ, посвященных влиянию SFPQ и NONO на репликацию ВИЧ-1, однако полной картины их участия в ней нет, поэтому данный обзор литературы в основном направлен на поиск и систематизацию данных о роли SFPQ и NONO в жизненном цикле ВИЧ-1.

2.2. Белок Ku и его роль в транскрипции ВИЧ-1

Белок Ku человека является высокопредставленным в клетке ДНК-связывающим белком и состоит из субъединиц массой 70 кДа (известной как Ku70 (607 а.о.) и закодированной в гене *XRCC6*) и 83 кДа (Ku80 (732 а.о), ген *XRCC5*). Свои основные функции белок выполняет в виде гетеродимера, при этом одна субъединица в клетке стабилизирует другую [42,43]. Обе субъединицы содержат 3 домена: на N-конце структурный домен фон Виллебранта А (vWA), центральный ДНК-связывающий домен (DBC – DNA-binding core) и спиральный C-концевой домен. Две субъединицы димеризуются посредством взаимодействия центральных доменов. Согласно рентгеноструктурному анализу гетеродимера [44], субъединицы Ku формируют замкнутое ассиметричное кольцо в виде корзины с ручкой (Рисунок 7). Канал внутри корзины состоит преимущественно из положительно заряженных аминокислот, взаимодействующих с отрицательно заряженным сахарно-фосфатным остовом молекулы ДНК, что объясняет способность Ku связываться с ДНК, независимо от ее последовательности. Считается, что для связывания Ku с ДНК достаточно 14-звенного дуплекса [44].

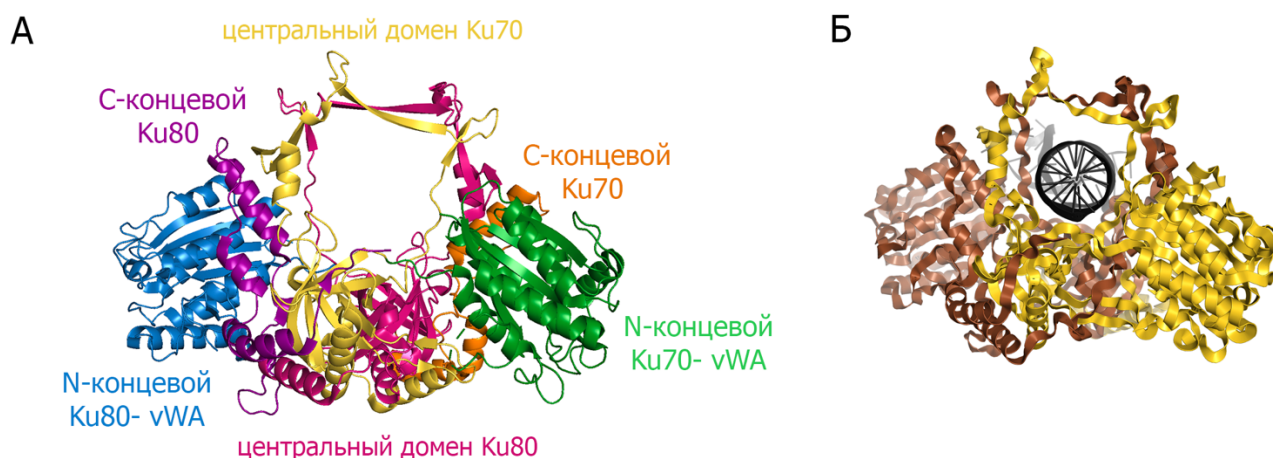


Рисунок 7. Структура гетеродимера Ku. (А). Домены гетеродимера Ku. **(Б).** ДНК погружается в канал, образуемый центральными доменами Ku70 (желтый) и Ku80 (коричневый), ДНК – черный. PDB-ID 1JEY.

Главная и самая изученная функция Ku в клетке - участие в репарации двунитевых разрывов ДНК по классическому пути негомологичного объединения концов (non homologous end-joining, cNHEJ) [44,45]. В этом процессе гетеродимер Ku связывается с концами ДНК, защищая их от деградации и удерживая вместе, после чего с субъединицей Ku80 связывается каталитическая субъединица DNA-PKcs (ген *PRKDC*, относится к семейству фосфатидилинозитол-3-киназ-подобных киназ (phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinase family, PIKK)), и все три белка формируют холофермент - ДНК-зависимую

протеинкиназу DNA-PK [46]. DNA-PK выступает основой для формирования мультибелкового комплекса, участвующего в репарации. Затем DNA-PK, активированная связыванием с концами ДНК, автофосфорилируется и может фосфорилировать лигазу IV, необходимую для успешной репарации [47,48]. Кроме участия Ku в репарации двунитевых разрывов, гетеродимер также вовлечен в широкий спектр клеточных процессов, среди которых V(D)J-рекомбинация, поддержание длины теломер, репликация ДНК, репарация AP-сайтов, регуляция клеточного цикла и апоптоз [49].

Еще одним важнейшим процессом, в котором участвует Ku, является транскрипция, хотя единого представления об участии Ku и DNA-PK в транскрипции клеточных генов пока нет. Известно, что гетеродимер Ku подавляет биосинтез рРНК, осуществляемый РНК полимеразой I [50]. При транскрипции кодирующих мРНК, осуществляемой РНКП II, DNA-PK в целом и отдельные ее субъединицы могут быть как активаторами, так и репрессорами, и функционировать как вместе, так и отдельно. Участие DNA-PK в транскрипции отдельных генов осуществляется различными способами: DNA-PK может регулировать транскрипцию как с использованием ДНК-связывающей активности гетеродимера Ku, так и в результате белок-белковых взаимодействий с другими факторами транскрипции и модуляции их активности, в частности, за счет их фосфорилирования [16]. Считается, что Ku может напрямую связываться с промоторами некоторых генов: Hsp70, *c-myc*, мРНК U1 [51–53]. Однако, механизм сиквенс-специфичного связывания Ku с внутренними участками промоторов пока непонятен. Показано влияние Ku на экспрессию транскрипционных факторов, в частности субъединицы p50 фактора NF-κB [54] и субъединицы c-jun фактора AP1 [55]. Оба этих транскрипционных фактора являются важнейшими регуляторами транскрипции генов ВИЧ-1. Существуют данные о влиянии Ku на общий уровень транскрипции РНКП II. В экспериментах *in vitro* уровень транскрипции в ядерных лизатах клеток с нокаутом генов DNA-PKcs и Ku80 был в 2-7 раз ниже, чем в клетках дикого типа [56]. Предполагается, что белок Ku участвует в ре-инициации после первого раунда транскрипции [57]. Кроме того, в ядре субъединица Ku80 ко-локализуется с сайтами элонгации транскрипции РНКП II, а с помощью ко-иммунопреципитации подтвержден факт взаимодействия элонгационной формы РНКП II и белка Ku [58]. *In vitro* РНКП II может быть субстратом для фосфорилирования DNA-PK [59–61]. Стоит заметить, что в большинстве работ сообщается только о присутствии Ku/DNA-PK на промоторе или взаимодействии с каким-либо белком и о влиянии Ku/DNA-PK на экспрессию с этого промотора. Точные механизмы воздействия DNA-PK на транскрипцию с клеточных промоторов обычно не описаны.

Еще менее понятна роль Ku в регуляции транскрипции с промотора интегрированного провируса ВИЧ-1. В некоторых работах сообщается о репрессирующем влиянии субъединицы Ku80 на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в клеточной линии СНО [62,63]. При этом в работе 2007 г. [63] описан негативный эффект Ku80 на транскрипцию с лентивирусных векторов вне зависимости от используемого в них промотора, в то время как эффекта на транскрипцию с плазмидных векторов с теми же промоторами не наблюдалось. С помощью метода FISH было показано, что в отсутствие Ku80 сайты интеграции провируса распределены случайным образом по ядру, в то время как в клетках с нормальным уровнем Ku80 провирус распределен в большей степени по периферии ядра. Авторы предположили, что Ku80 может участвовать в направленной интеграции провируса на периферии ядра, при этом, вероятно, в районы гетерохроматина, что объясняло бы негативный эффект белка Ku80 на транскрипцию провируса. Однако в 2019 г. на первичных CD4⁺ Т-клетках было установлено, что горячие точки интеграции ВИЧ-1 ассоциированы с регионами генома, называемыми супер-энхансерами, что поддерживает транскрипционную активность провируса [64]. Более того, стало известно, что такие регионы ДНК связываются с белками ядерной поры (в частности нуклеопоринами Nup93 и Nup153), и имеют тенденцию к распределению как раз на периферии ядра [65]. В работе 2015 г. другой группой независимо было показано, что предпочтительные места интеграции находятся как раз на периферии ядра вблизи ядерных пор в регионах с повышенной транскрипционной активностью, и что для выбора сайта интеграции, кроме известного партнера интегразы белка LEDGF/p75, необходим нуклеопорин Nup153 [66], с которым также было показано взаимодействие белка капсида в прединтеграционном комплексе [67]. Возможно, что отмеченное еще в работе [63] более случайное распределение мест интеграции при снижении уровня Ku80 в клетке может быть рассмотрено с другой стороны: в более поздних работах на клеточных линиях человека наблюдалось положительное влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, и отсутствие Ku80 могло влиять на переход точек интеграции из активно-транскрибируемых периферийных регионов в равномерное распределение по ядру.

В других работах на разных человеческих клеточных линиях показано положительное влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Так, подавление экспрессии субъединицы Ku80 с помощью введения siRNA и антисенсов приводило к снижению Tat-активированной транскрипции ВИЧ-1 в клетках линии MAGI при трансдукции репортер-содержащими лентивирусными векторами на основе ВИЧ-1 [68]. При использовании клеточной линии HCT116 Ku80^{+/-}, в которой содержание Ku80 снижено в 2 раза, а также понижен уровень Ku70, наблюдалось достоверное снижение

эффективности транскрипции с лентивирусных векторов на основе ВИЧ-1 [69]. Положительное влияние Ku более ярко проявлялось при базальной транскрипции непосредственно после процесса интеграции. Однако, как было показано позже в работах [38,39], Ku и DNA-PKcs являются важными факторами репарации разрывов ДНК в месте интеграции провируса, что, вероятно, может частично объяснять положительный эффект Ku на транскрипцию репортера с лентивирусного вектора в работах [68,69]. Тем не менее, в работе [68] отмечается, что снижение уровня Ku80 также оказывало негативный эффект на экспрессию репортера с промотора ВИЧ-1 при трансдукции клеток лентивирусными частицами, несущими каталитически-неактивную интегразу. В таком эксперименте процесса интеграции не происходило, и влияние Ku80 на экспрессию репортера может быть обусловлено его эффектом на транскрипцию с неинтегрированных вирусных форм.

На линии лимфоидных клеток человека Jurkat-E4, содержащим провирус в латентном состоянии, было показано увеличение содержания каталитической субъединицы DNA-PKcs на промоторе ВИЧ-1 в ответ на активацию транскрипции провируса с помощью TNF- α [70], который является классическим активатором инициации транскрипции с промотора ВИЧ-1 посредством запуска сигнального пути, приводящего к транслокации NF- κ B в ядро и последующей активации вирусной транскрипции. Также было показано параллельное распределение и DNA-PKcs, и РНКП II на провирусе в ответ на индукцию транскрипции. При этом снижение уровня DNA-PKcs в клетках линии Jurkat приводило к значительному снижению экспрессии репортерного белка с промотора ВИЧ-1, но не с контрольного промотора цитомегаловируса (CMV) в лентивирусных векторах [70].

В последней работе по этой теме [71], опубликованной в 2020 г., исследовано влияние ингибирования каталитической активности DNA-PKcs с помощью соединения NU7441, а также снижения уровня белка DNA-PKcs с помощью коротких интерферирующих РНК на реактивацию латентного интегрированного провируса в нескольких типах клеток лимфоидного происхождения. Установлено, что в обоих случаях TNF- α -индуцированная реактивация латентного провируса снижалась в 2-4 раза, что свидетельствует от важности фосфорилирующей активности DNA-PK для транскрипции ВИЧ-1. Кроме того, было замечено, что в клетках с подавленной активностью DNA-PKcs снижается количество обеих фосфорилированных форм РНКП II: инициаторной (фосфорилированные остатки Ser5 в гептапептидных повторах С-концевого домена) и элонгационной (фосфорилированные остатки Ser2). Однако непонятно, насколько в таком случае специфичен негативный эффект от подавления DNA-PKcs именно для промотора ВИЧ-1.

В этой же работе [71] с помощью иммунопреципитации хроматина было показано, что при нокдауне DNA-PKcs на промоторе ВИЧ-1 снижается уровень важного активатора элонгации транскрипции P-TEFb (субъединицы Cdk9 и CyclinT1) [71]. Этот эффект наблюдается и при базальной, ничем не активированной транскрипции провируса в латентном состоянии, и при его активации с помощью TNF- α . Также было установлено, что нокдаун DNA-PKcs приводит к снижению общего уровня транскрипционного фактора TRIM28, фосфорилированного по остатку Ser824, в клетке, а также к снижению его количества на промоторе ВИЧ-1. Предполагается, что нефосфорилированный TRIM28 участвует в поддержании элонгационного блока, а при фосфорилировании становится положительным регулятором элонгации [72]. В одной из работ было показано, что TRIM28 подавляет транскрипцию с промотора ВИЧ-1 посредством сумоилирования Cdk9 субъединицы фактора P-TEFb, которое или непосредственно ингибирует каталитическую активность киназы Cdk9, или же мешает её взаимодействию с CyclinT1 [73]. В то же время, при подавлении каталитической активности DNA-PKcs на промоторе провируса менялась и структура хроматина: снижалось количество H3-Ас (маркер эухроматина) и увеличивалось количество H3K27me3 (маркер гетерохроматина). Неясно, что в большей степени определяет негативный эффект подавления DNA-PKcs на эффективность транскрипции с промотора ВИЧ-1, неясно также, участвует ли гетеродимер Ku в этих процессах.

Таким образом, данные о роли DNA-PK и ее отдельных субъединиц в транскрипции ВИЧ-1 довольно противоречивы и пока не проясняют механизма их влияния на экспрессию вирусных генов. Также в некоторых работах невозможно разделить влияние Ku на транскрипцию и постинтеграционную репарацию, в которой, как было показано в [38,39,74], он участвует. Не было также проведено сравнительного исследования на одной и той же репортерной системе влияния отдельных субъединиц DNA-PK на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Также открытым остается вопрос, как DNA-PK в целом или ее отдельные субъединицы привлекаются к промотру ВИЧ-1: пока не была достоверно установлена способность Ku специфично связываться с внутренними последовательностями ДНК без разрывов, а предполагаемый в работе [62] сайт связывания Ku на промоторе ВИЧ-1 не был подтвержден.

2.3. SFPQ, NONO и NEAT1 - основные компоненты параспеклей

В 2002 году впервые были описаны новые ядерные тельца – большие РНК-белковые комплексы, названные параспеклями [75]. Они были найдены как локальные скопления

различных РНК-связывающих белков, расположенные недалеко от ядерных структур спеклей. Параспекли присутствуют практически во всех культурах клеток, в том числе первичных, за исключением стволовых клеток [76]. В качестве первых белковых компонентов параспеклей были обнаружены белки PSPC1 (paraspeckle protein 1), PSPC2 (paraspeckle protein 2), p54 (ядерный РНК-связывающий белок 54 кДа, известный как NONO), SFPQ (PSF -polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor), Fus (fused in sarcoma), CFIm68 (cleavage factor Im 68 kDa, CPSF6).[75]. Позднее, было обнаружено около 30 белков, ко-локализующихся с параспеклями [77]. Среди обнаруженных белков особенно важными для формирования параспеклей оказались NONO и SFPQ, их нокдаун в клетках приводил к дезинтеграции телец [78].

Белки SFPQ (PSF splicing factor proline glutamine rich), NONO (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) и PSPC1 (paraspeckle protein component 1) являются представителями семейства белков DBHS (Drosophila behavior/human splicing). Белки объединяются в это семейство по наличию в них центрального участка DBHS, состоящего из 4 доменов: двух РНК-связывающих доменов RRM1 и RRM2, домена NOPS (NonA/paraspeckle) и Coiled-Coil домена (Рисунок 8.А) [79]. Участок DBHS составляет порядка 300 а.к. и является очень консервативным, так, например, последовательности белков SFPQ и NONO человека в этом участке имеют 71% идентичности, согласно выравниванию с помощью Blast. Центральный участок DBHS-белков образует кор белка, в то время как N- и С-концевые участки неструктурированы и значительно отличаются внутри семейства, принося каждому члену индивидуальные функции. Например, среди всех членов DBHS семейства, только SFPQ обладает ДНК-связывающим доменом, располагающимся ближе к N-концу относительно центрального консервативного участка. Наличие двух РНК связывающих доменов отвечает в этом семействе за взаимодействие с РНК, coiled-coil домен за белок-белковые взаимодействия [79]. Все белки семейства DBHS имеют сигнал ядерной локализации на С-конце и в норме находятся в ядре, хотя появляются данные о возможных функциях этих белков в цитоплазме нервных клеток и на поверхности определенных раковых клеток [80,81]

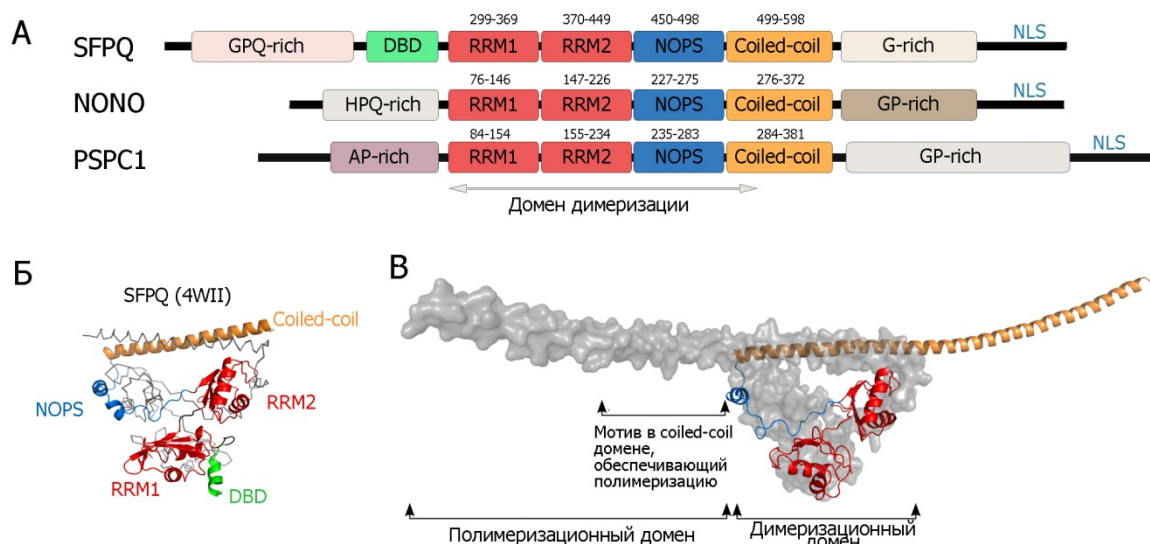


Рисунок 8. Структура белков семейства DBHS. (А) Схематическое представление доменной организации белков семейства DBHS у человека. Центральный консервативный регион представлен одинаковыми цветами: РНК-связывающие домены RRM1 и RRM2, NOPS и Coiled-coil домены. N- и С-концевые участки белков являются регионами низкой сложности. ДНК-связывающий домен в составе SFPQ обозначен как DBD. NLS – сигнал ядерной локализации. (Б) Структура кора гомодимера SFPQ 276-535 а.к. Домены одной из субъединиц выделены цветом. PDB код: 4WII. (В) Структура гомодимера SFPQ 276-598 а.к. PDB код: 4WIJ. Обозначены регионы, отвечающие за димеризацию и полимеризацию димеров белка. Адаптировано из работ [79,82].

Белки семейства DBHS функционируют в виде димеров, при этом могут образовывать как гомодимеры, так и гетеродимеры друг с другом [79]. Рентгеноструктурный анализ гетеродимера NONO/PSPC1 и гомодимера SFPQ выявил, что за димеризацию отвечают домены RRM2 и NOPS, взаимодействующие друг с другом внутри субъединиц (Рисунок 8. Б, В) [82,83]. Мутации в этих доменах, мешающие димеризации, приводят к потере белком своих функций [83]. В зависимости от типа клеток и биологического процесса различные димеры могут как взаимозаменять друг друга в выполняемых функциях, так и обладать уникальными функциями. Так, например, было показано, что нокаут NONO может быть компенсирован повышением уровня PSPC1 для формирования гетеродимера с SFPQ при репарации ДНК [84]. Домен coiled-coil располагается вне кора в виде торчащей α -спирали, которая формирует поверхность для олигомеризации [83]. В этом домене присутствует консервативный мотив, отвечающий за обратимую олигомеризацию [82]. Было показано, что способность к олигомеризации SFPQ важна для кооперативного связывания с нуклеиновыми кислотами, что также влияет на привлечение этого белка в параспекли [82].

Белки SFPQ и NONO участвуют в ответе на повреждение ДНК, в регуляции транскрипции, контроле стабильности мРНК, регуляции сплайсинга [79]. Было показано,

что SFPQ связывается с промоторами и может привлекать эпигенетические регуляторы, например гистон-деацетилазы для подавления экспрессии генов [85]. В другом механизме регуляции транскрипции белки SFPQ/NONO в форме гомо- или гетеродимеров связываются с целым рядом ядерных рецепторов гормонов, модулируя их транскрипционную активность [85–89]. Например, связавшись с андрогеновым рецептором, димер SFPQ/NONO мешает его взаимодействию с последовательностями ДНК в регулируемых генах [87]. Кроме того, показана способность SFPQ и NONO одновременно взаимодействовать с С-концевым доменом РНК-полимеразы II и с транскрибирующейся РНК [90]. NONO участвует в активации транскрипции генов циркадного ритма, способствуя привлечению РНК полимеразы II к цАМФ-зависимым промоторам [91–93]. Также SFPQ и NONO участвуют в привлечении 5'-3'-экзорибонуклеазы 2 (XRN2) к месту терминации транскрипции [94] и могут быть вовлечены в регуляцию стабильности РНК, например NEAT1 РНК [78].

Белки SFPQ/ NONO были неоднократно идентифицированы в составе сплайсосомы, однако они не являются важной ее частью. Предполагается, что они участвуют в регуляции альтернативного сплайсинга для некоторых мРНК [79].

Установлено, что белки SFPQ/NONO участвуют в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомولوجичного объединения концов (NHEJ). Было показано, что они стимулируют процесс соединения концов ДНК *in vitro* [95,96]. Репарация двуцепочечных разрывов протекала медленнее в клетках с нокдауном NONO, в них накапливалось больше хромосомных aberrаций, индуцированных ионизирующим излучением, по сравнению с клетками дикого типа [97]. Была показана ассоциация SFPQ и NONO с белками системы NHEJ: гетеродимером Ku70/Ku80 и лигазой Lig4. Кроме того, было обнаружено рекрутирование SFPQ и NONO к сайтам двуцепочечных повреждений ДНК, а нокдаун SFPQ приводил к задержке репарации [98]. Также показано, что SFPQ взаимодействует с белками репарации по пути гомологичной рекомбинации RAD51 [99,100] и TopBP1 [101], стимулирует образование синаптического комплекса [102] и миграцию одноцепочечной ДНК поврежденной хроматиды вдоль сестринской хроматиды [99,100].

Обладая доменами для взаимодействия с белками и нуклеиновыми кислотами, DBHS белки являются посредниками в регуляции клеточных процессов, соединяя вместе разные компоненты в пространстве. Этим объясняется их участие в широком спектре клеточных процессов и невозможность выделить одну основную их функцию. Тем не менее, участие белков DBHS в формировании параспеклей считается отличительным свойством этого семейства.

Позднее выяснилось, что параспекли чувствительны к обработке РНКазами, и было высказано предположение о необходимости присутствия некой РНК в качестве структурной основы для этих телец [103,104]. В 2009 году четыре независимые исследовательские группы показали, что с параспеклями ко-локализуется длинная некодирующая РНК NEAT1, играющая важную структурную роль в организации этих телец [76,78,105,106]. В этих исследованиях было обнаружено, что снижение уровня NEAT1 приводит к дезорганизации параспеклей, снижению их количества и распределению белковых компонентов в нуклеоплазме. Именно через взаимодействие с NEAT1 белки NONO, SFPQ и PSPC1 привлекаются в параспекли [105]. Интересно, что при нокдауне белков SFPQ и NONO снижается уровень NEAT1 РНК, что могло бы также объяснить дезорганизацию параспеклей в таких клетках [78]. Таким образом, NEAT1 РНК является ключевым компонентом для образования параспеклей. Было показано, что их формирование начинается в месте транскрипции NEAT1, когда ее концентрация достигает локального максимума [107].

NEAT1 РНК – это длинная некодирующая РНК, которая транскрибируется РНК полимеразой II с локуса MEN1 на 11 хромосоме человека, поэтому часто встречается под названием MENβ и MENε. Она имеет две изоформы: короткий транскрипт длиной порядка 3.7 тысяч нуклеотидов (NEAT1_1 или MENε) и длинный транскрип порядка 23 тысяч оснований (NEAT1_2 или MENβ). Оба транскрипта синтезируются с одного промотора (Рисунок 9), в них обоих отсутствуют интроны, но терминация транскрипции происходит по-разному. Изоформа NEAT1_1 полиаденилируется на 3'-конце классическим путем для транскриптов РНК полимеразы II, а длинная изоформа NEAT1_2 процессируется неканонически [108]. На 3'-конце NEAT1_2 РНКазы Р узнает структуру в виде клеверного листа, похожую на структуру тРНК, и разрезает транскрипт после нее [106]. Было показано, что эта структура важна для поддержания стабильности не-полиаденилированной изоформы NEAT1 [109]. Обе изоформы NEAT1 не экспортируются из ядра, однако механизма удержания этой некодирующей РНК в ядре не предложено. Было показано, что белки SFPQ и NONO стабилизируют в первую очередь длинный транскрипт NEAT1_2, их нокдаун снижает уровень NEAT1_2 и практически не влияет на уровень короткого транскрипта NEAT1_1 [78]. Кроме того, уровень именно NEAT1_2 в клетке влияет на организацию параспеклей и их *de novo* формирование [77,110], хотя в некоторых работах отмечается, что суперэкспрессия короткой формы NEAT1_1 также способна несколько увеличивать количество параспеклей в клетке и инициировать их формирование [105,111]. В работе [112], используя систему редактирования генома CRISPR-Cas9, на клеточной линии U2OS авторы показали, что короткая изоформа NEAT1_1 неважна для

формирования параспеклей, более того NEAT1_1 локализуется в отличных от параспеклей участках, названных микроспеклями, функция и состав которых пока неясны.

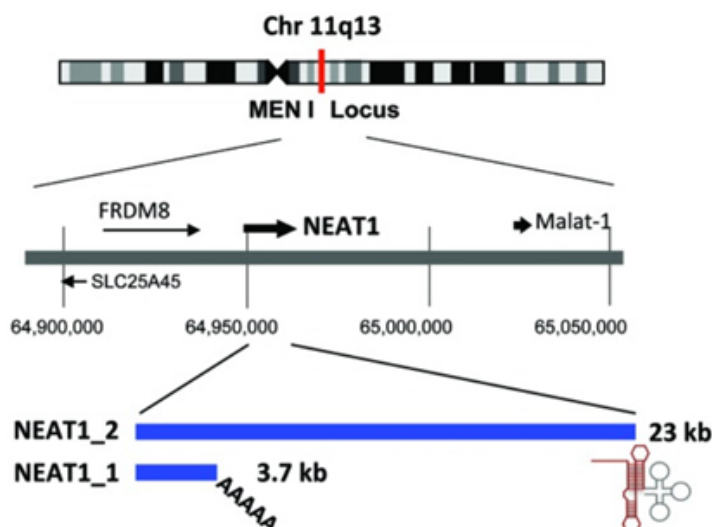


Рисунок 9. Положение NEAT1 в геноме человека. Отмечены позиции MEN I локуса на 11 хромосоме. FRDM8 и SLC25A45 гены, кодирующие белки, расположенные в этом локусе рядом с NEAT1. Стрелки указывают направление транскрипции. Транскрибирующаяся РНК полимеразой II, NEAT1 РНК имеет 2 изоформы NEAT1_1 и NEAT1_2, терминация которых происходит по-разному. Взято из [108].

Параспекли обычно представляют собой вытянутые тельца. Оказалось, что диаметр поперечного сечения постоянен, его максимальное значение в человеческих клетках в среднем достигает 350 нМ и не зависит от длины тельца [113]. Электронная микроскопия параспеклей показала, что 5'- и 3'-концы длинной изоформы NEAT1_2 и 5'-конец короткой изоформы располагаются на периферии параспеклей, а центральный регион NEAT1_2 формирует внутренний кор, что также демонстрирует важность длинной изоформы для образования параспеклей [113]. Есть две возможности для формирования такой структуры: длинная изоформа формирует петлю так, чтобы 5'- и 3'-концы одной молекулы РНК были сближены и оказывались на периферии, или ее молекулы протягиваются через весь параспекль так, что 5'-конец одной молекулы оказывается сближен с 3'-концом другой (Рисунок 10. А). Пока остается предпочтительной модель, в которой NEAT1_2 образует петлю.

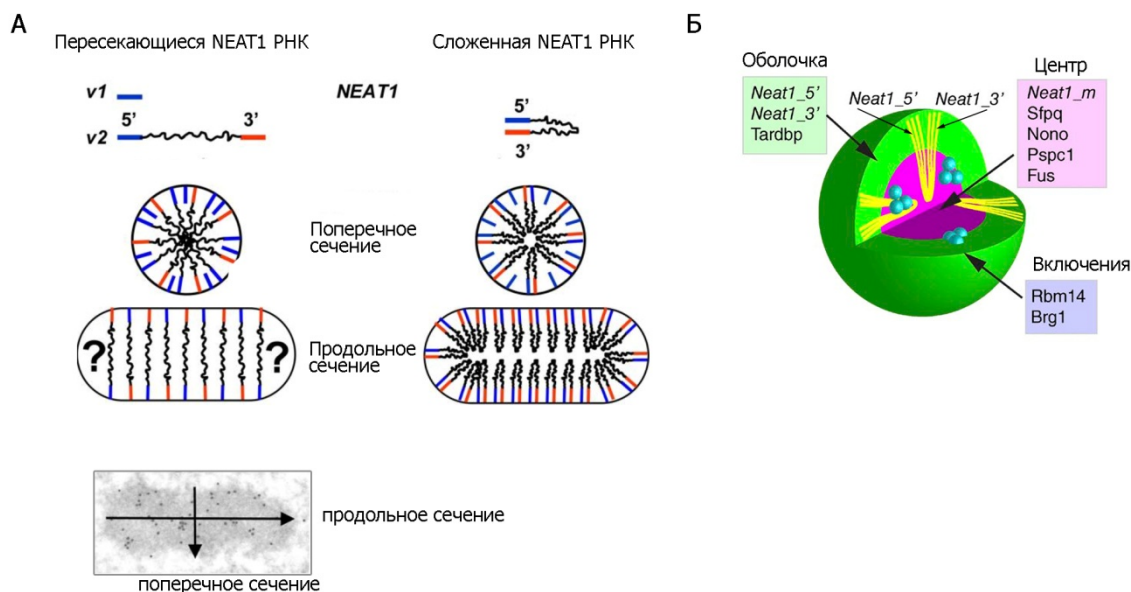


Рисунок 10. Пространственная организация параспеклей. (А). Изображение параспекля, полученное с помощью электронной микроскопии и 2 варианта расположения NEAT1 РНК внутри параспекля. **(Б)** Схематическое изображение сфероидной структуры параспекля с тремя зонами: оболочка, центр и включения. Адаптировано из [113] (А) и [114] (Б).

Строение параспеклей было уточнено в работе [114] с помощью SIM микроскопии высокого разрешения (микроскопия структурированного освещения). Оказалось, что параспекли формируются в виде структур, подобных по форме сосискам («sausage-like structures»), составленных из сфероидов. В свою очередь, сфероиды имеют центральный кор, включения и оболочку. Кор состоит из белков DBHS семейства (SFPQ, NONO, PSPC1) и центрального региона NEAT1_2 РНК (Рисунок 10.Б). Оболочка параспеклей образована 5'- и 3'-концами NEAT1 и белком Tardbp (TAR DNA-binding protein 43), ограничивающими кор от нуклеоплазмы. Белки Rbm14 и Brg1 образуют кластеры-включения. Была показана важность белка Fus для формирования правильной структуры параспеклей в виде кора и оболочки, а также привлечения белков Rbm14 и Brg1 в параспекли.

Одной из показанных функций параспеклей является удержание в ядре РНК, подвергшихся множественному редактированию аденозина в инозин [76,104,115]. У высших эукариот такое редактирование двуцепочечных регионов РНК (дцРНК) осуществляется в ядре ферментом дцРНК-зависимой аденозиндезаминазой (ADAR). Около 300 генов в своих 3'-нетранслируемых областях содержат инвертированные Alu повторы, и синтезированные с них РНК образуют протяженные двуцепочечные регионы, которые и подвергаются ADAR-зависимому редактированию [115,116]. Белки SFPQ и NONO связывают гипер-редактированные РНК и удерживают их в параспеклях, мешая экспорту из ядра [117]. Этот механизм предотвращает трансляцию отредактированных РНК и

используется для регуляции экспрессии некоторых генов [104]. В эмбриональных стволовых клетках A→I редактирование особенно активно, но модифицированные РНК не удерживаются в ядре, что согласуется с отсутствием в эмбриональных стволовых клетках NEAT1 РНК и, соответственно, параспеклей. Однако после дифференцировки NEAT1 начинает экспрессироваться и регулировать удержание РНК в ядре [76].

Параспекли могут также участвовать в различных клеточных процессах, контролируя количество свободных форм белков, входящих в их состав. Так, было показано, что NEAT1 участвует в регуляции транскрипции опосредованно, через секвестирование транскрипционных факторов в параспекли [118,119]. В работе [119] показано, что SFPQ является репрессором на промоторе гена интерлейкина 8 (IL8). В ответ на введение в клетки последовательности поли-I:поли-C происходит активация клеточного иммунитета через сенсинг Toll-подобным рецептором 3 (TLR3) двуцепочечных участков РНК. Это приводит к повышению уровня NEAT1_2 РНК. Повышение уровня NEAT1 в свою очередь приводит к увеличению количества параспеклей и секвестированию в них SFPQ с промотора IL8. В результате этого активируется транскрипция IL8, а также и других антивирусных генов. Повышение уровня NEAT1 происходит и в ответ на инфекцию клеток вирусом гриппа и вирусом простого герпеса, активирующих клеточный ответ через TLR3.

Интересно, что существуют также данные о повышении уровня NEAT1 в ответ на заражение ВИЧ-1, хотя единых представлений о том, как запускается внутриклеточный антивирусный ответ, нет. В работе [120] было показано, что в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС) уровень NEAT1 РНК (в первую очередь длинной изоформы NEAT1_2) повышен в 3-5 раз у ВИЧ-1 инфицированных доноров, не получающих антиретровирусную терапию, по сравнению со здоровыми донорами. Уровень NEAT1 в клетках ВИЧ-положительных доноров, применяющих терапию, значительно не отличался от уровня у здоровых доноров. Инфекция клеток линий Jurkat, MT4 и THP1 вирусом также приводила к повышению уровня NEAT1_2 в 5-8 раз [121]. Механизм изменения количества NEAT1 в клетке в ответ на заражение ВИЧ-1 неясен, однако существует ряд работ, описывающих влияние главных компонентов параспеклей на разные стадии жизненного цикла ВИЧ-1.

2.4. Роль SFPQ, NONO и NEAT1 в репликации ВИЧ-1

В ходе жизненного цикла ВИЧ-1 многие клеточные факторы могут как негативно, так и позитивно влиять на репликацию вируса. В ряде исследований, посвященных поиску клеточных белков, взаимодействующих с вирусными, обнаружены белки NONO и SFPQ

[4,5,122,123]. Так, NONO был обнаружен в составе каталитически-активного прединтеграционного комплекса, выделенного из цитоплазматической фракции инфицированных CD4⁺ Т-клеток [4], в другом исследовании NONO был найден среди белков комплекса обратной транскрипции и/или прединтеграционного комплекса в Т-клеточной линии, инфицированной ВИЧ-1 [5]. В инфицированной клеточной линии HeLa NONO входил в состав интерактома вирусного белка Rev, при этом ассоциация NONO и Rev увеличивалась в присутствии РНК, содержащей RRE последовательность [122]. В работе [123] среди белков-партнеров интегразы ВИЧ-1 в ядерных лизатах клеток линии HeLa были найдены NONO и SFPQ. Кроме того, оказалось, что очищенные рекомбинантные интегразы и SFPQ могут взаимодействовать друг с другом напрямую. Методами докинга и молекулярной динамики были предсказаны сайты связывания этих белков. По данным работы [123], во взаимодействии задействованы остатки N-концевого и каталитического доменов интегразы и остатки RRM1, RRM2 и NOPS доменов SFPQ, которые очень консервативны среди всех DBHS белков. Авторы этой работы отмечают, что со стороны интегразы в сайт связывания входит подвижная петля 140-149 а.к., которая располагается рядом с каталитическим центром интегразы и важна для позиционирования вирусной ДНК в каталитическом центре. Однако в опытах с рекомбинантными белками SFPQ не влиял на реакции 3'-процессинга переноса цепи, катализируемые интегразой [123], что достаточно странно, если предположить, что он действительно связывается в непосредственной близости от каталитического центра интегразы.

При заражении клеток линии Jurkat и первичных CD4⁺ Т-клеток репликативно-некомпетентным VSV-G-псевдотипированным лентивирусным вектором со встроенным геном люциферазы нокдаун NONO приводил к 2-3-х кратному увеличению экспрессии люциферазы и вирусного белка p24, а также к повышению уровня gag мРНК, кодирующей p24 [124]. Нокдаун SFPQ также приводил к ≈3-х кратному повышению уровня люциферазы в клетках TZM-bl при их заражении вирусом. Клеточная линия TZM-bl - производная линия от HeLa - имеет в геноме интегрированный репортер под контролем промотора ВИЧ-1 и является системой для тестирования эффективности репликации вируса. При заражении этих клеток вирус проходит все стадии жизненного цикла, включая сборку вирионов и заражение новых клеток, при этом вирусный белок Tat активирует транскрипцию интегрированного репортера, поэтому по уровню репортерного белка можно судить об эффективности репликации вируса. Таким образом, согласно работам [123,124], SFPQ и NONO являются негативными регуляторами репликации ВИЧ-1.

С помощью ПЦР в реальном времени можно детектировать различные формы вирусной ДНК в клетке: общее количество обратно-транскрибированной, интегрированной

и неинтегрированной форм, формирующих 2-LTR и 1-LTR циклы, и таким образом следить за эффективностью обратной транскрипции, интеграции, репарации. Оказалось, что нокдаун как NONO, так и SFPQ приводит к увеличению количества тотальной вирусной ДНК в клетке, влияя на стадию обратной транскрипции [123,124], что могло быть одной из причин наблюдаемого в этих исследованиях повышения экспрессии вирусных и репортерных генов. Стоит, однако, отметить, что авторы не проверяли влияния SFPQ и NONO на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, которое также могло бы объяснить негативный эффект SFPQ и NONO на экспрессию репортеров под контролем этого промотора. Отметим также, что в исследованиях [4,5,122–124] NONO и SFPQ были найдены в составе цитоплазматических комплексов, сформированных обратной транскриптазой и интегразой ВИЧ-1, и оказывали влияние на обратную транскрипцию, протекающую в цитоплазме клетки. Механизм их присутствия в этих комплексах и участия в обратной транскрипции остается пока неизученным, но вызывает особый интерес, учитывая, что, как уже упоминалось выше, NONO и SFPQ являются ядерными белками, хотя они и были найдены в цитоплазме в составе рибонуклеопротеиновых гранул в ганглионарных нервных клетках сетчатки [81].

В ряде других работ исследовалось влияние SFPQ и NONO на экспрессию генов ВИЧ-1 при трансфекции клеток различными репортерными плазмидами, кодирующими вирусный геном целиком или его части (например, вектором pNL4-3). Было показано, что SFPQ и NONO соосажаются с мРНК ВИЧ-1 [125–127]. В работе [125] сообщается, что взаимодействие SFPQ и вирусной мРНК в клетке зависит от присутствия регионов нестабильности (INS) в гене *gag*. Как уже упоминалось в разделе 2.1.2, РНК, кодирующие полипептид Gag и имеющие внутри открытой рамки считывания INS-последовательности, являются несплайсированными, содержат RRE элемент и экспортируются из ядра в RRE-Rev-зависимом манере [31]. В другой работе было показано, что SFPQ взаимодействует с вирусной несплайсированной мРНК, и за это взаимодействие отвечают консервативные среди ретровирусов последовательности в мРНК, расположенные вблизи 5'-концевого сайта сплайсинга недалеко от гена *gag* [127]. Кроме того, была показана РНК-зависимая ассоциация SFPQ и вирусного белка Rev [126], и взаимодействие NONO с Rev, которое усиливалось в присутствии RRE элемента [122]. Однако, работы, посвященные изучению функционального значения ассоциации белков SFPQ и NONO с вирусной мРНК и белком Rev, не дали однозначного результата.

В исследовании [126], выполненном на клеточной линии HEK 293T, нокдаун SFPQ приводил к снижению уровня несплайсированных, содержащих INS мРНК и закодированных в них белков, причем уровень этих мРНК менялся и в ядре, и в цитоплазме.

В то же время нокдаун SFPQ значительно не влиял на количество Rev-независимых сплайсированных форм РНК, а также на уровень белков, транслирующихся с них. Этот эффект наблюдался только в присутствии вирусного белка Rev: при нем несплайсированная вирусная РНК не подвергается сплайсингу полностью, может накапливаться в ядре и экспортироваться из него, а также легко детектируется методом Нозерн-блот. Авторы предположили, что SFPQ оказывает позитивное влияние на стабильность несплайсированной вирусной РНК в ядре [126]. В другом исследовании [125], выполненном также на клеточной линии НЕК 293Т, наоборот, суперэкспрессия GFP-тагированного SFPQ приводила к снижению уровня всех транскриптов ВИЧ-1 в присутствии белка Rev. При этом, влияние на несплайсированные и частично сплайсированные формы, содержащие INS и RRE, было значительно сильнее. В другом эксперименте использовался вектор, кодирующий геном ВИЧ-1 без белка Rev, поэтому несплайсированные транскрипты ВИЧ-1 полностью подвергались сплайсингу, а уровень сплайсированных форм отражал уровень/стабильность синтезированного полноразмерного предшественника. Суперэкспрессия GFP-SFPQ значительно снижала количество полностью сплайсированных мРНК, при этом SFPQ не влиял на стадию транскрипции с LTR промотора. В этом исследовании авторы предположили негативное влияние SFPQ на стабильность несплайсированной пре-мРНК ВИЧ-1 [125]. Итак, обе работы [125,126] демонстрируют участие SFPQ в поддержании уровня несплайсированной и частично сплайсированной вирусной мРНК, содержащей регионы нестабильности и RRE последовательность и экспортирующейся из ядра Rev-зависимым образом. Неясным все же остается, является ли SFPQ позитивным или негативным регулятором, а также механизм этого процесса.

В более поздней работе [127], были идентифицированы 2 консервативных участка в мРНК ретровирусов, окружающие 5'-концевой сайт сплайсинга (Рисунок 11). Эти участки состоят из 7 рибонуклеотидов и содержат только G и A, поэтому названы GA-1 и GA-2 мотивами. При этом оба мотива содержатся только в несплайсированной мРНК вируса, а при сплайсинге GA-2 вырезается. Мутации в этих мотивах приводили к уменьшению уровня несплайсированной РНК и повышению уровня частично и полностью сплайсированных. Таким образом, в отсутствии GA-1 и GA-2 активируется альтернативный сплайсинг вирусной пре-мРНК, поэтому возможно, что эти регионы мРНК через взаимодействие с клеточными белками, привлекаемыми туда во время транскрипции, поддерживают уровень несплайсированной вирусной мРНК, защищая ее от альтернативного сплайсинга.

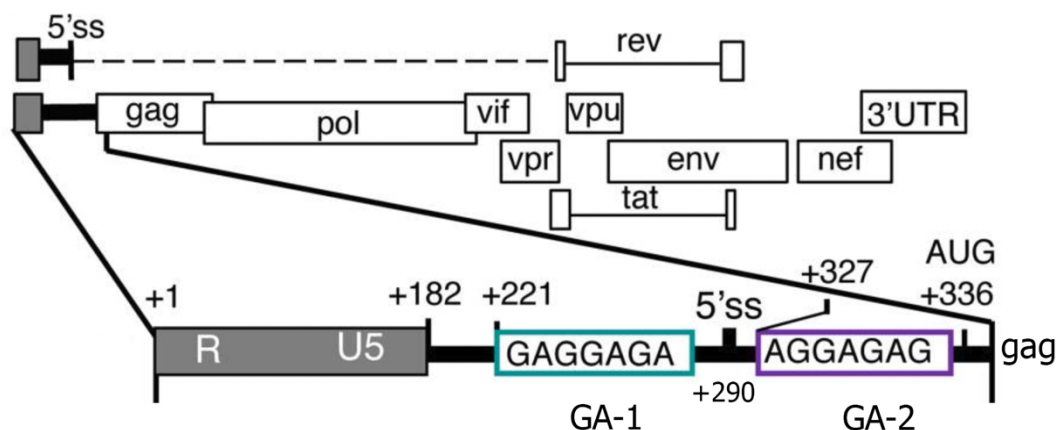


Рисунок 11. Расположение консервативных регионов GA-1и GA-2 в мРНК ВИЧ-1 [127].

В этой работе было показано *in vitro* с выделенным рекомбинантным белком и на клетках, что SFPQ сиквенс-специфично связывает эти регионы [127]. Также в этой работе впервые был проведен анализ уровня разных форм вирусной мРНК с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени при суперэкспрессии SFPQ или его нокдауне, в отличие от работ [125,126], где детекция происходила только с помощью Нозерн-блота и только в одних условиях. Было установлено, что при эктопической суперэкспрессии SFPQ снижались уровни несплайсированной и частично-сплайсированной вирусной РНК, которая как раз содержит INS и RRE последовательности, что соответствует данным работы [125]. Помимо этого, значительно снижался и уровень белка Gag, транслируемого с несплайсированной формы мРНК. Одновременно с этим, нокдаун SFPQ также приводил к падению уровня белка Gag и уровня несплайсированной мРНК, хотя количество частично сплайсированной формы в этом исследовании увеличивалось. Результат этого эксперимента согласуется с работой [126]. При этом стоит отметить, что эффект от нокдауна SFPQ на уровни форм вирусной мРНК совпадал с эффектом от замен в регионах GA-1 и GA-2, с которыми он взаимодействует. И в то же время, нокдаун SFPQ не влиял на уровни форм вирусной мРНК, содержащих мутации в этих регионах. Учитывая, что GA-1 и GA-2, возможно, защищают несплайсированную вирусную мРНК от сплайсинга, авторы предположили, что SFPQ участвует в этом процессе, и при его недостатке в клетке альтернативному сплайсингу подвергается большая часть вирусной мРНК. Однако вместе с тем, экспрессия экзогенного SFPQ не влияет на этот процесс, так как SFPQ – мажорный белок, и его количества в клетке достаточно для этого процесса. Наблюдаемый негативный эффект от суперэкспрессии SFPQ на несплайсированные и частично-сплайсированные РНК авторы связывают с влиянием этого белка на поддержание уровня форм вирусной РНК после протекания сплайсинга. Интересно, что в этой работе не было описано экспериментов с влиянием

суперэкспрессии SFPQ на уровни форм вирусной РНК, содержащей замены в регионах GA-1 и GA-2.

Отметим также, что хотя была идентифицирована ассоциация NONO с INS содержащей мРНК ВИЧ-1, NONO с SFPQ обладают высокой степенью идентичности белковых коров и в клетке часто формируют гетеродимер, тем не менее суперэкспрессия NONO никак не влияла на стабильность вирусной мРНК и на экспрессию вирусных генов в работе [125]. Других исследований, посвященных влиянию NONO на стабильность вирусной мРНК проведено не было.

Все результаты исследований, посвященных влиянию SFPQ на уровень различных форм вирусных мРНК и синтезируемых с них белков, суммированы в таблице 1.

Таблица 1. Известные к настоящему времени данные о влиянии SFPQ на уровень вирусных мРНК

Статья	Эксперимент	Влияние на форму мРНК и/или белок, с нее синтезируемый			Заключение
		несплайсированная (US)	частично сплайсированная (SS)	полностью сплайсированная (MS)	
A. Zolotukhin 2003 г. [125]	Суперэкспрессия GFP-SFPQ в НЕК 293, детекция Нозерн блотом	в присутствии Rev снижался уровень US РНК намного сильнее, чем других форм	в присутствии Rev снижение уровня SS РНК	в присутствии Rev снижение уровня MS РНК	вызывает INS-зависимую деградацию пре-мРНК до сплайсинга и Rev-зависимого экспорта

А. Kula 2013 г. [126]		Нокдаун SFPQ в НЕК 293Т, детекция Нозерн блотом	значительно снижалось количество РНК и в ядре, и в цитоплазме только в присутствии Rev -- снижение уровня белка Gag	Н/Д	не менялись -- нет изменения уровня репортера, закодированного в MS РНК	поддержание стабильности несплайсированной пре-мРНК в ядре после ее транскрипции
G. Singh 2018 г. [127]	Суперэкспрессия Flag-SFPQ	Нокдаун SFPQ НЕК293 Т, детекция ОТ-ПЦР в реальном времени	снижение уровня US РНК -- снижение уровня белка Gag	снижение уровня SS РНК	небольшое увеличение уровня MS РНК	Недостаток белка SFPQ в клетке стимулирует процессинг пре-мРНК, это влияние зависит от наличия GA-мотивов около 5'-концевого сайта сплайсинга. И в то же время, избыток экзогенного SFPQ, вероятно, негативно регулирует стабильность несплайсированной РНК уже после сплайсинга.
	Нокдаун SFPQ		снижение US РНК -- снижение уровня белка Gag	увеличение уровня SS РНК	небольшое увеличение уровня MS РНК	

SFPQ и NONO в клетке могут как в свободной форме быть распределены по нуклеоплазме, так и находиться в составе параспеклей. Описанные выше исследования не разделяют, в какой форме белок участвует в регуляции репликации ВИЧ-1, и не характеризуют роль параспеклей в регуляции разных этапов жизненного цикла вируса. Как

уже упоминалось, нокдаун NEAT1 ведет к дезорганизации параспеклей и переходу DBHS белков в свободную форму в нуклеоплазме [76,78,105,106]. В работах [121,128] исследовалось влияние снижения уровня NEAT1, а следовательно, и снижения количества параспеклей на репликацию ВИЧ-1. Оказалось, что при инфицировании вирусом клеток Jurkat и HeLa со сниженным содержанием NEAT1 уровень репликации вируса повышается: увеличивается уровень белков - продуктов генов *gag* (p55 и p24) и *env* (gp160/120) [121,128]. Это как раз вирусные белки, экспрессирующиеся с несплайсированной или частично-сплайсированной мРНК, содержащей RRE и INS элементы. В исследовании [121] не отслеживалось влияние нокдауна NEAT1 на ранние стадии репликации вируса (обратная транскрипция и интеграция), а влияния NEAT1 на транскрипцию с LTR промотора зафиксировано не было. Однако, было показано, что усиление репликации вируса связано с повышением уровня несплайсированных INS-содержащих вирусных транскриптов только в цитоплазматической фракции, в то время как уровни сплайсированных форм не менялись нигде. Из чего можно заключить, что NEAT1 и параспекли в целом каким-то образом участвуют в регуляции уровня и/или экспорта несплайсированной вирусной мРНК. В исследовании [128] при заражении вирусом клеток Jurkat с нокаутом NEAT1 также не смотрели отдельно на ранние этапы репликации. Однако было показано, что нокаут NEAT1 также приводит к повышению уровня белков p55 и p24 (продукты гена *gag*) и gp160/120 (продукты гена *env*), а также белка Nef, поскольку повышался уровень всех форм мРНК вируса в цитоплазме.

Известно, что одной из описанных функций параспеклей является удержание A→I гипер-редактированной мРНК, содержащей двуцепочечные участки [76,104,115]. Для мРНК ВИЧ-1 есть ряд наблюдений о редактировании ее двуцепочечных участков, что могло бы объяснить ее удержание в параспеклях. В одной из работ сообщается о Tat-зависимом редактировании TAR РНК в ооцитах лягушки *Xenopus* [129], но на клетках человека редактирование этого региона замечено не было [126,130,131]. В другой работе показана важность редактирующей активности дцРНК-зависимых аденозиндезаминаз 1 и 2 (ADAR1, ADAR2) для пост-транскрипционной регуляции ВИЧ-1 [130]. Было показано, что суперэкспрессия каталитически-активного ADAR1 в клетках HEK 293T, трансфицированных вектором pNL4-3, кодирующим вирусный геном, повышает уровень белка p24, а нокдаун ADAR1 приводит, соответственно, к его снижению. Оказалось, что это связано с изменением уровня несплайсированной вирусной мРНК в цитоплазме, с которой p24 транслируется: при нокдауне ADAR1 он снижался. Было показано, что регион несплайсированной мРНК около RRE элемента и сам RRE элемент подвергаются A→I редактированию. Рибосома при трансляции воспринимает инозин как гуанозин, поэтому в

сам вектор pNL4-3 были внесены замены A→G в позициях, подвергающихся редактированию мРНК. Оказалось, что они приводят к повышению уровня экспрессии p24, аналогичному наблюдаемому при суперэкспрессии ADAR1, что доказывает связь между A→I редактированием этих позиций и ADAR1-опосредованным повышением уровня p24 [130]. Однако, в работе [126], в клетках HEK 293T, трансфицированных вектором pNL4-3, при эндогенном уровне ADAR ферментов не обнаружили какого-либо значительного A→I редактирования в RRE -участке мРНК.

В другом исследовании ADAR1 также стимулировала инфекцию ВИЧ-1 [131]. При суперэкспрессии и каталитически-активной, и каталитически-неактивной ADAR-1 наблюдалось повышение уровня вирусных белков p24, gp120, Nef в клетках HEK 293T, трансфицированных вектором pNL4-3. Однако, суперэкспрессия только каталитически-активного белка приводила к повышению накопления вируса в среде, детектированного по уровню p24. Было показано, что ADAR1 связывается в клетке как с несплайсированной, так и всеми сплайсированными формами вирусной мРНК, и, кроме RRE элемента ADAR-1-зависимому редактированию подвергается участок в 5'-нетранслируемой области, общей для всех форм мРНК [131]. Этот участок располагается в R регионе вирусных LTR и является шпилькой с сигналом полиаденилирования AAUAAA, в 3'LTR он используется для терминирования транскрипции.

Отметим, что эти данные о возможном редактировании вирусной РНК не согласуются с гипотезой о том, что влияние параспеклей на репликацию ВИЧ-1 опосредовано удержанием отредактированной несплайсированной вирусной мРНК, содержащей RRE участок. Во-первых, в работах [130,131] редактирование RRE последовательности вирусной РНК при суперэкспрессии ADAR1 приводило к активации экспрессии вирусных белков с этих РНК, что противоречит удержанию этих РНК в ядре в параспеклях. Во-вторых, негативное влияние параспеклей наблюдалось и при эндогенном уровне ADAR ферментов [121,128], при котором значительного редактирования RRE участка обнаружено не было [126].

Исходя из существующих на данный момент данных, NEAT1 является негативным регулятором репликации вируса, и повышение уровня этой РНК в клетке в ответ на заражение ВИЧ-1 может рассматриваться как часть клеточного защитного механизма [120,121]. Однако, как происходит регуляция уровня NEAT1 при инфицировании ВИЧ-1 непонятно. Неясен и механизм параспекль-опосредованного подавления репликации. Это может быть удержание вирусных мРНК в параспеклях, по всей видимости, именно несплайсированной или не полностью сплайсированных форм за счет взаимодействия с белками SFPQ и NONO. При этом, скорее всего, A→I редактирование вирусной РНК в этом

процессе не участвует. Секвестирование РНК в параспеклях могло бы мешать Rev-зависимому экспорту из ядра и/или каким-то образом регулировать деградацию этих РНК. Однако в работе [126] ко-локализация вирусных транскриптов с SFPQ наблюдалась только в нуклеоплазме, но не в параспеклях. С другой стороны, возможно, отрицательное влияние параспеклей заключается в секвестировании свободного SFPQ из нуклеоплазмы, который, в таком случае, мог бы там стабилизировать несплайсированные INS-содержащие вирусные мРНК (Рисунок 12).

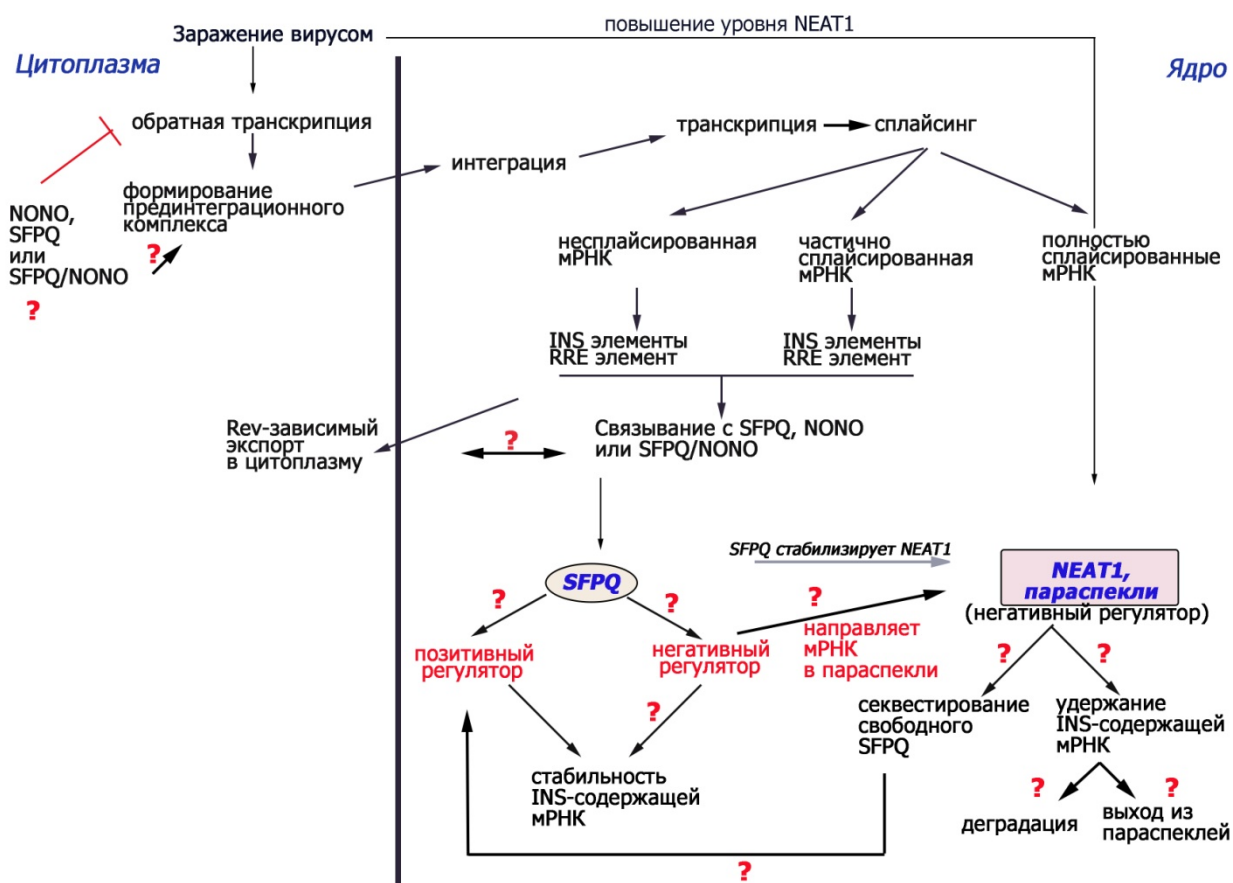


Рисунок 12. Схема предполагаемого участия SFPQ, NONO и NEAT1 в репликации ВИЧ-1. Неизвестные механизмы регуляции обозначены красным.

2.5. Заключение

Благодаря наличию доменов для взаимодействия и с нуклеиновыми кислотами, и с белками, SFPQ и NONO задействованы в различных клеточных процессах, но их отличительной чертой является участие в формировании кора больших ядерных рибонуклеопротеиновых комплексов параспеклей. Параспекли, состоящие из различных РНК-связывающих белков и длиной некодирующей NEAT1 РНК, часто называют бесполезными для клетки, поскольку какой-то критической для жизни клетки функции для

них не описано. Считается, что они необходимы для удержания А→I гипер-редактированных мРНК и секвестирования белков, входящих в их состав, из нуклеоплазмы. Последняя роль позволяет им быть опосредованно вовлеченными, например, в регуляцию транскрипции, противовирусного ответа. И если участие параспеклей во врожденном клеточном иммунитете против вирусов, запускаемом через TRR3, было описано и показан механизм, то роль параспеклей в ответе на ВИЧ-инфекцию пока неясна.

Существует не так много работ, посвященных участию параспеклей и белков SFPQ и NONO в регуляции какого-либо этапа репликации ВИЧ-1. Кроме того, полученные результаты противоречивы, не всегда в описанных исследованиях было проверено влияние на все этапы жизненного цикла, что не позволяет составить полноценную картину участия SFPQ, NONO и NEAT1 РНК в жизненном цикле этого вируса. Мы находимся на этапе накопления отдельных данных об эффектах изменения уровня этих белков и РНК на разные стадии репликации, однако уже сейчас можно проследить некоторые закономерности. По всей видимости, существует путь, приводящий к активации транскрипции NEAT1 в ответ на инфицирование клетки ВИЧ-1, как это было в случае с вирусами гриппа и простого герпеса. Однако нет единого мнения, какие сигнальные каскады запускаются при заражении разных типов клеток ВИЧ-1, и, как регулируется транскрипция NEAT1, тоже неясно. Тем не менее, NEAT1, являясь опорным компонентом параспеклей, подавляет репликацию ВИЧ-1. Прямое ли это влияние на вирусную мРНК или опосредованное регуляцией уровня параспекль-ассоциированных белков, непонятно. Кроме того, неясно, какую роль играют ядерные белки SFPQ и NONO в этой регуляции: как они влияют на обратную транскрипцию вируса, происходящую в цитоплазме, действительно ли взаимодействуют с интегразой и какое функциональное значение у этого взаимодействия. Среди нескольких работ общим является наблюдение о влиянии SFPQ на уровень вирусной несплайсированной мРНК. Во всех исследованиях использовался репортерный вектор, содержащий под контролем LTR промотора ВИЧ-1 часть вирусного гена *gag* с самым изученным регионом нестабильности INS-10 и участок RRE в 3'-нетранслируемой области этой мРНК для обеспечения Rev-зависимого экспорта. Во всех исследованиях SFPQ оказывал влияние на экспрессию с такой мРНК, но не с ее мутантом с нарушенной последовательностью INS. Однако в полноразмерной вирусной мРНК есть и другие регионы нестабильности, и их важность для SFPQ-опосредованной регуляции пока не исследована.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Буферы

В работе были использованы следующие буферы:

Буфер А (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 3 мМ 2-меркаптоэтанол, 1М NaCl, 5% сахара, 0.05% TritonX-100, 2 мМ PMSF);

Буфер Б (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.5 М NaCl, 5% глицерин, 0.05% TritonX-100, 1 мМ PMSF);

Буфер В (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1М NaCl, 5% глицерин, 50 мМ имидазол, 1 мМ PMSF);

Буфер Г (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1 М NaCl, 10% глицерин, 500 мМ имидазол, 1 мМ PMSF);

Буфер Д (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 1 мМ PMSF, 50 мМ NaCl);

Буфер Е (50 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 0.5М NaCl, 0.1% Тритон -100, 0.1 мМ PMSF);

Буфер Ж (50 мМ Tris-HCl, pH 7.8, 0.25 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 5% глицерин, 0.1 мМ EDTA).

Буфер З (20 мМ Hepes pH 7,5, 100 мМ NaCl, 7,5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мкг/мл БСА, 0,1% NP40).

Буфер И (50 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% глицерин, 100 мМ 2-меркаптоэтанол, ~0,0025% бромфеноловый синий).

Буфер К (50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 100 мМ NaCl, 2 мМ DTT, 1 мМ ЭДТА, 3% глицерин, 5 мкг/мл дрожжевая tРНК, 0.1 мг/мл БСА).

Буфер Л (20 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 10% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 0,05% Тритон-X100, 0,1% Твин20, 1 мМ DTT, 0,5 мМ PMSF).

Буфер М (0,1% SDS, 50 мМ HEPES, pH 7,9, 140 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% Тритон X-100, 0,1% Na-дезоксихолат).

Буфер Н (16,7 мМ Tris-HCl при pH 8,1, 1,2 мМ ЭДТА, 167 мМ NaCl, 0,01 % SDS и 1,1% Triton X-100).

Буфер О (50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, 2 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 0,1% SDS и 1% Тритон X-100).

Буфер П (50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, 2 мМ ЭДТА, 500 мМ NaCl, 0,1% SDS и 1% Тритон X-100).

Буфер Р (50 мМ Tris-HCl при pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 0,25 М LiCl, 1% NP40, 1% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS).

Буфер С (1% SDS, 0,1 М NaHCO₃).

Буфер Т (10 mM Трис-НСl при pH 7.5, 1mM CaCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 3% глицерин).

Буфер У (5 mM Tris-НСl при pH 8.1, 225 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, 1.5% Triton-X100).

Буфер Ф (50 mM Tris-НСl при pH 8.1, 3 mM ЭДТА, 0.3% SDS).

Буфер Х (5 mM HEPES при pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40).

TBST (50 mM Tris-НСl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20).

RIPA (50 mM Tris-НСl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% ДСН).

ТЕ буфер (10 mM Трис-НСl при pH 8,0, 1 mM ЭДТА).

3.2. Олигонуклеотиды и плазмиды

Все олигонуклеотиды (Таблицы 2, 3) были синтезированы амидофосфитным методом Т.С. Зацепиным (Сколковский институт науки и технологий).

Таблица 2. Используемые в работе праймеры

Название	Сиквенс
Ku70-N-NdeI	CATATGTCAGGGTGGGAGTCATATTACA
Ku70-C-BamHI	GGATCCGTCCTGGAAGTGCTTGGTGA
pET-Xho-sen	AACAAAGCCCGAAAGGAAGTCTCGAGTTGGCTGCTGCCACC
pET-Xho-as	GGTGGCAGCAGCCAACTCGAGTTCCTTTTCGGGCTTTGTT
Ku80-N-BamHI	GGATCCTTAAAAGAGGAATTATAATGGTGCGGTCGGGGAATAA
Ku80-C-XhoI	CTCGAGTTATATCATGTCCAATAAATCGTCCAC
Hexim-fw	ACTTCGAGGACTCTACTAGCC
Hexim-rv	GTTTCAGTCTAGTCTCCAACTTGG
Hexim-N-BglII	ATGCAGATCTATGGCCGAGCCATTCTTG
Hexim-C-XhoI	ATGCCTCGAGTTACTAGTCTCCAACTTGGAAGCGG
T7-7SK-fw	TAATACGACTCACTATAGGATGTGAGGGCGATCTG
T7-7SK-rv	AAAGAAAGGCAGACTGCC
7SK-fw	CACCAATGGAGACTGCAGTATTTAGCA
7SK-rv	GCATCTAACTTAGATGGGTAATGGGTCAAAAG
7SK-q-fw	GTCAAGGGTATACGAGTAGCTG
7SK-q-rv	TGACTACCCTACGTTCTCCTAC
U6-q-Fw	CGCTTCGGCAGCACATATAC
U6-q-rv	AAAATATGGAACGCTTCACGA
CMV_pGL-fw	GTACAGATCTGTGATGCGGTTTTGGCAG
CMV_pGL-rv	GTACAAGCTTAGCTCTGCTTATATAGACCTCCC
PGK_pGL-fw	GTACAGATCTGGGGTTGGGGTTGCGC
PGK_pGL-rv	GTACAAGCTTCTGGGGAGAGAGGTCGG
LTR_pGL-fw	ATGCCTCGAGTGGAAGGGCTAATTCACTCC
LTR_pGL-rv	ATGCGGATCCTGCTAGAGATTTTCCACACTGACT
FF-q-fw	CCGTGATGGAATGGAACAAC
FF-q-rv	CATAGAACTGCCTGCGTCA

GAPDH-fw	CCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH-rv	ACCCTGTTGCTGTAGCCA
LTR-q-fw	CAGCTGCTTTTGCCTGTACTG
LTR-q-rv	TCCACACTGACTAAAAGGGTCTGA
LTR-ΔMod-fw	ATGCCTCGAGAGAACTGCTGACATCGAGC
LTR-ΔLid-rv	ATGCGGATCCCAGTACAAGCAAAAAGCAGCT
LTR-U3-fw	TGGAAGGGCTAATTCCTCC
LTR-U3-rv	AGTACAAGCAAAAAGCAGCT
TAR-q-fw	GTTAGACCAGATCTGAGCCT
TAR-q-rv	GTGGGTTCCTAGTTAGCCA
3'UTR-p1-q	GATTGGCAGAACTACACACCAGGGC
3'UTR-p10-q	GCGGCTGTCAAACCTCCACTC
2Luc-3-end-fw	TTTGGAGCACGGAAAGACGA
2Luc-3-end-rv	CTCCTCCGCGCAACTTTTTC

Таблица 3. Последовательности использованных в работе siРНК

Название	Сиквенс
siSFPQ#1-s	CUUUCUGUUCGUAAUCUUU
siSFPQ#1-as	AAAGAUUACGAACAGAAAG
siSFPQ#11-s	CAAAGGAUUCGGAUUUAUU
siSFPQ#11-as	AAUAAAUCCGAAUCCUUUG
siC-s	AGGUCGAACUACGGGUCAA
siC-as	UUGACCCGUAGUUCGACCU
siKu70_352_s	GUGCAAAACGAAUUCUAGA
siKu70_352_as	UCUAGAAUUCGUUUUGCAC
siKu70_1025_s	GCUAAAACGGUUUGAUGAU
siKu70_1025_as	AUCAUCAAAACCGUUUUAGC
siKu80_179_s	ACAAGGAUGAGAUUGCUUU
siKu80_179_as	AAAGCAAUCUCAUCCUUGU
siKu80_423_s	CAUGGGAAAUCAAGUUCUA
siKu80_423_as	UAGAACUUGAUUUCCCAUG
siKu70_DNA-PK_s	CUAUGAAACUACUGAAGGA
siKu70_DNA-PK_as	UCCUUCAGUAGUUUCAUAG

Вектора pGEX-6p-1-Ku70, pcDNA3-Ku80-3xFlag, pcDNA-3Ku70-3xFlag были получены сотрудниками лаборатории химии нуклеиновых кислот химического факультета МГУ ранее.

Для получения плазмиды pET15b_His_Ku70_(-1nt)_Ku80 для экспрессии гетеродимера Ku70/Ku80 в клетках *E.coli* продукт ПЦР с праймерами Ku70-N-NdeI и Ku70-C-BamHI с вектора pGEX-6p-1-Ku70 был клонирован в вектор pET15b vector (Merk Millipore, USA) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. После этого новый сайт XhoI был введен в полученный вектор сайт-направленным мутагенезом с помощью набора Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, США) и праймеров pET-Xho-sen и pET-Xho-as. Ген Ku80 был амплифицирован с вектора pCDNA3-Ku80-3xFlag праймерами Ku80-N-BamHI и Ku80-C-XhoI и клонирован в полученный после мутагенеза вектор по сайтам BamHI и XhoI.

Для получения кодирующей последовательности гена белка HEXIM1, из клеток НЕК 293Т была выделена тотальная РНК, используя TRIZOL (Thermo Fisher Scientific, USA), согласно инструкции производителя. С полученной РНК был осуществлен синтез кДНК, используя кит для обратной транскрипции MMLV (Евроген, Россия) согласно протоколу. Кодирующая последовательность гена белка HEXIM1 была амплифицирована с кДНК с помощью праймеров Hexim-fw и Hexim-Rv. Для получения вектора прокариотической экспрессии, кодирующего HEXIM с GST-тагом на N-конце, была проведена ПЦР с полученной кодирующей HEXIM1 последовательности с праймерами Hexim-N-BglII и Hexim-C-XhoI, продукт реакции был клонирован в вектор pGEX-6p-1 между сайтов рестрикции BglII и XhoI. Вектор для эукариотической экспрессии HEXIM1 был получен с помощью амплификации кодирующей последовательности с праймерами Hexim-Afl-fw и Hexim-Afl-rv и клонирован в вектор pCDNA-3Ku70-3xFlag, после вырезания гена Ku70 по сайтам AflII.

Для получения репортерного вектора pGL3-CMV в вектор pGL3-Basic (Promega, США) по сайтам рестрикции BglII и HindIII был клонирован промотор CMV. Для получения вектора pGL3-LTR-HIV в вектор pGL3-Basic (Promega, США) по сайтам XhoI и BamHI был клонирован промотор LTR. В качестве матрицы для амплификации CMV были использованы плазмида pUCHR-inLuc, предоставленная к.м.н. Д.В. Мазуровым (ГНЦ Институт иммунологии ФМБА). Для получения полноразмерного LTR промотора с вектора pNL4-3-Luc-R-E- (NIH AIDS Reagent Program, Dr. Nathaniel Landau) был амплифицирован 3'LTR. Для амплификации использовались праймеры CMV-pGL-fw и rv, LTR-pGL-fw и rv. Для получения вектора pGL3-LTR-ΔTAR с делецией региона, кодирующего TAR РНК, вектор pGL3-LTR-HIV был обработан эндонуклеазами рестрикции BglII и AflII, имеющими сайты внутри региона, кодирующего TAR РНК. После этого лианеризованный вектор был обработан фрагментом Кленова (Thermo Fisher Scientific, США) и лигирован с использованием Т4-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения вектора pGL3-

-ΔMod-LTR с делецией 1-322 нуклеотидов LTR с вектора pNL4-3-Luc-R-E- был амплифицирован неполный LTR, используя пару праймеров LTR-ΔMod-fw и LTR-pGL-rv и клонирован по сайтам рестрикции XhoI и BamHI в лианеризованный вектор pGL3-Basic. Для получения вектора с делецией региона LTR, соответствующего лидерному участку мРНК Δ456-638, с вектора pNL4-3-Luc-R-E- был амплифицирован неполный LTR, используя пару праймеров LTR-pGL-fw и LTR-ΔLid-rv, и клонирован по сайтам рестрикции XhoI и BamHI в лианеризованный вектор pGL3-Basic.

Плазмида для эукариотической экспрессии белка Tat с Flag-тагом (pcDNA3-Tat-Flag) была любезно предоставлена Pr. Olivier Rohr, IUT Louis Pasteur, Université de Strasbourg.

Плазмида для эукариотической суперэкспрессии SFPQ (pcDNA3-SFPQ-myc) была получена из базы Addgene. Плазмида для экспрессии SFPQ со Strep-тагом в клетках *E.coli* была получена аспиранткой лаборатории Кихай Татьяной.

Последовательности всех полученных плазмид подтверждались секвенированием в ЦКП Геном.

3.3. Антитела

мышинные анти-His антитела (SAB1305538, Sigma);
кроличьи анти-GST антитела (G7781, Sigma)
кроличьи анти-Ku70 антитела (ab83502, Abcam);
кроличьи анти-Ku80 (#2735, Cell Signaling или ab119935, Abcam);
мышинные анти-актин антитела (A2103, Sigma);
мышинные анти-Cdk9 антитела (sc13130, Santa Cruz Biotechnology);
кроличьи анти-HEXIM1 антитела (ab25388, Abcam);
мышинные анти-SFPQ антитела (SAB4200501, Sigma);
кроличьи анти-НА антитела (SAB5600116, Sigma);
кроличьи анти-гистон H3 антитела (H0164, Sigma);
кроличьи анти-DNA-PKcs антитела (AB4300443, Sigma)
кроличьи анти-РНКП II СКД (фосфо-Ser5) (ab5131, Abcam);
кроличьи анти-РНКП II СКД (фосфо-Ser2) (ab5095, Abcam);
кроличьи анти-гистон H3 антитела (ab1791, Abcam);
кроличьи IgG поликлональные (ab171870, Abcam)
мышинные анти-Flag антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (A8592, Sigma);
мышинные анти-кролик антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (A6154, Sigma, USA);

козьи анти-мышь антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (A9044, Sigma, USA).

3.4. Вестерн-блот анализ

Анализируемые образцы белков разделяли в 10% ДСН-ПААГ по Лэммли, переносили на Immobilon®-P PVDF мембрану методом полусухого переноса в приборе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США) или мокрого переноса в буфере (50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 40 мМ глицин, 20% этанол и 0.08% ДСН) в камере для Вестерн-блоттинга Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, США). Мембрану инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока в течение 30 мин в буфере TBST и обрабатывали первичными антителами, согласно протоколу производителя. Затем производили отмывку мембраны в буфере TBST (3 раза по 10 мин) и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 1 часа с последующей отмывкой мембраны в буфере TBST. Визуализацию целевых белковых полос проводили с помощью субстрата пероксидазы хрена Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, США) в системе детекции люминесценции ChemiDoc MP system (Bio-Rad, США).

3.5. Культивирование эукариотических клеток и получение лизатов для Вестерн-блот анализа

Клетки НЕК 293Т, а также их модифицированные варианты Cr_KO Ku70, Cr_KO Ku80, Cr_KO DNA-PKcs и микроглиальные клетки человека HC69.5 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, пенициллин 100 ед/мл и стрептомицин 100 мкг/мл (все реагенты производства Invitrogen, США).

Клетки трансфицировали плазмидами с помощью кальций-фосфатной трансфекции либо реагента TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США). Для введения siРНК использовался реагент Lipofectamin RNAiMAX (ThermoFisherScientific, США) согласно инструкции. Через 48 ч после трансфекции готовились клеточные лизаты и анализировались в зависимости от задачи.

Для получения экстрактов для Вестерн-блот анализа клетки скручивали, промывали дважды холодным PBS и лизировали в лизисном буфере RIPA в течение 30 мин во льду в присутствии коктейля ингибиторов протеаз. Затем дебрис осаждали центрифугированием 14000g в течение 15 мин при 4°C. Концентрацию полученных лизатов измеряли с помощью реагента BioRad DC Protein Assay (BioRad). Образцы для нанесения на гель выравнивали по концентрации и добавляли денатурирующий буфер по Лэммли, инкубировали при 94 °C в течение 5 мин.

3.6. Получение и очистка рекомбинантных белков

Для получения белка 6xHis-Ku70-Ku80 клетки *E. coli* (DE3) Codon Plus/pLysS трансформировались вектором pET15b_His_Ku70_(-1nt)_Ku80 и росли в 2 л среды 2 YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л K₂HPO₄, 1.5 г/л NaH₂PO₄, 1% глицерина, pH 7.5) в присутствии 100 мг/л ампицилина при 37°C до оптической плотности 0.6. Экспрессия белка индуцировалась добавлением 0.1 mM ИПТГ при 18°C. После 6 ч культивации добавляли лактозу в концентрации 5 г/л и продолжали культивировать в течение 20 ч. После этого клетки осаждали центрифугированием (20 мин, 4°C, 8000 g), 50 г клеточного дебриса ресуспендировали в 1 л буфера А с добавлением 1 г/л лизоцима и инкубировали во льду в течение 30 мин. После ультразвуковой обработки нерастворимые клеточные остатки удаляли центрифугированием (20 мин, 4°C, 40000 g), а супернатант очищали от бактериальной ДНК инкубацией с 0.05% полиэтиленимином (pH 5.0) во льду в течение 30 мин и центрифугировали 45 мин при 4°C, 35000 g. Лизат добавляли к Ni-активированной агарозе (Thermo Fisher Scientific, США), уравновешенной буфером А, и инкубировали ночь при 4°C. Смолу промывали 3 раза 10-кратным избытком буферов Б и В и элюировали в буфере Г. Фракцию элюированных белков разбавляли 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 до финальной концентрации NaCl в образце 50 mM, после чего наносили на гепарин-сефарозу (GE Healthcare, США), промывали буфером Д и элюировали буфером Д в присутствии 400 mM NaCl. Концентрацию белка определяли по Брэдфорду и хранили в присутствии 20% глицерина при -80°C.

Для получения рекомбинантного препарата белка GST-HEXIM1, клетки *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS трансформировали плазмидой pGEX-6p-1-hHEXIM1, растили в 2 л 2% среды LB в присутствии 100 мг/л ампицилина при 37°C до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.6. После этого индукцию белка производили добавлением 0.1 mM ИПТГ и культивировали при 25°C в течение 3 часов. Клетки осаждали центрифугированием (20 мин, 4°C, 8000 g) и ресуспендировали в лизисном буфере Е, содержащем 1 г/л лизоцима, инкубировали во льду в течение 30 мин. После ультразвуковой обработки, лизат центрифугировали 20 мин при 4°C, 40000 g и наносили на глутатион-сефарозу (Thermo Scientific, США). После инкубации в течение ночи при 4°C смолу промывали 50 мл буфера Е и буфера Ж. Белок был элюирован в буфере Ж, содержащем 50 mM глутатион, после чего был проведен диализ против буфера Ж в течение ночи при 4°C.

Рекомбинантный белок Strep-SFPQ был экспрессирован в клетках *E. coli* и очищен аспиранткой лаборатории Кихай Татьяной.

Концентрации полученных белков определяли по Брэдфорду и хранили в присутствии 20% глицерина при -80°C.

3.7. Введение ^{32}P метки в олигонуклеотиды

Очищенные ДНК и РНК (10 pmol) лиганды инкубировались с 1 мкл Т4 полинуклеотидкиназы (Thermo Fisher Scientific, США) и 50 μCi [γ - ^{32}P]-АТФ (3000 Ci/mmol) в течение 1 ч при 37°C согласно протоколу производителя. Т4 полинуклеотидкиназа инактивировалась добавлением ЭДТА и экстрагировалась смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт. ДНК лиганды очищались от невключенной [γ - ^{32}P]-АТФ высаживанием 5-ти кратным избытком спирта из 0.6 М ацетата натрия. РНК-лиганды были дополнительно очищены от продуктов деградации на 15% денатурирующем ПААГ.

3.8. *In vitro* транскрипция 7SK РНК

In vitro транскрипция была выполнена с использованием MEGAscript™ T7 кит (Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу производителя в присутствии дополнительного 9 mM гуанозина для последующего введения ^{32}P на 5'-конец РНК.

кДНК последовательность 7SK РНК была получена с тотальной кДНК клеток линии НЕК 293Т с помощью ПЦР с праймерами 7SK-fw и 7SK-rv.

В качестве матрицы для Т7 транскрипции был использован продукт ПЦР, содержащий последовательность кДНК для 7SK РНК и последовательность Т7 промотора. Он был получен при помощи ПЦР с 7SK кодирующей последовательности с праймерами Т7-7SK-fw и Т7-7SK-rv. Праймер Т7-7SK-fw содержал последовательность Т7 промотора.

3.9. Анализ взаимодействия Ku с нуклеиновыми кислотами

Анализ взаимодействия Ku с нуклеиновыми кислотами производился методом «торможения в геле» при нативном гель-электрофорезе. Для этого 0.1 nM ^{32}P -меченные лиганды отжигались, а затем инкубировались с белком Ku в возрастающей концентрации в 20 мкл реакционного буфера К в течение 20 мин при 20°C, после чего помещались в лед. Комплексы были разделены в 5% нативном ПААГ при 4°C при 60V в течение 3-4 ч в 1хТВЕ буфере. Гель был высушен и визуализирован автордиографией (^{32}P).

Для «super-shift» анализа в реакционную смесь, содержащую 0.1 nM ^{32}P -меченную TAR РНК и 50 nM Ku, добавляли 1мкл антител анти-Ku70, анти-Ku80, анти-His и анти-актин и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для эксперимента по вытеснению РНК с помощью ДНК, использовали 40-звенный ДНК-дуплекс с последовательностью одной из цепей 5'-

GACTACGGTTCAAGTCAGCGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3'. ³²P-Меченную 0,1 нМ hp1RNA инкубировали с 100 нМ Ku в реакционном буфере в присутствии возрастающих концентраций немеченого ДНК-дуплекса (0, 0,1, 1, 10, 25, 50, 100, 1000 нМ) в течение 20 мин при комнатной температуре. В другом эксперименте ³²P-меченную 0.1 нМ hp1RNA предварительно инкубировали с 100 нМ Ku в реакционном буфере в течение 20 минут при комнатной температуре с последующим добавлением увеличивающихся количеств ДНК-дуплекса и инкубировали еще 20 минут.

Для изучения взаимодействия рекомбинантного Ku с полноразмерной 7SK РНК человека, 7SK РНК транскрибировали *in vitro* и вводили ³²P-метку на 5'-конец с помощью [γ -³²P]-АТФ и Т4 полинуклеотидкиназы. Для связывания инкубировали 5 нМ 7SK РНК с рекомбинантным Ku, взятом в диапазоне концентраций от 0 до 400 нМ, в буфере К в течение 20 мин при комнатной температуре с последующим разделением в нативном геле.

Для анализа геля использовали Typhoon FLA9500 Phosphorimager (GE Healthcare, США). Константы диссоциации определяли путем аппроксимации экспериментальных данных в программе GraphPad Prism7.03 с использованием уравнения $Y = B_{\max} * X^h / (K_d^h + X^h)$, где X=концентрация белка, Y=концентрация связанного лиганда, K_d = константа диссоциации, h = коэффициент Хилла, B_{max}= общая концентрация лиганда. Подготовка графиков и анализ экспериментальных данных проводились с использованием программного обеспечения GraphPad Prism7.03.

3.10. Футпринтинг РНКазой T1

100 нМ рекомбинантный белок Ku инкубировали с 10 нМ транскрибированной *in vitro* 5'-³²P-меченой полноразмерной 7SK РНК в 200 мкл буфера К в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем образцы, содержащие либо комплекс 7SK РНК с Ku, либо только свободную 7SK РНК, обрабатывали РНКазой T1 (0,005 U/мкл) (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 5 минут при 37°C. Расщепление РНК останавливали добавлением фенол-хлороформа с последующей экстракцией фермента и осаждением РНК этанолом в присутствии 5 мкг гликогена. Продукты реакции растворяли в буфере (80% формамид, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилोलцианол, 1xTBE) и разделяли на 6-10% и 10%-15% денатурирующем полиакриламидном геле.

3.11. Анализ взаимодействия SFPQ с U3 регионом вирусного LTR

ДНК фрагмент, соответствующий U3 региону вирусного LTR, был амплифицирован с вектора pGL-LTR-HIV с использованием праймеров LTR-U3-fw и LTR-U3-rv. Предварительно, праймер LTR-U3-fw был помечен ³²P для получения U3 фрагмента, ³²P-

меченного 5'-конца смысловой цепи. После ПЦР, полученный фрагмент U3 очищался в 1,5% агарозном геле и выделялся с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля Cleanup Standard (Евроген, Россия). Анализ взаимодействия Strep-SFPQ с U3 фрагментом производился методом «торможения в геле». Для этого 8 нМ ³²P-меченный U3 фрагмент инкубировались с возрастающей концентрацией белка Strep-SFPQ (0-500 нМ) в 20 мкл реакционного буфера Т в течение 30 мин при 20°C, после чего помещались в лед. Комплексы были разделены в 8% нативном ПААГ при 4°C при 60V в течение 3-4 ч в 1xTBE буфере. Гель был высушен и визуализирован автордиографией (³²P).

3.12. Футпринтинг ДНКазой I

300 нМ белок Strep-SFPQ инкубировали с 28 нМ 5'-³²P-меченым фрагментом U3 в 200 мкл буфера Т без добавления глицерина в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы, содержащие либо комплекс U3/Strep-SFPQ, либо только свободный фрагмент U3, инкубировали с 0.002 U ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 5 минут при 20° С. Расщепление ДНКазой I останавливали добавлением избытка ЭДТА и 0.6 М ацетата натрия. Белки экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт с последующим высаживанием ДНК этанолом в присутствии 5 мкг гликогена. Продукты реакции растворяли в буфере (80% формамид, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилолцианол, 1xTBE) и разделяли на 5% и 15% денатурирующем полиакриламидном геле толщиной 3 мм. Гель был высушен и визуализирован автордиографией (³²P).

3.13. Иммунопреципитация

Для РНК-иммунопреципитации, в клетки НЕК 293Т в чашке диаметром 100 мм кальций-фосфатной трансфекцией вводили 30 мкг пустого вектора pCDNA3.1 (отрицательный контроль) или ко-трансфицировали их 15 мкг pcDNA3_Ku70_3xFLAG и 15 мкг вектора pcDNA3_Ku80_3xFLAG. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в течение 30 мин на льду в буфере для лизиса Л, дополненном коктейлем ингибиторов протеаз (Thermo Fisher Scientific, США) и ингибитором РНКаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific). Экстракты очищали центрифугированием в течение 10 минут при 14000 × g при 4°C и концентрацию белка измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). 0,1 мг клеточных лизатов были сохранены в качестве контроля-«инпут». 1 мг лизата смешивали с агарозой, конъюгированной с анти-FLAG-антителами (Sigma) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Смола промывали 5 раз лизирующим буфером, вращая в течение 10 минут при 4°C, и связавшиеся РНК-белковые комплексы элюировали 0,1 М глицином, pH 2.5, в течение 20 минут при комнатной температуре. Элюированная

фракция и инпут были разделены на две порции для Вестерн-блот-анализа и выделения РНК реагентом TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. С полученной РНК синтезировали кДНК с использованием набора MMLV (Евроген, Россия). Количественную ПЦР проводили с праймерами для 7SK РНК человека 7SK-q-fw и 7SK-q-rv, для U6 РНК человека с праймерами U6-q-fw и U6-q-rv с использованием qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия) на приборе Biorad CFX96 (Biorad, США).

Для ко-иммунопреципитации, клетки лизировали в течение 30 минут на льду в буфере для лизиса Л с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Thermo Scientific, США). После 15 мин центрифугирования при 14000 об/мин определяли концентрацию белка методом Брэдфорда. Антитела анти-Cdk9 (sc13130, Santa Cruz Biotechnology), анти-HEXIM1 (ab25388, Abcam), анти-Ku80 (ab119935, Abcam) и контрольные иммуноглобулины кролика IgG (Invitrogen и Thermo Fisher Scientific, США) в качестве отрицательного контроля инкубировали с магнитными частицами, покрытыми белком G, Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 3 ч при 4°C, после чего добавляли 1 мг лизатов и инкубировали в течение ночи. После промывки белки элюировали буфером для нанесения для электрофореза по Лэммли (Bio-Rad) и анализировали Вестерн-блоттингом.

Для иммунопреципитации HEXIM1-FLAG клетки НЕК 293Т в чашке диаметром 100 мм трансфицировали либо 30 мкг пустого вектора pcDNA3.1 (отрицательный контроль), либо pcDNA3.1_HEXIM_3xFLAG фосфатом кальция. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировали в течение 30 мин на льду в буфере для лизиса Л с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Thermo Fisher Scientific, США). Экстракты очищали центрифугированием в течение 10 минут при $14000 \times g$ и концентрацию белка измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). 0,1 мг клеточных лизатов были сохранены в качестве инпута. 1 мг лизата смешивали с агарозой, конъюгированной с анти-FLAG-антителами (Sigma), и инкубировали в течение ночи при 4°C. Смола промывали 5 раз буфером для лизиса Л в течение 10 минут при 4°C, и связанные белковые комплексы элюировали буфером для электрофореза по Лэммли (Biorad), после чего анализировали Вестерн-блоттингом.

Для иммунопреципитации в присутствии коктейля РНКаз, клеточный экстракт после получения инкубировали в присутствии или в отсутствие РНКазы А 250 ед/мл и РНКазы Т1 1000 ед/мл в течение 10 минут при 37 ° С и проводили иммунопреципитацию, как указано выше.

3.14. Метод соосаждения белков

Для оценки наличия взаимодействия между GST-HEXIM1 и 6xHis-Ku70/Ku80 мы использовали GST- и His-соосаждение белков. Белки инкубировали в 150 мкл буфера 3 в течение 1 ч при комнатной температуре. В случае эксперимента по His6-соосаждению в буфер 3 добавляли 30 мМ имидазол. Далее к реакционной смеси добавляли 20 мкл глутатион-сефарозы (GST-соосаждение) или Ni-NTA-агарозы (His-соосаждение). Полученные смеси инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего смолу трижды отмывали 1 мл буфера 3 без БСА. Связанные со смолой белки элюировали 1X буфером И в течение 5 мин при 95°C, разделяли в ПААГ по Лэммли с последующим Вестерн-блот анализом.

3.15. Изучение влияния белков на активность промоторов в репортерной системе

Для анализа влияния моноаллельного нокаута генов исследуемых белков, клетки дикого типа и с нокаутом по одному из генов рассевали на 48 луночный планшет в равных количествах. На следующий день клетки трансфицировали кальций-фосфатной трансфекцией 100 нг репортерной плазмиды на основе pGL3-Basic, кодирующей люциферу светлячка под контролем тестируемого промотора. Для анализа активности промоторов в присутствии Tat, вместе с репортером ко-трансфицировались 10 нг либо контрольного вектора pcDNA-3.1, либо вектора pcDNA3-Tat-Flag. Через 48 ч клетки лизировали в буфере для пассивного лизиса Passive Lysis Buffer (Promega, США) в течение 10 мин на столе. Далее полученный лизат центрифугировали при 8500 об/мин в течение 1 мин. Для анализа брали 10 мкл супернатанта и добавляли 30 мкл люциферазного субстрата из набора Luciferase Assay System (Promega, США) и измеряли уровень люминесценции на мультиридере Victor3TM Multilabel Counter (Perkin Elmer, США). Также в этих лизатах измеряли уровень тотального белка методом Брэдфорд и нормировали уровень люминесценции на количество белка.

Для анализа влияния суперэкспрессии изучаемых белков, в клетки в 48 луночном планшете вместе с репортерными плазмидами с помощью кальций-фосфатной трансфекции вводилось 0.4 мкг плазмид, кодирующих изучаемые белки, либо пустой вектор pcDNA3.1. Далее анализ люциферазной активности проводился как описано выше.

Для анализа влияния снижения количества изучаемых белков с помощью siРНК, клетки в 24 луночном планшете трансфицировались siРНК к изучаемому белку или контрольной. На следующий день они рассевались в равном количестве в 48 луночный планшет и после прикрепления трансфицировались репортерными векторами с помощью

кальций-фосфатной трансфекции. Анализ активности люциферазы проводился как описано выше.

3.16. Анализ влияния изучаемых белков на уровень мРНК репортера

Для анализа уровня мРНК репортера в клетке в ответ на изменение количества изучаемых белков через 48 ч после трансфекции клетки снимались, как описано выше, и делились на две части. Одна часть использовалась для выделения РНК с помощью реагента TRIZOL, согласно инструкции, вторая – для анализа уровня люциферазы. Выделенная РНК обрабатывалась ДНКазой 1 в течение 30 мин при 37°C. Реакция останавливалась добавлением ЭДТА и инкубацией при 70°C в течение 10 мин. С полученной РНК синтезировали кДНК с использованием набора MMLV (Евроген, Россия). Анализ уровня мРНК люциферазы светлячка и GAPDH проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени с использованием qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия) на приборе Biorad CFX96 (Bio-Rad, США). Для этого использовались праймеры FF-q-fw и rv (для мРНК люциферазы светлячка), GAPDH-fw и rv (для мРНК GAPDH).

Для определения стадии транскрипции, на которую влияет Ku, посредством анализа уровня полноразмерной вирусной РНК и ее фрагмента, соответствующего TAR РНК, транскрибирующегося после инициации, клетки линии НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70 или Ku80 трансфицировали вектором pNL4-3_Luc.R-E-. Через 24 ч после трансфекции из клеток выделяли РНК и получали кДНК, как описано выше. Анализ уровня полноразмерной мРНК проводили, используя пару праймеров к 3'-нетранслируемой области вирусной мРНК – 3'UTR-p1-q и 3'UTR-p10-q; а уровня транскрипта сразу после инициации, используя пару праймеров к TAR региону мРНК – TAR-q-fw и TAR-q-rv.

3.17. Анализ влияния белка Ku на транскрипцию с интегрированного провируса

Для анализа влияния белка Ku на транскрипцию с интегрированного провируса были получены вирусные частицы на основе вектора pNL4-3-luc.E-.R-. Вектор pNL4-3-luc.E-.R- кодирует вирусный геном, содержащий ген люциферазы светлячка в позиции вирусного гена *nef*, и мутации в гене *env*, нарушающие синтез вирусного белка оболочки. Для этого клетки трансфицировались репортерной плазмидой pNL4-3-luc.E-.R- и плазмидой, кодирующей белок оболочки вируса везикулярного стоматита, в соотношении 1:1. Через 48 ч с клеток собирали среду, содержащую псевдо-вирусные репликативно-некомпетентные частицы. Концентрацию вируса определяли по содержанию p24 антигена (ВИЧ-1 p24-

антиген-ИФА-БЕСТ, ВекторБест, Россия). Трансдукцию клеток линии НЕК 293Т векторами на основе ВИЧ-1 производили путем добавления соответствующего количества вируса к клеткам: множественность инфекции по р24 антигену равна 1. Через 24 или 48 ч после трансдукции клетки отмывали от среды, измеряли их количество, лизировали и измеряли активность люциферазы с помощью набора Luciferase assay system kit (Promega, США). После успешно прошедшей трансдукции клетки культивировались в течение 2 недель для элиминирования неинтегрированных форм ДНК.

Для изучения влияния Ku на интегрированный провирус, полученные клетки рассевались в 48 луночный планшет и на следующий день трансфицировались siРНК к субъединицам Ku и контрольной siРНК. Через 48 ч анализировался уровень люциферазы в лизатах клеток, который нормировался на концентрацию белков в этих лизатах. Аналогично проводили изучение влияния повышения уровня Ku в клетке на активность промотора интегрированного провируса. Для этого клетки рассевались в 48 луночный планшет и на следующий день трансфицировались 0.5 мкг плазмид pcDNA3.1, pcDNA3-Ku70-3xFlag или pcDNA3-Ku80-3xFlag. Через 48 ч после трансфекции клетки лизировались, в лизате измеряли уровень люминисценции светлячка, как описано выше. Измеряли также концентрацию белка в лизатах, после чего уровень люминисценции нормировали на уровень белка.

3.18. Иммунопреципитация хроматина (ChIP)

3.18.1. Определение присутствия Ku на промоторе ВИЧ-1

Клетки НЕК 293Т в чашке с диаметром 150 мм трансфицировали с помощью кальций-фосфатной трансфекции репортерным вектором pGL3-LTR-HIV, кодирующим ген люциферазы светлячка под контролем промотора ВИЧ-1. ChIP проводили через 48 ч после трансфекции. Клетки фиксировали на чашке 1% формальдегидом в течение 10 минут на столе. После инактивации формальдегида с помощью 125 мМ глицина в течение 5 минут при комнатной температуре фиксированные клетки промывали 1xPBS, собирали с чашки и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса М до конечной концентрации 4×10^6 клеток/400 мкл в присутствии ингибиторов протеаз (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали на льду в течение 10 минут. После чего лизат обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового аппарата Bioruptor (Diagenode, Philadelphia, USA) в режиме 30 сек ON/30 сек OF в течение 30 мин при высокой интенсивности. Дебрис осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин при 4°C, а супернатант разводили

в 5 раз в буфере Н для иммунопреципитации. Перед иммунопреципитацией лизат предварительно очищали инкубацией в течение 2 ч с 10 мкл магнитных частиц Dynabeads Protein G. В иммунопреципитации использовались поликлональные кроличьи антитела против Ku80. В качестве негативного контроля использовались иммуноглобулины кролика. Разбавленные лизаты инкубировали ночь при 4°C с 3 мкг антител. После чего иммунокомплексы собирали на 30 мкл магнитных частиц Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, США), покрытых белком G, вращением в течение 2 ч при 4°C. Предварительно магнитные частицы выдерживали в буфере для иммунопреципитации хроматина (M+N), содержащем тРНК дрожжей и БСА. Смолу с иммунокомплексами промывали последовательно в течение 10 мин при 4°C с вращением, по одному разу буфером О с низким содержанием соли, буфером П с высоким содержанием соли, LiCl-буфером (Р) и дважды ТЕ буфером. Иммунокомплексы элюировали дважды 250 мкл буфера С в течение 15 минут при комнатной температуре. Элюаты и инпут нагревали до 65°C в течение ночи в присутствии 0,2 М NaCl и обрабатывали 2 мкл раствора протеиназы К (10 мг/мл) в 10 мкл 0,5 М ЭДТА и 20 мкл 1 М Трис-HCl (pH 6,5) в течение 1 часа при 45°C. ДНК экстрагировали фенолом/хлороформом и осаждали этанолом в присутствии гликогена. Иммунопреципитированную ДНК анализировали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени на Biorad CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия). Специфичность обогащения контролировалась амплификацией гена GAPDH. Использовали следующие последовательности праймеров: для определения участка LTR промотора - LTR-q-fw и LTR-q-rv, для детекции гена люциферазы - FF-q-fw и FF-q-rv.

Для анализа привлечения Ku к промотору интегрированного провируса использовали клетки микроглии человека, несущие встроенный геном репликативно-некомпетентного ВИЧ-1 с геном EGFP и делецией вирусных генов *gag* и *pol*. Процедуру ChIP проводили также, как описано выше, но в клетки не трансфицировали репортерную плазмиду и для детекции участка гена EGFP использовали праймеры GFP-q-fw и GFP-q-rv.

3.18.2. Определение присутствия фосфорилированных форм РНК полимеразы II на промоторе ВИЧ-1

Для определения уровня фосфорилированных форм РНКП II на промоторе ВИЧ-1 (фосфо-Ser2 элонгационная форма и фосфо-Ser5 инициаторная форма) проводили иммунопреципитацию хроматина из клеток линии НЕК 293Т, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV, через 48 ч после трансфекции. При этом для подтверждения правильной работы системы использовали клетки НЕК 293Т дикого типа, в

которые совместно с репортером трансфицировали либо пустой вектор pcDNA-3, либо вектор pcDNA-3-Tat-Flag, кодирующий вирусный белок-активатор транскрипции Tat. А для установления влияния подавления Ku на статус фосфорилирования РНКП II на промоторе ВИЧ-1 использовали клетки НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом Ku70.

Для одной экспериментальной точки использовался монослой клеток с двух чашек с диаметром 150 мм. ChIP проводили через 48 ч после трансфекции. Клетки фиксировали на чашке 1% формальдегидом в течение 10 минут на столе. После инактивации формальдегида с помощью 125 мМ глицина в течение 5 минут при комнатной температуре фиксированные клетки промывали на льду холодным 1xPBS, собирали с чашки в холодном PBS и центрифугировали при 1300 об/мин при 4°C в течение 5 минут. Клеточный осадок еще раз промывали 1xPBS и ресуспендировали в 6 мл буфера X для лизиса в присутствии ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Fisher Scientific, США), лизат несколько раз пропускали через иглу шприца для лучшего разбивания клеток, а затем инкубировали на льду в течение 15 минут. После этого цитоплазматический лизат центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин при 4°C. Осадок (ядра) ресуспендировали в 3 мл буфера Ф для получения ядерного экстракта. В 15 мл фальконе полученный ядерный лизат обрабатывали ультразвуком с помощью аппарата Qsonica700 с щупом 1/8'' при амплитуде 35% (мощности 15-17В) в течение 5,5 мин (2 сек ON, 28 OFF) для того, чтобы большая часть ДНК была расщеплена до фрагментов длиной 200-600 пар оснований. В процессе обработки ультразвуком фалькон с образцом находился в ледяной бане и через каждые 1.5 мин процесса образец перемешивался для равномерного озвучивания и охлаждения. Температура образца контролировалась и не превышала 10-12 °C. После обработки ультразвуком дебрис из лизата осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 14000 об/мин при 4°C. Полученный супернатант, содержащий хроматин, использовали для иммунопреципитации.

По поглощению при 260 нм измеряли количество ДНК в образце и на одну реакцию по иммунопреципитации брали 75 мкг хроматина. Лизат разбавляли буфером У, для снижения концентрации SDS до 0.1%, для всех иммунопреципитаций объем реакции поддерживали на одном уровне (450 мкл), регулируя его добавлением буфера У и Ф, в зависимости от объема добавленного хроматина. В иммунопреципитации использовались поликлональные кроличьи антитела против гистона H3 (в качестве контроля протекания иммунопреципитации хроматина), против С-концевого домена РНК полимеразы II, фосфорилированной по Ser5, против С-концевого домена РНК полимеразы II, фосфорилированной по Ser2. В качестве негативного контроля использовались поликлональные иммуноглобулины кролика. Разбавленные лизаты инкубировали ночь при

4°C с 2.4 мкг антител. После чего иммунокомплексы собирали на 20 мкл магнитных частиц Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, США), покрытых белком G, вращением в течение 2 ч при 4°C. Предварительно магнитные частицы несколько раз промывали буфером для иммунопреципитации (У+Ф) и блокировали в буфере для иммунопреципитации хроматина (У+Ф), содержащем 80 мкг/мл тРНК дрожжей и 0.1 мг/мл БСА в течение получаса при 4°C с вращением. Перед добавлением смолы к лизатам ее несколько раз промывали буфером для иммунопреципитации (У+Ф). Смола с иммобилизованными иммунокомплексами промывали последовательно в течение 5 мин при 4°C с вращением по два раза буфером О с низким содержанием соли, затем буфером П с высоким содержанием соли и LiCl-буфером (Р). После этого комплексы дважды промывали ТЕ буфером (10 mM Трис-HCl при pH 8,0, 1 mM ЭДТА) при комнатной температуре с переносом смолы в новые пробирки. Иммунокомплексы элюировали, дважды обрабатывая 100 мкл буфера С в течение 15 минут при комнатной температуре. Элюаты и инпут (1/100 разбавленного лизата, взятого на иммунопреципитацию) нагревали до 65°C в течение ночи в присутствии 0,2 M NaCl и обрабатывали 2 мкл раствора протеиназы К (10 мг/мл) в течение 1 часа при 55°C. ДНК очищали с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit для очистки ПЦР-продуктов (QIAGEN, США).

Иммунопреципитированную ДНК анализировали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени на Biorad CFX96 (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCR Mix-HS SYBR (Евроген, Россия). Использовали следующие последовательности праймеров: для определения участка LTR промотора - LTR-q-fw и LTR-q-rv, для детекции 5'-конца гена люциферазы - FF-q-fw и FF-q-rv, для детекции 3'-конца гена люциферазы - 2Luc-3-end-fw и 2Luc-3-end-rv. Обогащение рассчитывали как процент соосадившегося фрагмента ДНК относительно его количества в инпуте.

3.19. Обработка данных

Анализ последовательностей белков и генов проводился с помощью программы Blast, анализ и визуализации структуры белков проводились в программах ChimeraX или PyMol. Анализ и статистическая обработка результатов экспериментов проводились в Microsoft Excel и GraphPad Prism7. Поиск транскрипционных факторов, вовлеченных в регуляцию транскрипции с промотора ВИЧ-1, среди данных транскриптома и протеома проводился с использованием средств Microsoft Excel и с помощью языка программирования Java.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено в обзоре литературы, ядерные белки SFPQ и NONO оказывают влияние на репликацию ВИЧ-1, однако до сих пор точно неясно, на какую стадию или стадии жизненного цикла вируса они влияют и каков механизм этого влияния. Для белка Ku человека в работах нашей лаборатории было однозначно доказано его участие в репарации повреждений геномной ДНК после интеграции в нее ДНК ВИЧ-1. Вместе с тем, в некоторых работах были получены данные, указывающие на возможность участия Ku в транскрипции с интегрированного провируса. Задачей нашей работы было достоверно определить, могут ли белки SFPQ и Ku, а также холо-фермент DNA-PK, в состав которого входит Ku при репарации, принимать участие в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1.

4.1. Влияние SFPQ на экспрессию с промотора ВИЧ-1

4.1.1. Создание репортерной системы 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. Необходимо было создать систему векторов на основе pGL3, в которых ген люциферазы будет контролироваться как промотором ВИЧ-1, находящимся в его длинном концевом повторе LTR (pGL3-LTR_HIV), так контрольным промотором. 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'LTR региона вируса (первые 634 п.о.), так чтобы были включены все регуляторные элементы (Рисунок 13. А). Сам промотор расположен в конце региона U3, а транскрипция генов ВИЧ-1 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. Таким образом, каждая мРНК люциферазы светлячка начиналась со шпильки TAR.

В нашем распоряжении был также вектор pNL4-3.Luc.R-E-, кодирующий полный геном ВИЧ-1, в котором в ген *nef* встроена люцифераза светлячка (Рисунок 13. Б). При этом, чтобы при трансфекции клеток этим вектором не происходила сборка новых вирионов, в генах *env* и *vpr* произведен сдвиг рамки считывания, что нарушает синтез белков оболочки и регуляторного белка Vpr. 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.

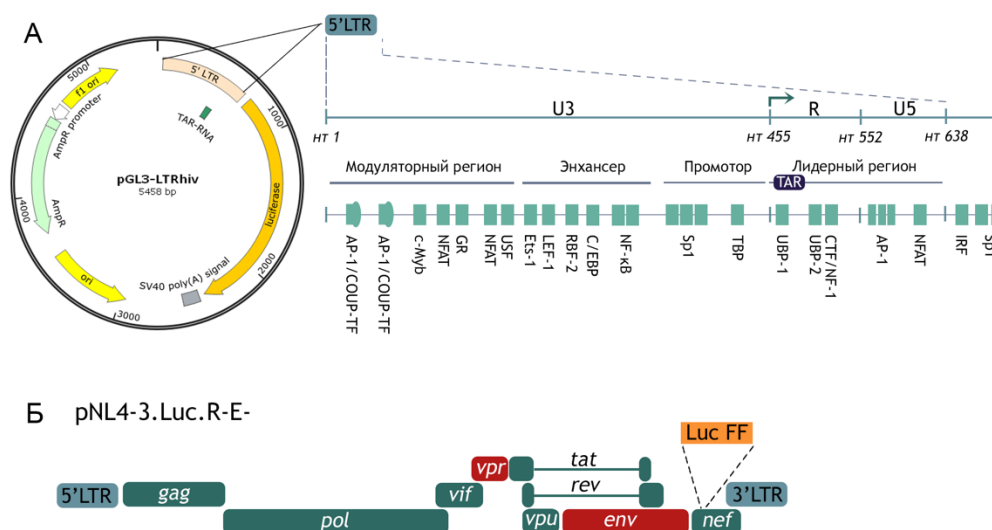


Рисунок 13. Схемы используемых в работе векторов для анализа влияния исследуемых белков на экспрессию с промотора ВИЧ-1. (А). Схематическое изображение вектора pGL3-LTRhiv и 5'LTR региона генома ВИЧ-1. Указаны главные регуляторные элементы на основании работы [17]. **(Б).** Схематическое представление 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).

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

Для проверки влияния SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 мы использовали простую систему репортерных векторов, описанных в разделе 4.1.1, которыми трансфицировали клетки с повышенным или пониженным уровнем SFPQ. Через 48 ч после трансфекции репортеров, клетки лизировали и измеряли уровень люминесценции лизата, который нормировали на количество тотального белка в лизате. Для анализа влияния SFPQ использовали либо клетки с суперэкспрессией мус-тагированного SFPQ с вектора pcDNA3-SFPQ-мус, полученного из базы Addgene, либо клетки с пониженным с помощью коротких интерферирующих РНК (siРНК) уровнем эндогенного SFPQ. Эффективность изменения

уровня белка была подтверждена с помощью Вестерн-блота (Рисунок 14 А-Б). Для использования в экспериментах на основании Вестерн-блота были выбраны siРНК №1 (siSFPQ#1) и №11 (siSFPQ#11), продемонстрировавшие наибольшее снижение уровня SFPQ.

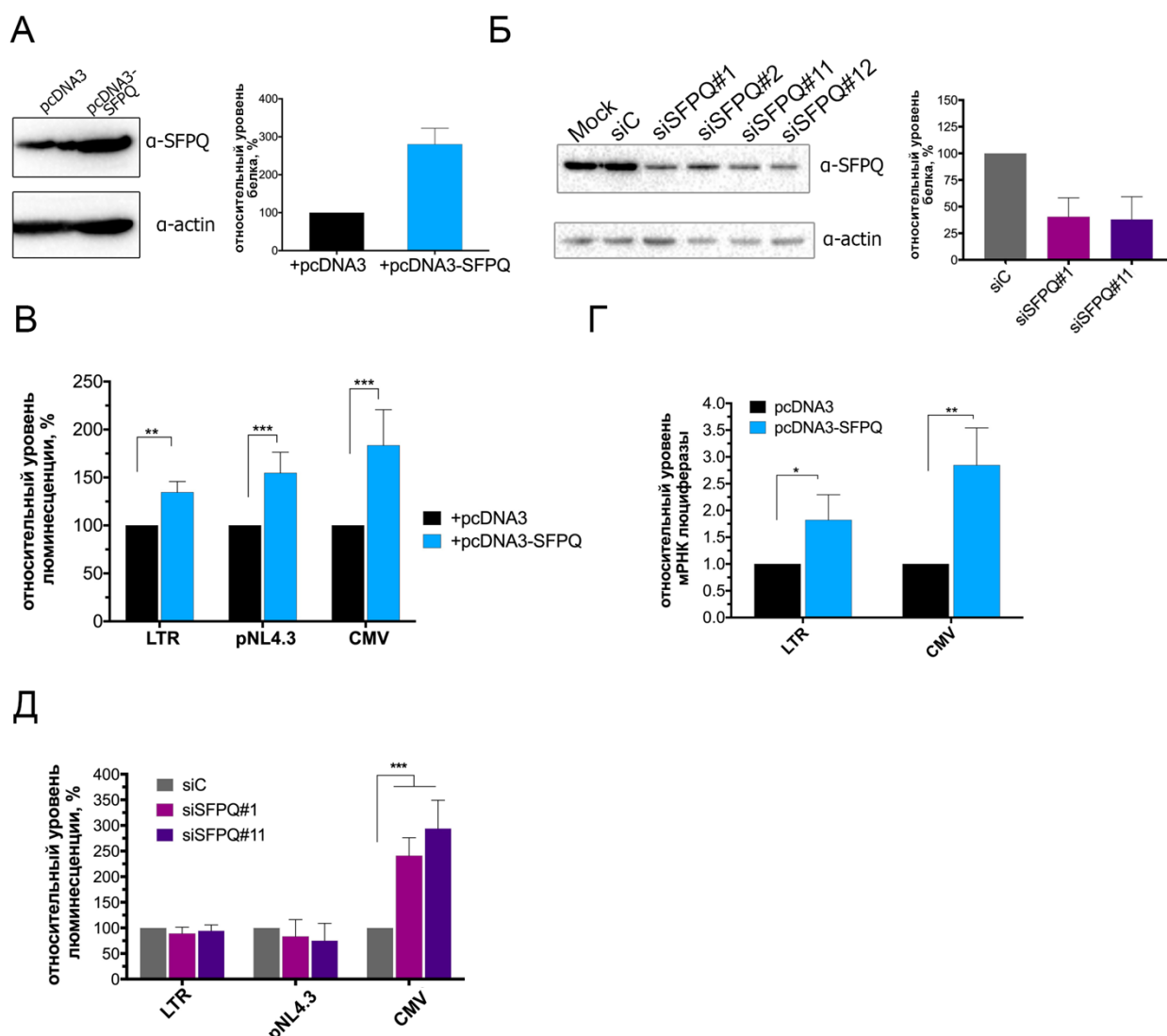


Рисунок 14 Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белка SFPQ на эффективность экспрессии люциферазы в клетках HEK 293Т. (А). Вестерн-блот анализ экспрессии тус-меченного SFPQ при трансфекции клеток HEK 293Т вектором pcDNA3-SFPQ (слева). Актин проявлен как контроль нанесения. Изменение уровня белка SFPQ при его суперэкспрессии с плазмиды pcDNA3-SFPQ; обсчет результатов Вестерн-блота (справа). (Б). Вестерн-блот анализ уровня белка SFPQ в клетках, обработанных siРНК к SFPQ, среди них для использования выбраны siSFPQ#1 и siSFPQ#11. Изменение уровня белка SFPQ при его подавлении с помощью siSFPQ#1 и siSFPQ#11. Обсчет результатов Вестерн-блота. (В). 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). (Г). 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. (Д). Влияние нокдауна SFPQ на экспрессию люциферазы с промоторов LTR и CMV, а также с вектора pNL4.3-Luc.R-E-. Приведено

среднее минимум 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

Клетки линии НЕК 293Т ко-трансфицировали плазмидой для суперэкспрессии SFPQ или пустым вектором и репортерными плазмидами и через 48 часов после трансфекции в лизатах клеток измеряли уровень экспрессированной люциферазы светлячка. Интенсивность люминесценции нормировали на общее количество белка в лизате, измеренное с помощью метода Бредфорда. Оказалось, что суперэкспрессия SFPQ приводит к небольшому повышению (примерно на 30-50 %) уровня экспрессии люциферазы с LTR промотора ВИЧ-1 и в репортерном векторе pGL-LTR-HIV, и в векторе pNL4.3-Luc.R-E- (Рисунок 14 Б). Интересно, что положительное влияние SFPQ на промотор CMV оказалось даже выше, чем на LTR. Используя вектора pGL-LTR-HIV и pGL-CMV, мы выяснили, что повышение уровня люциферазы при суперэкспрессии SFPQ связано с увеличением уровня ее мРНК (Рисунок 14 В).

Для определения влияния нокдауна SFPQ на транскрипцию люциферазы с репортерных векторов клетки линии НЕК 293Т трансфицировали siРНК против SFPQ или контрольной siРНК (siC). Через 48 ч, когда уровень SFPQ в клетках падал, их трансфицировали репортерными векторами, а еще через 48 ч анализировали уровень люциферазы. При нокдауне SFPQ с помощью siРНК мы не наблюдали значимого эффекта на экспрессию люциферазы с промотора LTR, возможно, оставшегося в клетках количества SFPQ оказалось достаточно для поддержания исходного уровня транскрипции. Что касается промотора CMV, то нокдаун SFPQ также, как и его суперэкспрессия, стимулировал экспрессию люциферазы с промотора CMV (Рисунок 14 Г). Мы пока не можем объяснить полученные данные, стоит только отметить, что в литературе встречался такой феномен, когда и суперэкспрессия экзогенного SFPQ, и его нокдаун оказывали одинаковый эффект, но объяснения этому не предложено [127].

4.1.3. Влияние SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 опосредовано взаимодействием SFPQ с участком ДНК в U3 регионе LTR

Ранее было показано, что SFPQ регулирует транскрипцию гена IL-8 за счет взаимодействия с промоторным регионом этого гена, при этом была идентифицирована последовательность ДНК, с которой SFPQ взаимодействует (Рисунок 15 А) [119]. Как уже указано выше, используемый нами репортерный вектор pGL-LTR-HIV содержит весь вирусный длинный концевой повтор, включая модуляторный регион, взаимодействующий с транскрипционными факторами, промотор и лидерный регион вирусной мРНК (Рисунок

13 А). Мы проанализировали регион 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 (красным цветом выделены нуклеотиды, которые не совпадают с консенсусной последовательностью (Рисунок 15 А)). Мы предположили, что взаимодействие SFPQ с этим сайтом определяет его позитивный эффект на экспрессию люциферазы с промотора LTR ВИЧ-1.

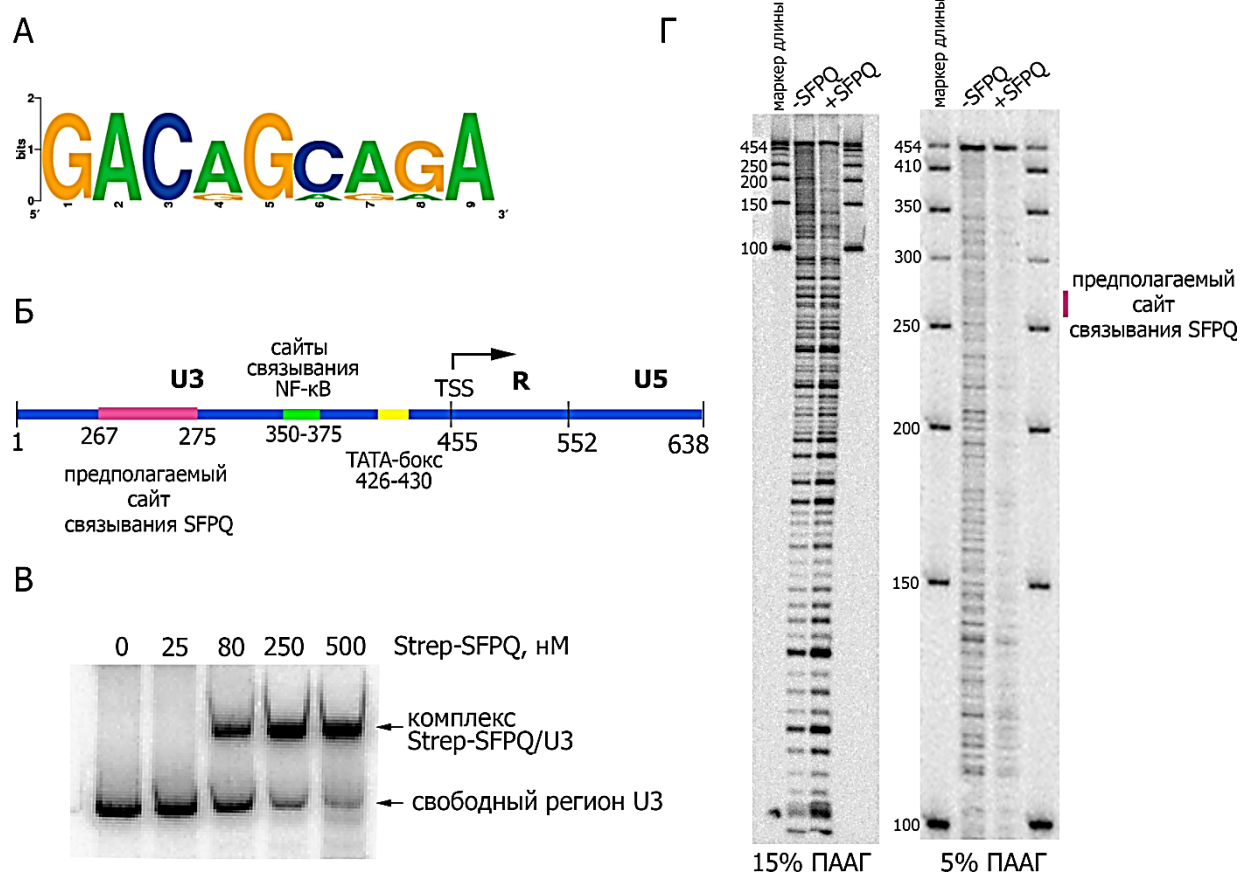


Рисунок 15. Взаимодействие SFPQ с ДНК. (А). Консенсусная последовательность сайта связывания SFPQ, присутствующая в промоторном регионе гена IL8 [119]. **(Б).** Схематическое представление LTR участка вирусной ДНК: содержит регионы U3, R, U5 со стартом транскрипции (TSS) на границе U3 и R. Обозначены предполагаемый сайт связывания SFPQ, сайты связывания активатора NF-κB и ТАТА-бокс. **(В).** Анализ связывания 8 нМ 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.

Для того, чтобы проверить, что SFPQ действительно может взаимодействовать с ДНК вируса, в нашей лаборатории аспиранткой Татьяной Кихай и с.н.с. Агапкиной Юлией был получен препарат рекомбинантного белка SFPQ, содержащий на N-конце метку Strep,

представляющую собой последовательность из 8 аминокислотных остатков WSHRPQFEK. С помощью ПЦР с ^{32}P -меченым праймером к 5'-концу LTR и обратным праймером к концу региона U3 мы получили фрагмент LTR (1-454), соответствующий целому региону U3, содержащий вирусный промотор и модуляторный регион с сайтами связывания транскрипционных факторов (схема целого LTR приведена на Рисунок 15 Б). Этот фрагмент также содержит потенциальный сайт связывания SFPQ, аналогичный предсказанному сайту в промоторном участке гена IL8. Мы проверили взаимодействие рекомбинантного препарата белка Strep-SFPQ с этой ДНК методом торможения комплекса ДНК-белок в нативном геле. За образованием комплекса следили по появлению полосы, мигрирующей выше свободного 5'- ^{32}P -меченного ДНК-лиганда (Рисунок 15 В). Было установлено, что Strep-SFPQ взаимодействует с U3 регионом вирусной ДНК *in vitro*. Для определения места посадки Strep-SFPQ на этом участке LTR, была проведена обработка 5'- ^{32}P -меченного региона U3 с помощью ДНКазы I в присутствии и в отсутствии Strep-SFPQ. Продукты гидролиза ДНК были проанализированы в денатурирующем ПААГ (Рисунок 15 Г). 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 [119].

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 TATA-бокса, содержащая определенный нами участок связывания SFPQ ($\Delta\text{Mod_LTR}$ - $\Delta 1-322$ 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 ($\Delta\text{Lid_mRNA}$ - $\Delta 456-638$). Мы повторили эксперимент по влиянию суперэкспрессии SFPQ на экспрессию люциферазы с обоих делеционных вариантов вектора pGL-LTR-HIV в клетках линии HEK 293T. Оказалось, что отсутствие лидерного региона ($\Delta\text{Lid_mRNA}$) не изменило характера влияния SFPQ. В то же время, суперэкспрессия SFPQ перестала стимулировать экспрессию люциферазы с вектора $\Delta\text{Mod_LTR}$, в котором отсутствовал модуляторный регион, содержащий предложенный нами сайт связывания SFPQ (Рисунок 16). 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.

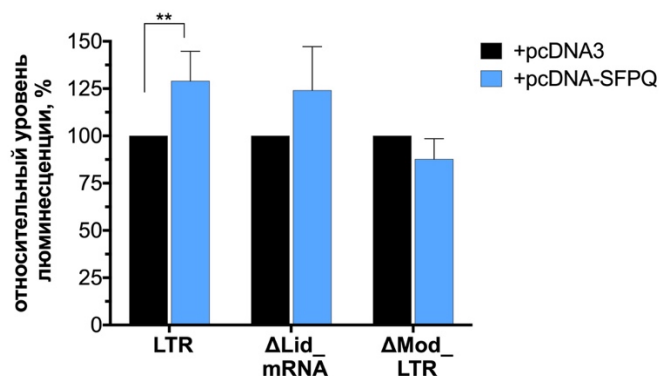


Рисунок 16. Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белка SFPQ на эффективность экспрессии люциферазы с репортерного вектора pGL-LTR-HIV дикого типа (LTR) и его делеционных вариантов (Δ Lid_mRNA и Δ Mod_LTR) в клетках HEK 293T. Приведено среднее не менее 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением. ** - $p < 0,01$; (согласно t-критерию Стьюдента).

4.2. Участие DNA-ПК в регуляции транскрипции ВИЧ-1

4.2.1. Подходы по изменению уровня субъединиц DNA-ПК в клетке

Для изучения влияния субъединиц DNA-ПК на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 мы использовали несколько систем изменения уровня субъединиц в клетке: снижение их уровня достигалось моноаллельным нокаутом или с помощью временного нокдауна трансфекцией клеток HEK 293T короткими интерферирующими РНК к Ku70 (siKu70) и к Ku80 (siKu80). Анализ лизатов через 48 ч после трансфекции методом Вестерн-блот с использованием антител к Ku70 и Ku80 показал, что короткие интерферирующие РНК работают эффективно (Рисунок 17.А). При этом снижение уровня одной субъединицы Ku с помощью siРНК приводило к снижению уровня и второй субъединицы.

Клетки линии HEK 293T с моноаллельным нокаутом Ku70 (Cr_KO Ku70), Ku80 (Cr_KO Ku80), DNA-ПКcs (Cr_KO DNA-ПКcs) были получены с использованием системы CRISPR/Cas9 и любезно предоставлены нам к.м.н. Д.В. Мазуровым (ИБГ РАН). Им была разработана новая система для получения поликлональных нокаутных линий клеток [132]. Для их получения в целевой ген в результате котрансфекции компонентов CRISPR/Cas9 и донорской ДНК производили вставку короткой оригинальной конструкции на основе гликопротеина CD52, слитого с тагом HA. Это позволяет окрасить клетки антителами на HA-таг и с помощью сортера отобрать только те из них, в которых произошло встраивание целевого гена. Мы проанализировали уровень экспрессии генов, подвергшихся нокину, с помощью Вестерн-блота. Анализ показал, что для каждого из генов (Ku70, Ku80, DNA_ПКcs) прошел только моноаллельный нокаут (Рисунок 17.Б). Видно, что он приводил к значительному снижению уровня соответствующего белка в клетке. Кроме того, также видно, что, как и при использовании соответствующих siРНК, снижение уровня одной из

субъединиц гетеродимера Ku приводило к значительному снижению уровня второй субъединицы этого гетеродимера, что объясняется низкой стабильностью каждой индивидуальной субъединицы в клетках. Такой эффект также наблюдался и в опубликованных работах [42,43].

Для исследования влияния повышенной внутриклеточной концентрации белков Ku70 и Ku80 с промотора LTR ВИЧ-1 мы использовали полученные ранее в лаборатории конструкции pcDNA3.1-Ku70-3xFLAG и pcDNA3.1-Ku80-3xFLAG. Обе субъединицы на своих С-концах маркированы FLAG-тагом. Было показано, что с конструкций идет суперэкспрессия белков Ku70-Flag и Ku80-Flag (Рисунок 17.В). Тем не менее, в связи с высоким уровнем Ku в клетке, суперэкспрессия субъединиц обычно добавляла максимум 50% от уровня эндогенного белка.

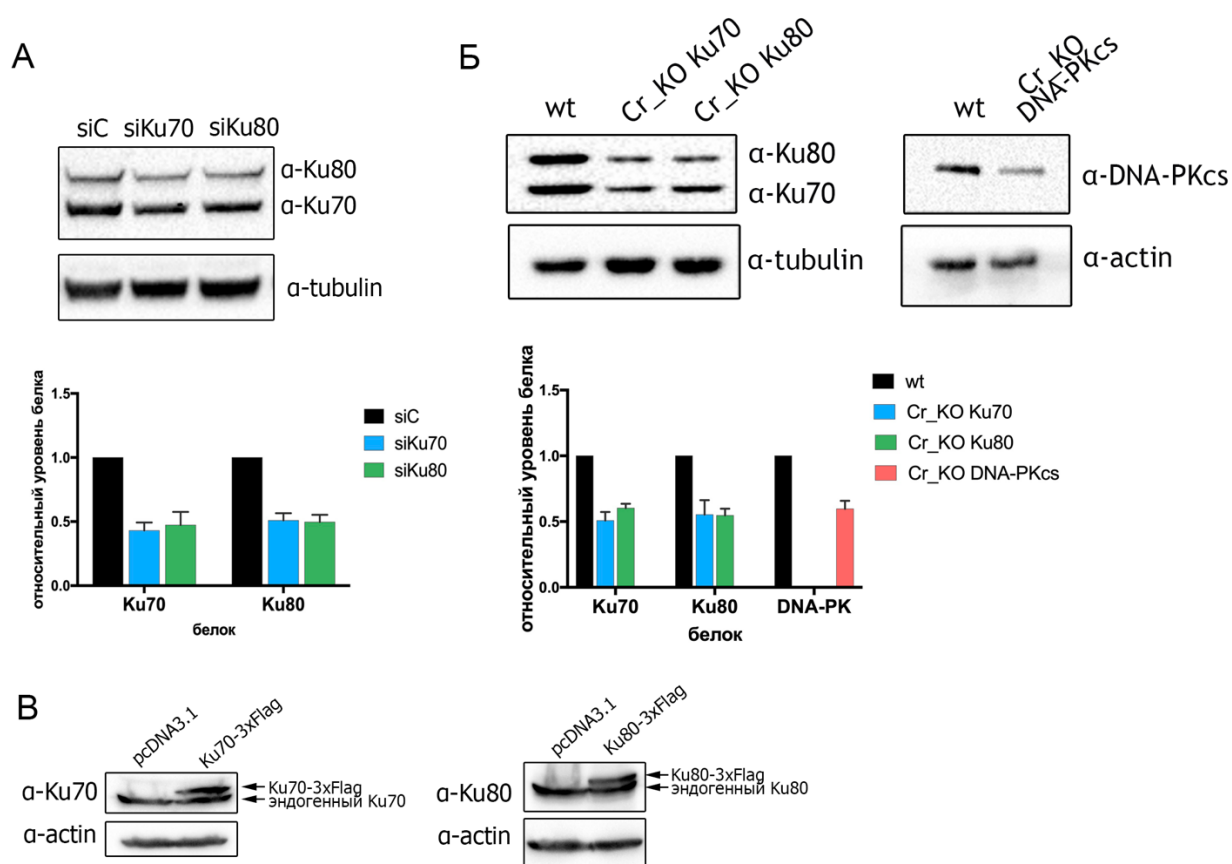


Рисунок 17. Анализ изменения уровня субъединиц DNA-ПК с помощью коротких интерферирующих РНК (А), моноаллельного нокаута (Б) и суперэкспрессии (В) методом Вестерн-блот.

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

Мы изучили влияние субъединиц комплекса DNA-ПК на экспрессию люциферазы с промотора ВИЧ-1, используя описанные в разделе 4.1.1 репортерные вектора (Рисунок 18).

Для анализа влияния моноаллельного нокаута генов белков Ku70, Ku80, DNA-PKcs в клеточной линии НЕК 293Т на экспрессию люциферазы светлячка под контролем LTR ВИЧ-1 в векторах pGL3-LTR-HIV и pNL4-3.Luc.R-E-, а также промотора цитомегаловируса (CMV), одинаковое количество клеток дикого типа и с нокаутом трансфицировали репортерными плазмидами и через 48 часов после трансфекции измеряли уровень экспрессированной люциферазы светлячка. Интенсивность люминесценции нормировали на общее количество белка в лизате, измеренное с помощью метода Бредфорда. Для определения влияния нокаута Ku клетки линии НЕК 293Т трансфицировали siРНК против Ku70, Ku80 или контрольной siРНК (siC). Через 48 ч, когда уровень Ku в клетках падал, их трансфицировали репортерными векторами, а еще через 48 ч анализировали уровень люциферазы. В экспериментах по влиянию каталитической субъединицы DNA-PKcs на эффективность транскрипции с промотора ВИЧ-1 также был использован коммерчески-доступный ингибитор каталитической активности DNA-PKcs NU7441, который добавляли к клеткам за 24 ч до лизиса и измерения уровня люминесценции [133]. Для определения влияния повышенного уровня Ku клетки НЕК 293Т ко-трансфицировали репортерным вектором и векторами для суперэкспрессии Ku70 и Ku80 и через 48 ч детектировали люминесценцию в лизатах, которую также нормировали на количество белка в лизате.

Было установлено, что снижение уровня Ku70 и Ku80 в клетке приводит к падению экспрессии люциферазы с промотора LTR примерно вдвое (Рисунок 18 А, 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 (Рисунок 18 Г, 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 (Рисунок 18 Б). Таким образом, оказалось, что Ku является положительным фактором транскрипции с промотора LTR ВИЧ-1.

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 вообще не обнаружили влияния Ku на уровень мРНК люциферазы, синтезируемой с промотора CMV (Рисунок 18 Б). Таким образом, влияние Ku на транскрипцию с промотора LTR можно считать специфичным.

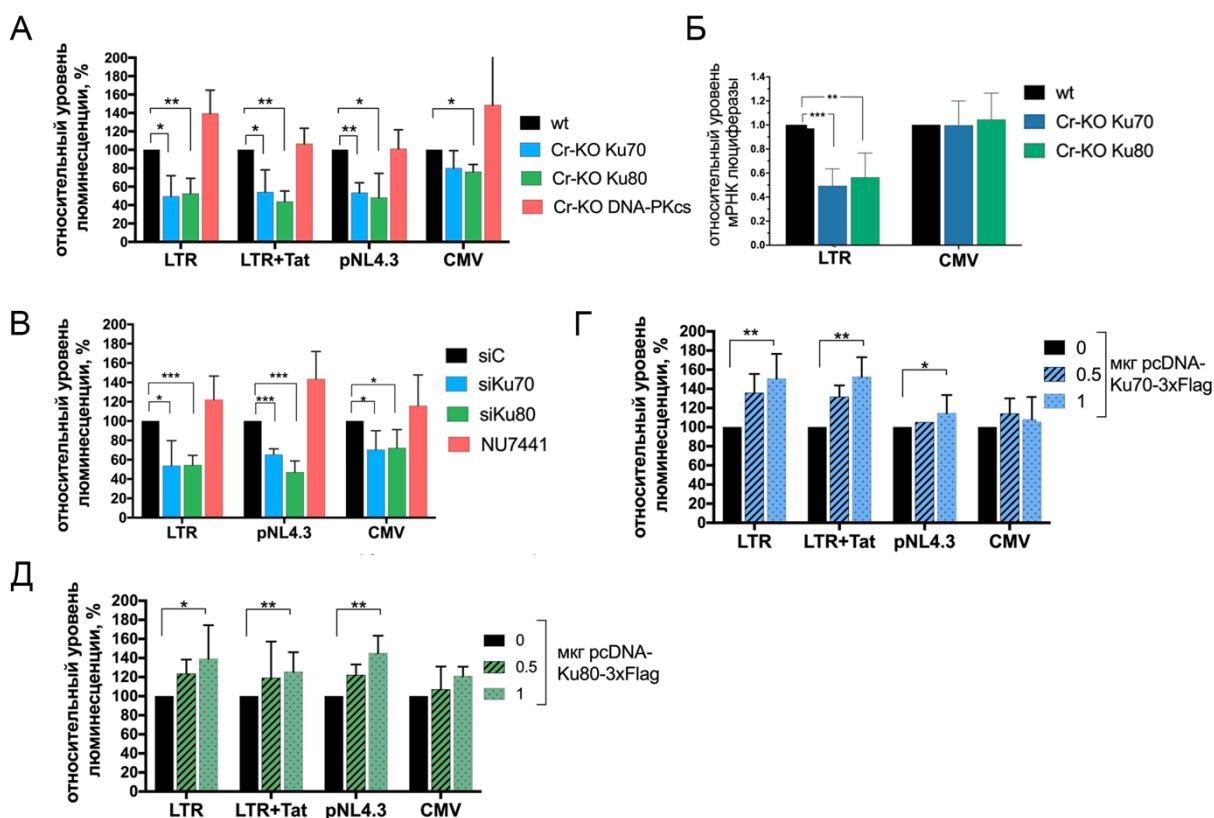


Рисунок 18. Анализ влияния изменения внутриклеточной концентрации белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs в клетках HEK 293T на эффективность экспрессии люциферазы. (А). Влияние моноаллельного нокаута белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs на активность промоторов ВИЧ-1 (LTR), LTR промотора ВИЧ-1 при ко-трансфекции вектора, 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 нокдауна 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). Клетки ко-трансфицировались возрастающим количеством плазмид для суперэкспрессии Ku70 и Ku80. 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 активатором элонгации транскрипции ВИЧ-1 является вирусный белок Tat [18]. Связываясь с РНК-шпилькой TAR, он разрушает ингибиторный комплекс Р-TEFb-HEXIM-7SK РНК и привлекает Р-TEFb к вирусному промотору LTR для фосфорилирования РНК-полимеразы II и активации элонгации [22,23,134,135]. 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. Учитывая,

что в случае этого вектора Ku оказывал такое же положительное влияние на экспрессию люциферазы, как и при транскрипции с промотора LTR в векторе pGL3-LTR-HIV, мы предположили, что Ku влияет 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 (Рисунок 18 А, 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 [70] и [71] 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, но не CMV в клетках линии Jurkat, трансдуцированных лентивирусными векторами, несущими ген люциферазы под контролем LTR или CMV. 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 (Рисунок 18 А, 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 возможное участие Ku в регуляции транскрипции ВИЧ-1 обсуждалось в нескольких работах [62,63,68,69]. Так, в работе [69] 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 постинтеграционной репарации ДНК [38], причем для этого процесса важна фосфорилирующая активность DNA-PKcs. Следовательно, эффект Ku на экспрессию вирусных генов, описанный в работе [69], 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. Тем не менее, мы решили дополнительно проверить участие Ku в регуляции транскрипции с интегрированного провируса, исключив его влияние на стадию постинтеграционной репарации. Для этого 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 (Рисунок 19). 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.

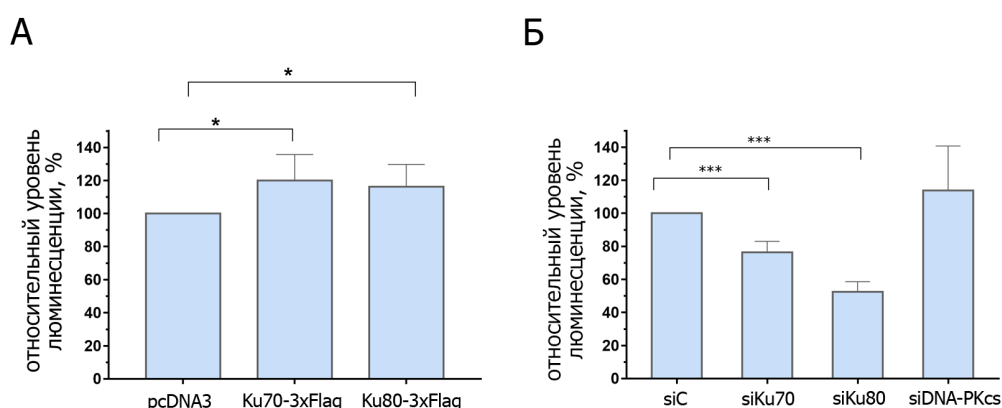


Рисунок 19. Влияние субъединиц DNA-PK на экспрессию интегрированного провируса NL4-3.Luc.R-E- в клетках линии HEK 293Т. (А). Влияние суперэкспрессии Ku70 (Ku70-3xFlag) и Ku80 (Ku80-3xFlag). **(Б).** Влияние нокдауна субъединиц DNA-PK с помощью siРНК. Клетки HEK 293Т инфицировались репликативно-некомпетентными 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). * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

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

Мы выяснили, что Ku является положительным регулятором транскрипции с промотора ВИЧ-1, однако механизм участия Ku в этом процессе был не ясен. Проще всего было предположить, что Ku связывается с промотором, аналогично тому, что мы показали для SFPQ. Известно, что Ku является ДНК-связывающим белком с очень высоким сродством к концам ДНК ($K_d = 1.5-4.0 \cdot 10^{-10}$ М) [46]. Связывания Ku с плазмидными ДНК не обнаружено, но есть данные, что он может сиквенс-специфично связываться с некоторыми промоторами, как это предполагается для некоторых клеточных генов: Hsp70, с-тус, мяРНК U1 [51–53]. В таком случае его влияние на транскрипцию с промотора ВИЧ-

1 может быть объяснено взаимодействием с участком в LTR. Другая возможность – непосредственное взаимодействие Ku с каким-то из факторов, влияющих на транскрипцию, или опосредованное влияние Ku на уровень транскрипционного фактора, участвующего в регуляции транскрипции генов ВИЧ-1. Так, было показано влияние Ku на экспрессию субъединицы p50 фактора NF-κB [54] и субъединицы c-jun фактора Ap-1 [55]. Оба этих транскрипционных фактора являются важными регуляторами транскрипции генов ВИЧ-1. Не исключено и более сложное, комплексное влияние Ku, обусловленное несколькими перечисленными путями. В этой связи, для определения пути влияния Ku на транскрипцию с LTR промотора мы последовательно изучили все предполагаемые механизмы.

4.3.1. Ассоциация Ku с промотором ВИЧ-1

Ранее было показано привлечение каталитической субъединицы DNA-PKcs на промотор ВИЧ-1 и ее положительный эффект на эффективность вирусной транскрипции [70]. Однако механизм привлечения DNA-PKcs к промотору остался неясен. Возможно, ДНК-связывающий компонент Ku участвует в этом процессе, однако в работе [70] не было изучено присутствие самого Ku на промоторе ВИЧ-1. Ранее в работе [69] с помощью иммунопреципитации хроматина из клеток линий СЕМ-Т4 (клетки острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза) и SUP-T1 (клетки лимфоидной Т-клеточной лимфомы) было показано присутствие Ku80 на LTR через 48 ч после инфекции вирусом, собранным с вектора pNL4.3env⁻. Однако, уже после работы [69] появились данные о взаимодействии Ku с интегразой ВИЧ-1, и, соответственно, привлечении Ku к разрыву ДНК на месте интеграции через взаимодействие с интегразой [38]. Возможно поэтому, что в эксперименте, описанном в работе [69], ассоциация Ku с промотором могла быть обусловлена не столько взаимодействием Ku с вирусной ДНК, сколько с интегразой в месте интеграции. Таким образом, на сегодняшний день нет четких доказательств ассоциации Ku с промотором ВИЧ-1 в отсутствие интегразы, хотя, как было описано выше в разделе 4.2.2, 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 отсутствие интегразы. Для этого мы провели иммунопреципитацию хроматина на клетках линии НЕК 293Т, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV (Рисунок 20.А), и клеточной линии HC69.5 (Рисунок 20. Б-В). HC69.5 — это микроглиальные клетки человека, несущие интегрированный репликативно-некомпетентный провирус со встроенным геном белка EGFP и делецией генов *gag* и *pol* (Рисунок 20. Б). Эта клеточная

линия является моделью латентного провируса, а сами микроглиальные клетки – главный резервуар латентного ВИЧ-1 в центральной нервной системе [136]. При иммунопреципитации с антителами к Ku80 мы детектировали приблизительно 4-х кратное обогащение участка ДНК, соответствующего вирусной промоторной области в LTR. Мы также наблюдали небольшое обогащение участков ДНК, соответствующих телу репортерного гена в обеих клеточных линиях (люциферазы в НЕК 293Т, трансфицированных рGL-LTR-HIV, и зеленого флюоресцентного белка EGFP в клетках HC69.5). Таким образом, Ku ассоциирован с промотором ВИЧ-1 и в плазмидной ДНК, и в уже интегрированном латентном провирусе.

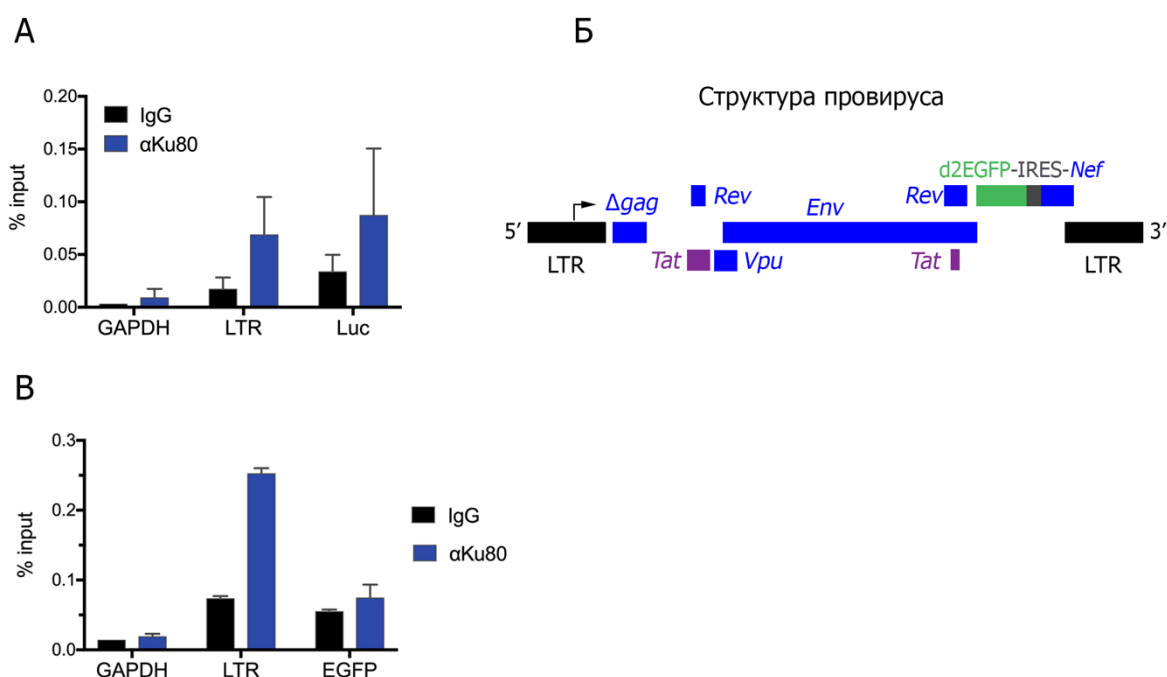


Рисунок 20. Ассоциация Ku с промотором ВИЧ-1 в клеточных линиях НЕК 293Т и HC69.5. (А). Иммунопреципитация хроматина с антителами против эндогенного Ku80 в клеточной линии НЕК 293Т, трансфицированной вектором рGL-LTR-HIV. (Б). Структура интегрированного в геном микроглиальных клеток человека HC69.5 репликативно-некомпетентного провируса ВИЧ-1, содержащего ген EGFP. (В). Иммунопреципитация хроматина с антителами против эндогенного Ku80 в клеточной линии HC69.5, несущей интегрированный провирус. ПЦР анализ на промотор LTR, кодирующую часть гена люциферазы (Luc) или EGFP (зеленого флюоресцентного белка), 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. Как уже отмечено выше, Ku сиквенс-неспецифично взаимодействует с концами двуцепочечной ДНК, но не с внутренними последовательностями [46]. Тем не менее, в работе [62] был предсказан сайт связывания Ku на промоторе ВИЧ-1, на основе сходства последовательности в LTR ВИЧ-1 с участками

LTR другого ретровируса MMTV (вирус рака молочных желез мыши), с которым, как считается, Ku взаимодействует сиквенс-специфично [52]. Однако позднее предсказанный сайт связывания Ku в LTR ВИЧ-1 не был подтвержден: наблюдался в равной степени негативный эффект нокдауна Ku80 на экспрессию репортера с промотора LTR дикого типа и с его варианта, в котором предсказанный сайт был заменен случайной последовательностью, после инфекции вирусными частицами на основе ВИЧ-1 [69].

Сотрудником нашей лаборатории Королевым С.П. был проведен поиск новых возможных специфичных сайтов связывания Ku на LTR участке вирусного генома. Для этого с помощью ПЦР был получен полноразмерный LTR ВИЧ-1, содержащий остатки биотина на 5'-концах обеих цепей ДНК. Полученная ДНК затем была иммобилизована на стрептавидин-сефарозу и дополнительно обработана стрептавидином, чтобы закрыть свободные концы ДНК и помешать их связыванию с Ku. Для проверки возможности связывания Ku с внутренними участками LTR, иммобилизованная таким образом ДНК инкубировалась с ядерными лизатами клеток НЕК 293Т и наличие Ku среди соосажденных с ДНК белков анализировалось с помощью Вестерн-блота. Было установлено, что Ku из ядерных лизатов 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 [137]. 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 [22,23]. 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. Показано его РНК-зависимое участие в поддержании длины теломер [138] и взаимодействие со шпилькой в 5'-нетранслируемой области мРНК гена TP53, приводящее к снижению эффективности трансляции этой мРНК [139]. Тем не менее, 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.

4.3.2. Получение препарата рекомбинантного гетеродимера Ku70/Ku80

Для изучения свойств и функций Ku *in vitro* необходимо получить очищенный белок. Чаще всего в работах встречается Ku, полученный из ядер клеток млекопитающих. Однако, для его получения необходимы хроматографические очистки, в итоге, выход белка низкий, а процесс достаточно дорогостоящий. Также есть работы по получению 6xHis-меченного Ku из клеток насекомых в бакуловирусной системе, что также является достаточно сложной системой [140,141]. Мы решили отработать условия выделения рекомбинантного белка в клетках *E. coli*¹.

Гетеродимер Ku состоит из двух субъединиц: Ku70 и Ku80. Мы хотели выделять субъединицы белка по-отдельности, а затем формировать гетеродимер. В штамме *E.coli* BL21-CodonPlus, который имеет в геноме дополнительные копии генов tРНК к редким в *E.coli* кодонам, ранее в нашей лаборатории получали субъединицу Ku70 с GST-меткой на N-конце, однако белок при экспрессии подвергался значительному протеолизу [141]. Для получения субъединицы Ku80 необходимо было сконструировать вектор, кодирующий Ku80 с другим тагом – шестигистиридиновым (6xHis). В нашем распоряжении был вектор прокариотической экспрессии белков под контролем промотора бактериофага T7 – pET-15b. Он позволяет получать белок с шестью гистидинами на N-конце для последующего выделения и очистки с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-смоле. В качестве исходного материала для клонирования Ku80 в плазмиду pET-15b была использована кДНК человеческого белка Ku80 (мРНК NM_021141.4), заказанная в компании Евроген. Однако, используя полученную конструкцию, выделить белок Ku80 не получилось: мы наблюдали очень низкий уровень экспрессии белка после индукции, который могли детектировать только антителами.

Эффективность экспрессии гена может зависеть от эффективности двух стадий: транскрипции и трансляции. При транскрипции уже использовался один из сильнейших промоторов – промотор бактериофага T7, поэтому нужно было добиться повышения эффективности трансляции. Одним из подходов, позволяющих увеличить эффективность инициации трансляции, является введение в состав вектора новой короткой рамки считывания (цистрона) так, чтобы стоп-кодон нового цистрона был вблизи или перекрывался со старт-кодоном второго цистрона, кодирующего целевой белок [143]. Эффект увеличения выхода белка возникает за счет трансляционного сопряжения. Сотрудником ИМБ им. В.А. Энгельгарда РАН к.х.н. А.В. Ивановым нам был любезно

¹ Процесс получения нами гетеродимера Ku70/Ku80 опубликован в в работе [142], по мотивам которой написан раздел 4.3.2 настоящей диссертации

предоставлен такой вектор – рЕТ21d-2с [144]. В нем в качестве проксимального цистрона стоит короткая АТ-богатая последовательность. Следует отметить, что эта рамка считывания содержит дополнительную последовательность Шайна-Дальгарно на несколько нуклеотидов выше старт-кодона гена целевого белка для обеспечения эффективной ре-инициации трансляции (Рисунок 21). Ранее эта конструкция использовалась для успешной экспрессии гена белка NS5В вируса гепатита С [144].



Рисунок 21. Схема участка вектора для повышенной экспрессии гена белка Ku80. Стрелкой показан T7-промотор, подписаны два цистрона, SD – последовательность Шайна-Дальгарно, 6xHis – последовательность, кодирующая шестигистидиновый таг на С-конце целевого белка.

Нами было проведено клонирование гена Ku80 в вектор – рЕТ21d-2с. Проверка уровня экспрессии белка Ku80 в *E.coli* BL21-CodonPlus при 37°C после добавления индуктора ИПТГ показала, что с такой конструкции белок Ku80 синтезируется (Рисунок 22.А). Однако весь индуцированный белок после лизиса клеток ультразвуком оставался в осадке (Рисунок 22.Б). Варьируя температуру и время наращивания культуры клеток после индукции белка, мы не смогли получить Ku80 в растворимом виде. В итоге нам не удалось выделить субъединицу Ku80.

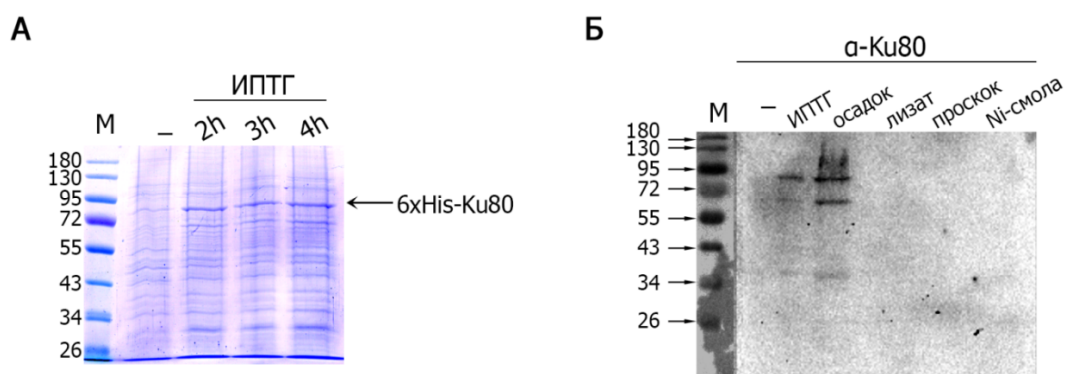


Рисунок 22. Получение белка Ku80 с помощью бицистронного вектора рЕТ21d-2с-Ku80. (А). Проверка уровня индукции экспрессии гена Ku80 при 37°C. Нанесены тотальные лизаты клеток без индукции (-) и через 2, 3, 4 ч после добавления ИПТГ электрофорезом в ДСН-ПААГ. (Б). Проверка связывания Ku80-6xHis с Ni-NTA-смолой. Вестерн-блот анализ с антителами на Ku80 (α-Ku80). М – дорожка с маркерами масс (кДа). Обозначения дорожек: ИПТГ – тотальный клеточный лизат после индукции транскрипции гена продуцируемого белка; осадок – осадок после

центрифугирования клеток, разрушенных ультразвуком; лизат – растворимая фракция клеточного лизата после центрифугирования; проскок – белки, не связавшиеся со смолой; Ni-смола – смола со связавшимися после инкубации белками.

Мы решили изменить подход и экспрессировать обе субъединицы Ku с одной плазмиды, чтобы гетеродимер формировался сразу при синтезе субъединиц. Мы предполагали, что это повысит растворимость и снизит деградацию отдельных субъединиц. Для этого мы использовали вектор pETDuet-1, позволяющий ко-экспрессировать 2 белка независимо с двух отдельных T7 промоторов. В него мы клонировали ген белка Ku70 6xHis-метку на N-конце для очистки гетеродимера методом аффинной хроматографии на Ni-активированной агарозе. Однако этот подход также не помог избежать их протеолитической деградации и повысить растворимость. Также образующийся гетеродимер не был способен стабильно связываться с Ni-активированной смолой, что затрудняло выделение чистого препарата белка (Рисунок 23).

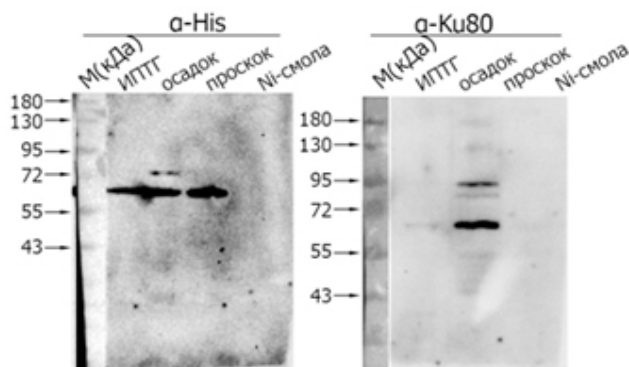


Рисунок 23. Очистка Ku, полученного с вектора pET-Duet-1, на Ni-NTA-смоле. Вестерн-блот анализ с антителами на 6xHis-Ku70 (α -His) и Ku80 (α -Ku80). М – дорожка с маркерами масс (кДа). Нанесены дороржки: ИПТГ – клеточный лизат после индукции транскрипции гена продуцируемого белка; осадок – осадок после центрифугирования клеток, разрушенных ультразвуком; проскок – белки, не связавшиеся со смолой; Ni-NTA-смола – смола со связавшимися после инкубации белками. (Опубликовано в работе [142]).

Существует только одна работа, в которой был успешно получен рекомбинантный гетеродимер в бактериях, однако описаны те же проблемами, что и у нас: деградация субъединиц и их низкая растворимость [140]. Однако, им удалось получить белок Ku70/Ku80 в бицистронной системе, где гены обеих субъединиц располагаются в одной мРНК в виде двух цистронов с внутренним сайтом посадки рибосом. Мы решили получить плазмиду для ко-экспрессии субъединиц Ku70 и Ku80 с одной мРНК, аналогичный представленному в статье [140]. В вектор прокариотической экспрессии белка pET-15b были клонированы ген белка Ku70 с 6xHis-меткой на N-конце и ген белка Ku80, а между

ними была последовательность Шайна-Дальгарно и A/U-богатая последовательность. Однако с такой конструкции белок Ku80 практически не синтезировался.

Мы провели оптимизацию этой плазмиды так, чтобы экспрессия белка Ku80 в бицистронной конструкции была сравнима с экспрессией белка Ku70 с первого цистрона (Рисунок 24.А). В новом векторе мы расположили последовательность Шайна-Дальгарно и A/U-богатую последовательность внутри 3'-конца первого цистрона (гена Ku70). Также мы перенесли ген белка Ku80 так, чтобы рамки считывания обоих цистронов перекрывались на 1 нуклеотид: старт-кодон Ku80 начинался внутри стоп-кодона Ku70. Согласно [145], такое расположение цистронов, последовательности Шайна-Дальгарно и A/U-богатой последовательности повышает эффективность трансляции второго цистрона. Это помогло бы увеличить выход белка Ku80.

После оптимизаций условий экспрессии и выделения белка с использованием двух последовательных хроматографических очисток на Ni-активированной смоле и на гепарин-сефарозе, как и в работе [140], мы получили препарат белка 6xHis-Ku70/Ku80, который был подтвержден с помощью масс-спектрометрии и Вестерн-блота с антителами к Ku70 и Ku80 (Рисунок 24.Б). При этом, используя сконструированный вектор, мы получили выход полноразмерного белка около 0,5 мг/л культуры, что согласуется с выходом белка, полученным в работе [140].

Согласно Вестерн-блот анализу, даже несмотря на присутствие избытка субъединицы Ku70, белок Ku80 подвергается значительной протеолитической деградации (Рисунок 24.Б). Преобладающий продукт деградации массой ~ 65 кДа составлял 40% белка согласно Вестерн-блоту. Мы проанализировали его с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF (выполнен в.н.с. НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского Серебряковой М.В.) и установили, что первым определенным N-концевым пептидом при обработке трипсином являлся ²¹⁰MVMISLEGEDGLDEIYSFSESLR²³². Соответственно, продукт деградации Ku80 представляет собой C-концевой фрагмент длиной примерно 523 а.к. В нем отсутствует большая часть N-концевого домена α-спираль/β-бочка фактора фон Виллебранда типа А (alpha-helix/beta-barrel von Willebrand A (vWA)), который, согласно рентгеноструктурному анализу, не участвует ни во взаимодействии с ДНК, ни в формировании гетеродимера с Ku70 [44,146]. Это объясняет способность C-концевого фрагмента Ku80 формировать стабильный комплекс с 6xHis-Ku70 и со-выделяться с ним во время обеих хроматографических очисток.

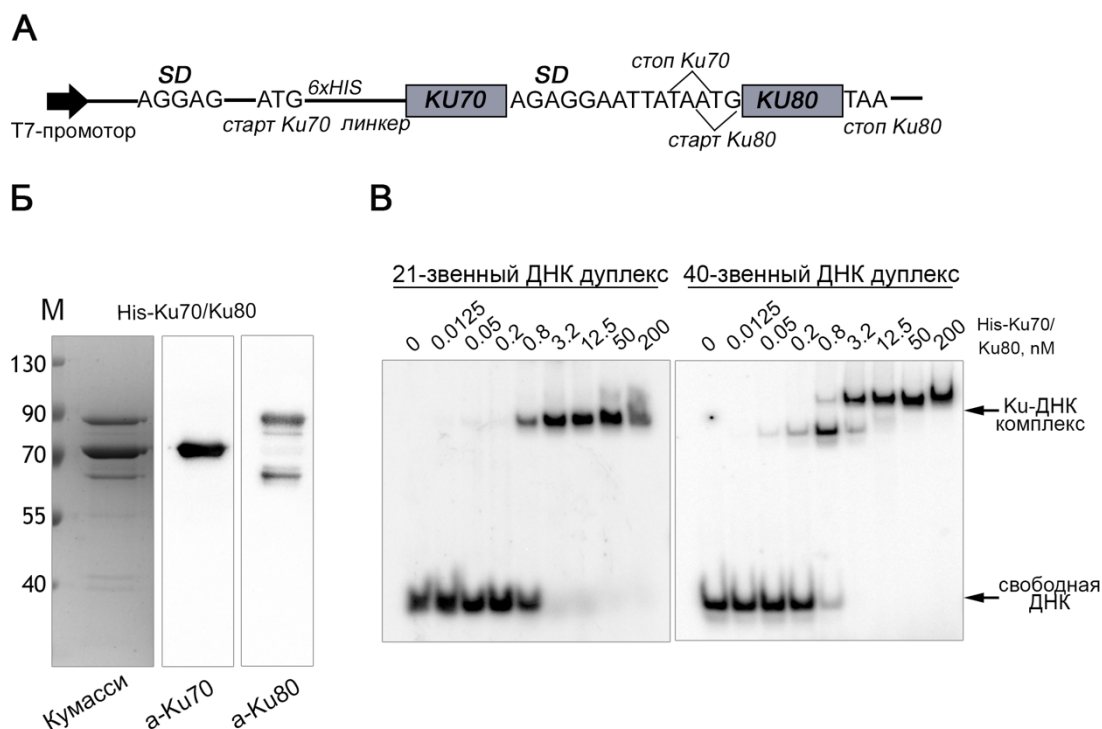


Рисунок 24. Получение и характеристика ДНК-связывающей активности рекомбинантного гетеродимера 6xHis-Ku70/Ku80. (А). Схема строения части вектора pET15b-bicis-Ku, кодирующего белки Ku70 и Ku80. С Т7 промотора (стрелка) транскрибируется бицистронная мРНК, содержащая две перекрывающиеся рамки считывания: указаны начало и конец каждой рамки (старт, стоп). **(Б).** Полученный препарат белка Ку с продуктами его протеолиза. ДСН-полиакриламидный гель, окрашенный Кумасси, и Вестерн-блот анализ препарата Ку с антителами на Ku70 (α -Ku70) и Ku80 (α -Ku80). М – дорожка с маркерами подвижности белков с массой в кДа. **(В).** Анализ связывания 32 P-меченных 0.1 нМ ДНК-дуплексов длиной 21 и 40 п.о. с белком 6xHis-Ku70/Ku80 (концентрация белка указана над дорожками) электрофорезом в 5% ПААГ в неденатурирующих условиях.

Самая изученная функция Ку - это распознавание концов двуцепочечной ДНК при репарации путем негомولوجического объединения концов [49,147–149]. При этом Ку связывается с ДНК сиквенс-неспецифически и ему достаточно 14 звенного дуплекса [44]. Для проверки ДНК-связывающей способности полученного нами гетеродимера были использованы 5'- 32 P-меченные 21-звенный и 40-звенный ДНК дуплексы. Связывание изучалось методом торможения комплекса ДНК-белок в нативном геле. За образованием комплекса следили по появлению полосы, мигрирующей выше свободного 5'- 32 P-меченного ДНК-лиганда. Оказалось, что наш препарат 6xHis-Ku70/Ku80 способен связываться с ДНК с константами диссоциации 0.9 ± 0.3 нМ (для 21-звенного лиганда) и 0.5 ± 0.2 нМ (для 40-звенного). Наблюдаемая нами ДНК-связывающая способность гетеродимера Ку соответствует описанной в литературе [46]. Отметим, что при взаимодействии Ку с 40-звенным дуплексом при высоких концентрациях белка мы

наблюдали появление второго, более тяжелого комплекса, соответствующего двум молекулам белка, связанным с одной ДНК, как это было описано ранее [46,140,146]. Таким образом, нами бы получен функционально-активный гетеродимер 6xHis-Ku70/Ku80, обладающий ДНК-связывающей способностью, сравнимой с описанной в литературе.

4.3.3. Характеристика взаимодействия гетеродимера Ku со шпилечными РНК *in vitro*

Методом торможения в геле мы изучили РНК-связывающие свойства рекомбинантного гетеродимера Ku с использованием набора синтетических ^{32}P -меченных РНК, обладающих разными структурами (Таблица 4), и установили, что препарат полученного белка Ku не взаимодействует с двуцепочечным РНК-дуплексом (дцРНК) (Рисунок 25. А).

Учитывая, что ранее было описано связывание эндогенного Ku в лизатах клеток с синтетической TAR РНК ВИЧ-1 [137], мы в первую очередь проанализировали связывание рекомбинантного Ku с TAR РНК и обнаружили, что инкубация белка с РНК приводила к появлению новой полосы с пониженной электрофоретической подвижностью (Рисунок 25. А). Для проверки природы комплекса, связывание проводили в присутствии антител анти-Ku80, анти-Ku70 и анти-His, в качестве отрицательного контроля использовались антитела к актину. Во всех случаях, кроме антител на актин, наблюдалось появление новой полосы с еще большей массой, что подтверждает, что комплекс РНК-белок содержит именно Ku70 и Ku80 (Рисунок 25. Б). Таким образом, мы подтвердили, что рекомбинантный белок Ku образует стабильный комплекс с TAR РНК (Таблица 4). При этом, как и в случае с ДНК, при высоких концентрациях мы наблюдали появление второго, более тяжелого комплекса, соответствующего, очевидно, двум молекулам белка, связавшимся с РНК.

Ранее было показано, что индивидуальная субъединица Ku70 может взаимодействовать с hr1-РНК, но только в отсутствии ионов Mg^{2+} [141]. В полученном нами препарате гетеродимера наблюдается избыток Ku70 над Ku80, поэтому, чтобы убедиться в том, что наблюдаемый нами РНК-белковый комплекс является комплексом гетеродимера с РНК, а не Ku70 с РНК, мы провели связывание в присутствии и в отсутствии ионов Mg^{2+} . Полученные в обоих случаях константы диссоциации комплекса Ku с hr1RNA оказались одинаковы, что подтверждает, что РНК связывается именно с гетеродимером, а не с Ku70. Дальнейшие эксперименты проводили в отсутствии катионов Mg^{2+} , чтобы минимизировать деградацию РНК.

Таблица 4. 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'-уагуагуиууггсааааусг-5'	--	--
дцРНК-петля	5'-гуиугуцисс усуасгсгус-3' 3'-саасасгagg агаугсгсг-5' a _{cc} u	--	--
TAR	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c u ^g 3'-gaucaauc ggucu cuscg ^a g ^g	54 ± 6	3,2 ± 0,3
TAR-M1	5'-cugguuag ^a ccagagagc ^c u ^g 3'-gaucaauc ggucuscuscg ^a g ^g	145 ± 17	5,1 ± 0,5
TAR-M2	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c ca ^a 3'-gaucaauc ggucu cuscg ^a aa ^a	85 ± 16	2,5 ± 0,2
hp1-РНК	5'-gg cgucc ^c uc ccga ^a gc ^u g ^c 3'-cc _a gcagg ac _a ggcu cg _c g _c agc ^u	45 ± 10	1,9 ± 0,2
hp2-РНК	5'-guccccc ^a ccacc ^c uc ^g ag ^a 3'-cagggag _c gggu ^g gg _a cc ^c cu ^a	125 ± 20	2,9 ± 0,3
let7a	5'-cg _a uc ^c uccgacauguca ^a uag ^{ag} g ^g 3'-gg _u ag _u aggguuguauagu ^u ca ^a uc ^{aa} g ^g g _a au ^u	70 ± 7	2,3 ± 0,2
mir-504	5'-gagacccug ^g ucugcacucu ^a uc ^u gua ^u u ^u 3'-cuuugggac _g ggacgugagg _{ga} ag ^u cau ^u c ^c	115 ± 11	2,9 ± 0,2

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

Мы изучили взаимодействие Ku с несколькими шпильками РНК разной структуры (Рисунок 25.В Таблица 4). Ранее было установлено, что дрожжевой Ku предпочтительно взаимодействует со шпильками, обладающими UG или UA выпетливанием около терминальной петли, причем последовательность самой петли не важна для связывания [150]. 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. В работе [137] было показано, что такая замена снижает аффинность Ku, выделенного из лизатов клеток линии HeLa, к TAR РНК. Рекомбинантный Ku также 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 (Таблица 4) 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. МикроРНК hsa-let-7a-2 (let7a) хотя и имеет выпетливание, однако связывание с ней не такое эффективное, как с TAR и hr1RNA. Возможно, выпетливание в let7a РНК слишком большое и затрудняет ее связывание с Ku.

При исследовании взаимодействий Ku с теломеразной РНК человека [138] или с 5'-нетранслируемой областью мРНК TP53 [139] было обнаружено, что эндогенный Ku из клеток HeLa эффективно связывает эти РНК, имеющие структуру шпильки с выпетливанием. Шпилька мРНК TP53 содержала два выпетливания: первое из двух нуклеотидов непосредственно возле терминальной петли шпильки, а второе представляло собой большую выпуклость, состоящую из 8 нуклеотидов и располагавшуюся ниже по стволу шпильки. Важно отметить, что только делеция первого выпетливания приводила к разрушению комплекса Ku-РНК. С целью проверить, достаточно ли для взаимодействия с Ku наличия только одного выпетливания в РНК-дуплексе, мы провели связывание Ku с дцРНК, не образующей шпильку (дцРНК-петля) (Таблица 4, Рисунок 25.А.). Оказалось, что Ku формирует с ней комплекс только при самых высоких концентрациях, определить константу диссоциации в этих условиях было невозможно. Таким образом, неспаренный участок в РНК дуплексе хоть и улучшает его взаимодействие с Ku по сравнению с совершенным РНК дуплексом, но для прочного связывания его недостаточно. Это позволяет сделать вывод, что мотив структуры РНК, необходимый для эффективного связывания Ku, представляет собой шпильку с выпетливанием, расположенным рядом с ее

терминальной петлей. Примечательно, что в целом наши и литературные данные демонстрируют важность структуры РНК для ее распознавания белком Ку человека, и это согласуется с наблюдениями, сделанными для белка Ку дрожжей [150]. Характер связывания белка Ку человека и дрожжей отличается, однако, тем, что для дрожжевого белка не важна последовательность петли, а Ку человека лучше связывает РНК-шпильки с G-богатой последовательностью петли.

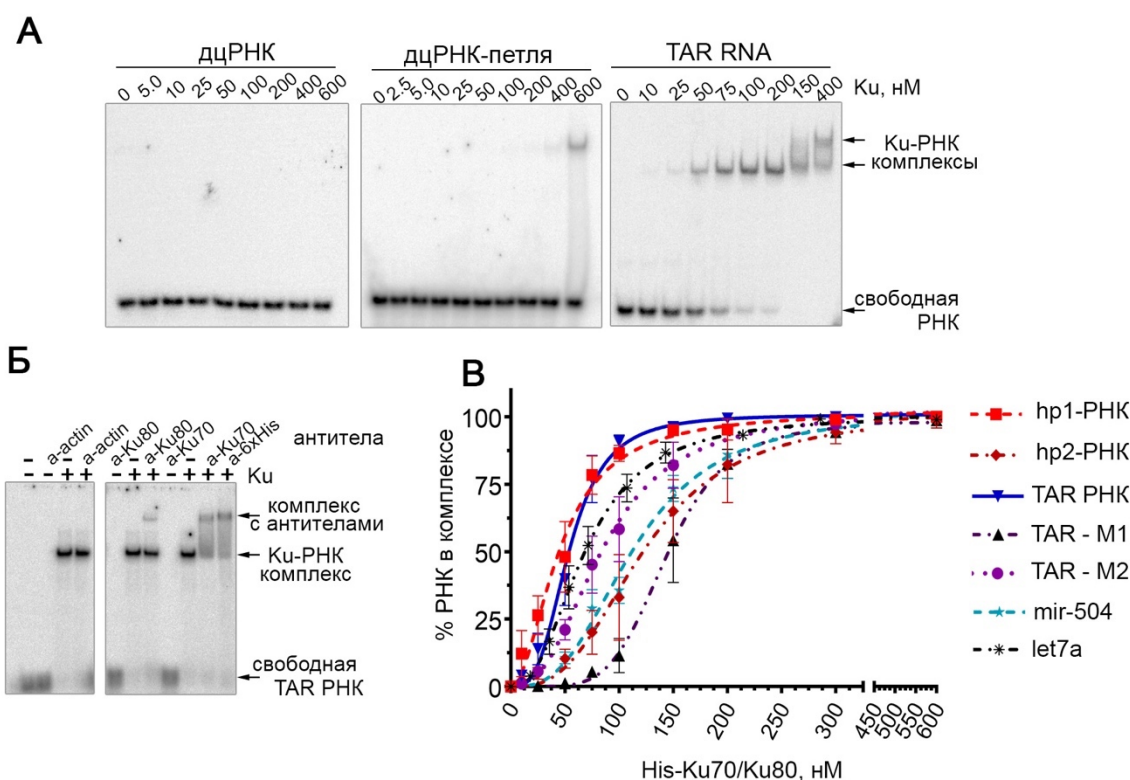


Рисунок 25. Исследование взаимодействия выделенного препарата белка His6-Ku-70/Ku80 с 32 P-мечеными РНК-лигандами. (А). Анализ связывания 0.1 нМ двуцепочечной РНК (дцРНК), двуцепочечной РНК, содержащей выпетливание (дцРНК-петля) и TAR РНК с белком 6xHis-Ku70/Ku80 (концентрация белка указана над дорожками) электрофорезом в 5% ПААГ в неденатурирующих условиях. (Б). Анализ образования РНК-белкового комплекса между TAR РНК и гетеродимером Ку в присутствии антител к актину (отрицательный контроль), к Ku80, к Ku70 и к 6xHis методом торможения в геле. (В). Кривые связывания возрастающей концентрации Ку с 0.1 нМ РНК-лигандами, рассчитанные на основании гелей. Точки соответствуют среднему значению как минимум трех независимых экспериментов $\pm$ стандартное отклонение.

Сайт связывания Ку с ДНК известен. Рентгеноструктурный анализ показал, что Ku70 и Ku80 образуют ассиметричное кольцо с широким основанием и тонким мостиком (Рисунок 7). В образуемый гетеродимером канал помещается дцДНК. Этот канал состоит преимущественно из положительно заряженных аминокислот, взаимодействующих с отрицательно заряженным сахарно-фосфатным остовом молекулы ДНК [44]. Это позволяет

Ku связываться с ДНК независимо от ее последовательности таким образом, что гетеродимер Ku нанизан на нить ДНК.

На дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* было показано, что мутации в Ku, нарушающие его взаимодействие с ДНК, приводят также к потере его связывания и с теломеразной РНК [151]. Этот факт указывает на общий сайт связывания ДНК и РНК в структуре дрожжевого Ku. С целью проверить, что дцДНК и РНК-шпильки связываются в одном сайте у белка Ku человека, мы провели анализ связывания 6хHis-Ku-70/Ku80 с ³²P-меченной hr1-РНК в присутствии возрастающей концентрации 40-звенного ДНК-дуплекса. В другом эксперименте hr1-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 (Рисунок 26).

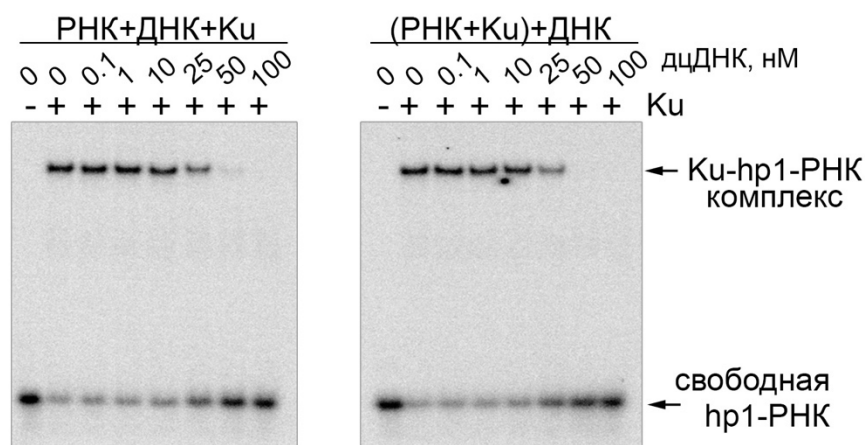


Рисунок 26. Взаимодействие 0.1 нМ ³²P-меченной hr1-РНК с 6хHis-Ku-70/Ku80 в присутствии возрастающей концентрации немеченого ДНК-дуплекса (левый гель) и вытеснение ³²P-меченной hr1-РНК из комплекса с Ku возрастающей концентрацией ДНК-дуплекса (правый гель). Электрофорез в 5% ПААГ в неденатурирующих условиях.

Взаимодействие Ku с теломеразной РНК и функциональная значимость этого взаимодействия является довольно популярной темой для изучения, и в период выполнения диссертационной работы была опубликована статья со структурой комплекса Ku *S. cerevisiae* с участком дрожжевой теломеразной РНК [152]. Рентгеноструктурный анализ комплекса показал, что РНК действительно связывается в ДНК-связывающем канале Ku, что согласуется с нашими экспериментальными данными.

Несмотря на то, что первичные структуры hKu70/hKu80 (гетеродимер *H. sapiens*) и yKu70/yKu80 (гетеродимер *S. cerevisiae*) мало-консервативны (проведенное нами с помощью программы Blast выравнивание аминокислотных последовательностей

показывает % идентичности при глобальном выравнивании hKu70 и yKu70 всего 21%, а для hKu80 и yKu80 получаются только локальные выравнивания центральных доменов с идентичностью 30%), пространственная структура гетеродимеров схожа (Рисунок 27 А). Согласно данным работы [152], РНК лежит на месте ДНК, однако немного иначе (Рисунок 27 Б – здесь и далее рисунки подготовлены с помощью программы ChimeraX или PyMol для иллюстрации описанных в работе [152] заключений). При связывании с ДНК Ku70 располагается ближе к разрыву (началу) ДНК, Ku80 - дальше от него (ДНК, проходя через полость центральных доменов, сначала проходит через Ku70, потом Ku80). РНК же располагается в этой полости терминальной петлей ближе к Ku70, а концом стебля шпильки ближе к Ku80. Вероятно, гетеродимер «наползает» на шпильку РНК через ее терминальную петлю. Также в отличие от ДНК, которая лежит по центру канала перпендикулярно его основанию, РНК оказалась изогнутой в этом канале и смещенной своим стеблем ближе к Ku80 (вправо).

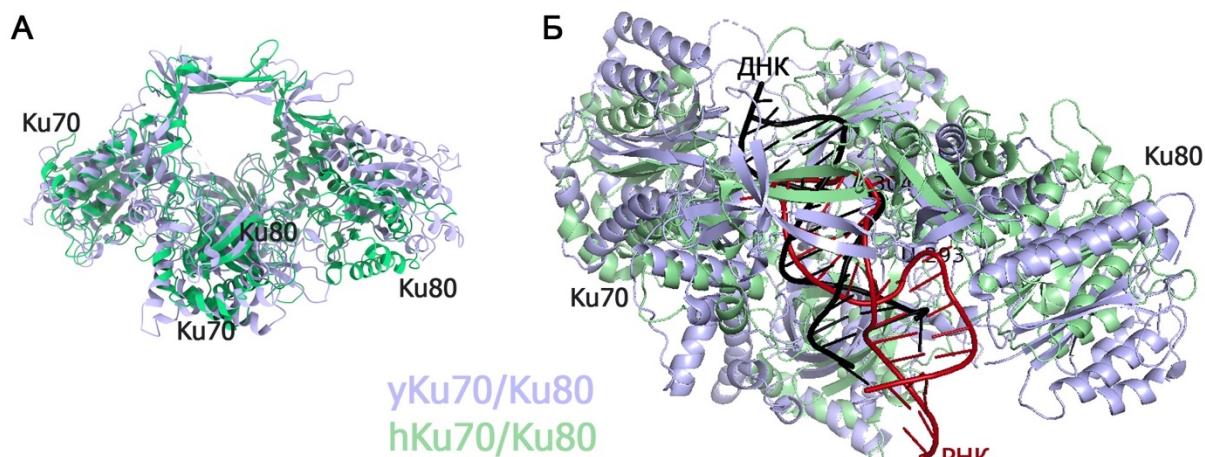


Рисунок 27. Сравнение структур комплексов Ku с РНК и Ku с ДНК. (А). Суперпозиция структур гетеродимера Ku человека (hKu - зеленая) и Ku дрожжей (фиолетовая yKu). **(Б).** Суперпозиция комплексов гетеродимера Ku человека с ДНК (черная) и Ku дрожжей с РНК (красная). Структуры PDB-ID 1jeu (hKu-ДНК) и 5y58 (yKu-РНК), суперпозиция и подготовка изображения выполнены в ChimeraX.

Структура участка теломеразной РНК, с которой взаимодействует дрожжевой Ku также представляет собой шпильку с выпетливанием вблизи терминальной петли (Рисунок 28 А), однако при рентгеноструктурном анализе комплекса yKu/РНК оказалось, что связывание с Ku инициирует такое конформационное изменение в РНК, что A292 в выпетливании разворачивается внутрь стебля и образует стэкинг-взаимодействие с парой A294:U308 и водородные связи с парой U291:G309 (Рисунок 28 Б). Это приводит к изгибу РНК в месте выпетливания, так что получается угол в $\sim 110^\circ$ между терминальной петлей и

окончанием шпильки. Авторы [152] отмечают, что эта конформация РНК фиксируется водородными взаимодействиями сахаро-фосфатного остова стебля РНК до выпетливания с аминокислотами vWA домена Ku80 и важна для эффективного связывания Ku с РНК, поэтому делеция выпетливания, а также изменения в стебле около него приводят к значительному снижению аффинности Ku к РНК. Авторы работы отмечают, что U293 в выпетливании погружается в карман, образованный остатками N-концевого домена Ku80 и C-концевого домена Ku70 у начала арки, формирующей канал для связывания нуклеиновых кислот. Но при этом никаких сиквенс-специфичных контактов между белком и U293 не образуется, поэтому на месте U293 может быть любой нуклеотид.

Важным для сохранения положения РНК в Ku оказался нуклеотид A304 терминальной петли, который входит в карман на N-конце Ku70 у основания арки в гетеродимере Ku (Рисунок 28 В). Он также, как и U293, взаимодействует с белком только своим сахаро-фосфатным остовом, и на его месте также может быть любой нуклеотид. Таким образом, остатки A304 и U293 располагаются в карманах у основания арки, но с разных сторон от нее, как бы обхватывая ее, это фиксирует положение РНК внутри канала, поэтому важно, чтобы расстояние между ними (а значит и между терминальной петлей и выпетливанием) было около 4 нуклеотидов. Терминальная петля шпильки сжимается и помещается в канавку между центральным и C/N-концевыми доменами Ku70. При этом нуклеотиды петли G299, U301, U302 обращены внутрь петли шпильки и образуют стекинг-взаимодействие между собой, тем самым сжимая терминальную петлю.

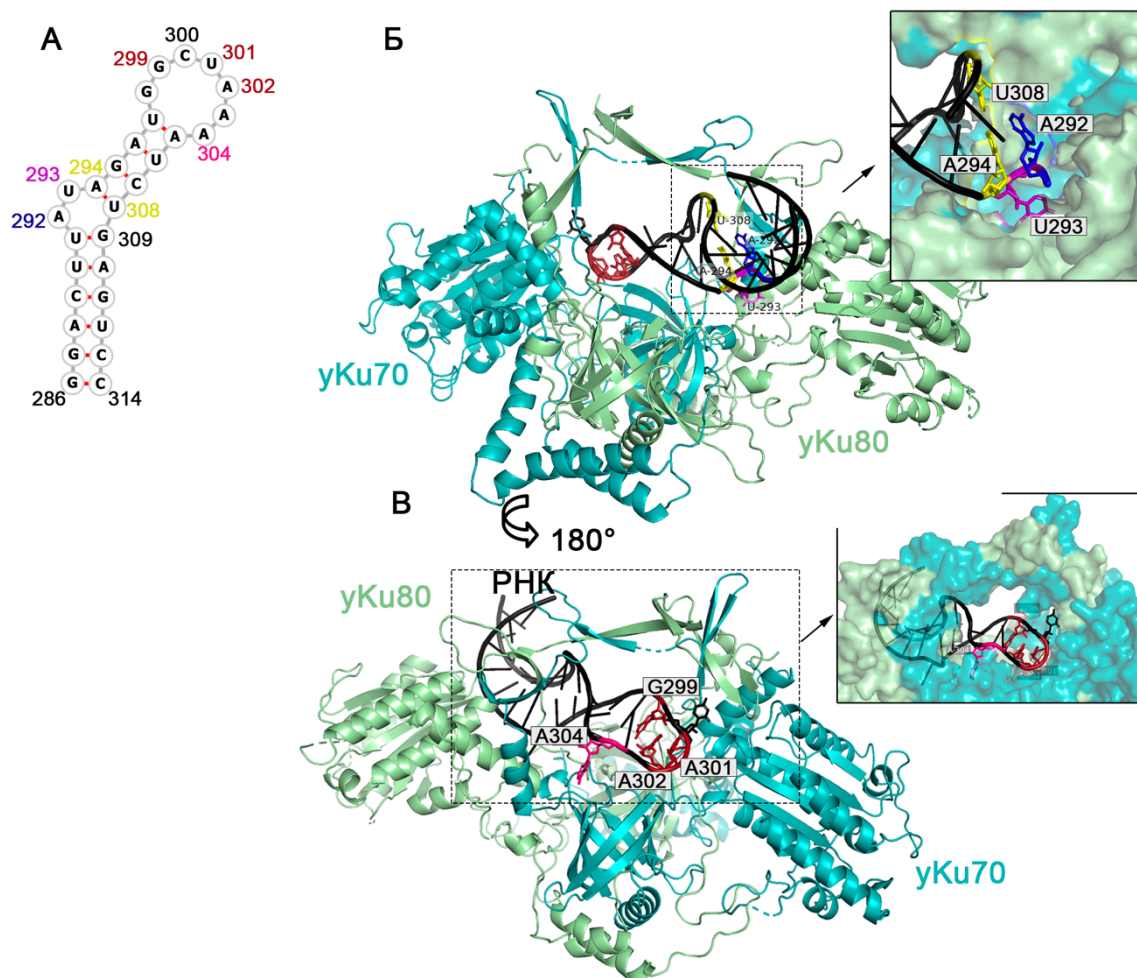


Рисунок 28. Структура комплекса дрожжевого гетеродимера Ku с участком теломеразной РНК. (А). Предполагаемая вторичная структура участка теломеразной РНК, взаимодействующей с Ku. Номера нуклеотидов выделены цветом в соответствии с цветом нуклеотидов на рисунках Б и В. **(Б).** Положение нуклеотидов выпетливания и конца стебля РНК при связывании РНК с Ku. **(В).** Положение терминальной петли шпильки. Поворот структуры Ku с рисунка Б вдоль вертикальной оси на 180°. Структура PDB-ID 5y58, изображения подготовлены с помощью программы PyMol.

Таким образом, согласно рентгеноструктурному анализу, взаимодействие дрожжевого Ku с РНК определяется в первую очередь пространственной структурой РНК: наличие шпильки с выпетливанием вблизи от терминальной петли, что совпадает с нашими результатами, полученными и для Ku человека. Строгой сиквенс-специфичности для этого взаимодействия обнаружено не было, однако авторы отмечают, что последовательность РНК должна способствовать формированию изгиба спирали в месте выпетливания, а для этого - возможности одного из нуклеотидов выпетливания разворачиваться внутрь стебля РНК и формировать стэкинг-взаимодействия или водородные связи с соседними парами оснований. Также, несмотря на то, что в работе [152] определенной сиквенс-специфичности в терминальной петле не выявлено, однако отмечается ее способность быть компактной. Интересно, что согласно нашим данным, для белка Ku человека наблюдается снижение

аффинности к шпильке РНК при замене последовательности в терминальной петле CUGGGA -> CCAAAA. Возможно, наличие остатков гуанина способствует правильному расположению петли в структуре Ku человека.

В базе проекта ENCODE есть данные eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) экспериментов для белка Ku70 на клеточных линиях HepG2 (эксперимент ENCSR571ROL) и K562 (эксперимент ENCSR258QKO) (по 2 биологических повтора). eCLIP анализ позволяет получить последовательности РНК, которые были со-осаждены с белком при иммунопреципитации. Поскольку в клетке Ku70 находится в прочном комплексе с Ku80, то преципитация за Ku70 позволяет определить РНК, взаимодействующие и с гетеродимером Ku в целом. Мы решили рассмотреть, какие структурные мотивы РНК связываются с Ku в клетке. Для этого мы получили данные из базы уже в обработанном виде: они представляли собой позиции сайтов связывания белка с РНК, картированные на геноме человека, значения интенсивности пиков и их p-value. Интенсивность пиков подсчитывалась как покрытие уникальными прочтениями сайта связывания в библиотеке eCLIP, нормализованное на покрытие этого сайта в контрольной транскриптомной библиотеке. P-value показывает значимость отличия покрытий участка в библиотеке, полученной после иммунопреципитации с антителами к Ku70, и в библиотеке, полученной после иммунопреципитации с IgG кролика в качестве контроля. В качестве достоверных сайтов связывания РНК с Ku70 мы отобрали только те из них, которые присутствовали в обоих биологических повторах и у которых средняя интенсивность пика в обоих повторах была не ниже 6.3 и p-value не более 0.01. При этом для рассмотрения структурных особенностей этих РНК мы отобрали только структуры длиннее 10 нуклеотидов. Таким образом, были отобраны 25 последовательностей, находящиеся в 15 генах, взаимодействующие с Ku70 хотя бы в одной из клеточных линий HepG2 или K562 (Таблица 5).

Таблица 5. Идентифицированные в eCLIP анализе участки РНК, взаимодействующие с Ku70

№	Ensemble gene id	Аннотация	Обогащен ие пика в eCLIP	Последовательность
1	ENSG00000012061	ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit	6,31	uucsaaccugugagcugucuaag cgacagagugguuc
2	ENSG000000114867	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma1	6,32	uuguuucuuugcccccuuugua aagggcuggagacaggaacua gacucaaguuaa
3	ENSG000000198925	Autophagy related 9A	6,35	gauggaggccaccgcu

4	NA	NA	6,35	guucgugccacugcacuuuag ccugggugagagagcgagauc cugucu
5	ENSG00000164329	Terminal nucleotidyltransferase 2	6,35	gguucacuacagccuugaccu ccuggacu
6	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	6,37	ccuucguccugggaaacgggg cgcggcuggaaaggcgccgc ccccugccccgucacgcaccg
7	ENSG00000100030	Mitogen-activated protein kinase 1	6,41	ugucuaucaguugauggagcu uugguuuguuuccaccuuuug auauuuau
8	ENSG00000075651	phospholipase D1	6,43	ggucuugcuaugucacccagg cuaguucagacuucuggguu caagugguccuccuaccuugg
9	ENSG00000176444	CDC like kinase 2	6,46	ucuguuguccacucccagcuc ucacggccccuggguuaaagg ugguggga
10	ENSG00000142798	Heparan sulfate proteoglycan 2	6,48	ucacugaguaacugugugacc uggggcacgcuaguuaaccuc ucugaggccagccccacgugg gucaagg
11	ENSG00000186716	BCR activator of RhoGEF and GTPase	6,52	gcucuauuucugcaaggagcu ggugguugcugcucgccaagg ggauacucagac
12	ENSG00000186716	BCR activator of RhoGEF and GTPase	6,58	auuucugcaaggagcuggugg uugcugcucgccaaggggga cucagacagcca
13	ENSG00000104164	Biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 6	6,61	ccuggggccgucgucuccggac ggggcccugacacggccaccc uacugccuggaggc
14	ENSG00000099910	Kelch like family member 22	6,70	gacacacugcuacgauccagg cagcaacacuuggcacacacu ggcugauggggccugugcggcg cgccuggcacggcauggcaac ccuccu
15	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	6,79	gggcgcgugccccgcgcgcg ccgggac
16	ENSG00000012061	ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit	6,90	uucaaaccugua
17	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	6,94	gguuaguuuuac
18	ENSG00000149090	Peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1	7,14	cuaguggcuaagacuauagcc ugugggccuaagcugcccggg uucaaaccuggcucugcccc ucacuaac
19	ENSG00000265185	small nucleolar RNA, C/D box 3B-1	7,17	guucuucucuccguauugggg agugagagggagagaacgcgg ucugagugguuuuu
20	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	7,61	agaccgucgugagacagguua guuuuacccuacugaugaugu

21	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	7,87	uauucccaugacccgcccgggc agcuuccgggaaaccaaguc uuuggguuccgggggggagua
22	ENSG00000278996	FP671120.1 lincRNA	8,00	cacguucguggggaaccug
23	ENSG00000265185	small nucleolar RNA, C/D box 3B-1	8,46	ccguauuggggagugagaggg agagaacgcgucugaguggu uuuuccuucu
24	ENSG00000280441	FP236383.1 lincRNA	10,60	cuucgucscugggaaacggggc gcggccgg
25	ENSG00000280441	FP236383.1 lincRNA	10,80	agaggcgggcgccccucgsc cgucacgcaccgc

Для всех отобранных последовательностей с помощью сервиса RNAstructure была предсказана вторичная структура (Рисунок 29). Все РНК имели хотя бы одну шпильку, кроме №3, 16 и 17 – эти участки небольшой длины были линейными. Стоит отметить, что, хотя предсказанные структуры сильно отличались друг от друга, все же большая часть (20 из 22) имела выпетливание вблизи терминальной петли. В среднем, длина стебля между терминальной петлей и выпетливанием составляла 4 нуклеотида (среднее 3.7, стандартное отклонение 1.6; медиана 3.5). При изучения РНК-связывающих свойств рекомбинантного гетеродимера нами было показано, что замена UGGG->CAAA в TAR РНК приводила к снижению аффинности, G-богатыми оказались также терминальные петли у hp1-РНК и let7a-РНК, которые тоже хорошо связывались с Ки. Мы отметили, что примерно у половины из полученных структур РНК терминальная петля также имела G-богатую последовательность, в частности GpG динуклеотид (10 структур из 22). Таким образом, структура РНК определяет аффинность связывания Ки с РНК: предпочтительной для связывания вторичной структурой является шпилька с небольшим выпетливанием около терминальной петли, обладающей G-богатой последовательностью; а сайт связывания РНК в Ки с совпадает с сайтом для ДНК.

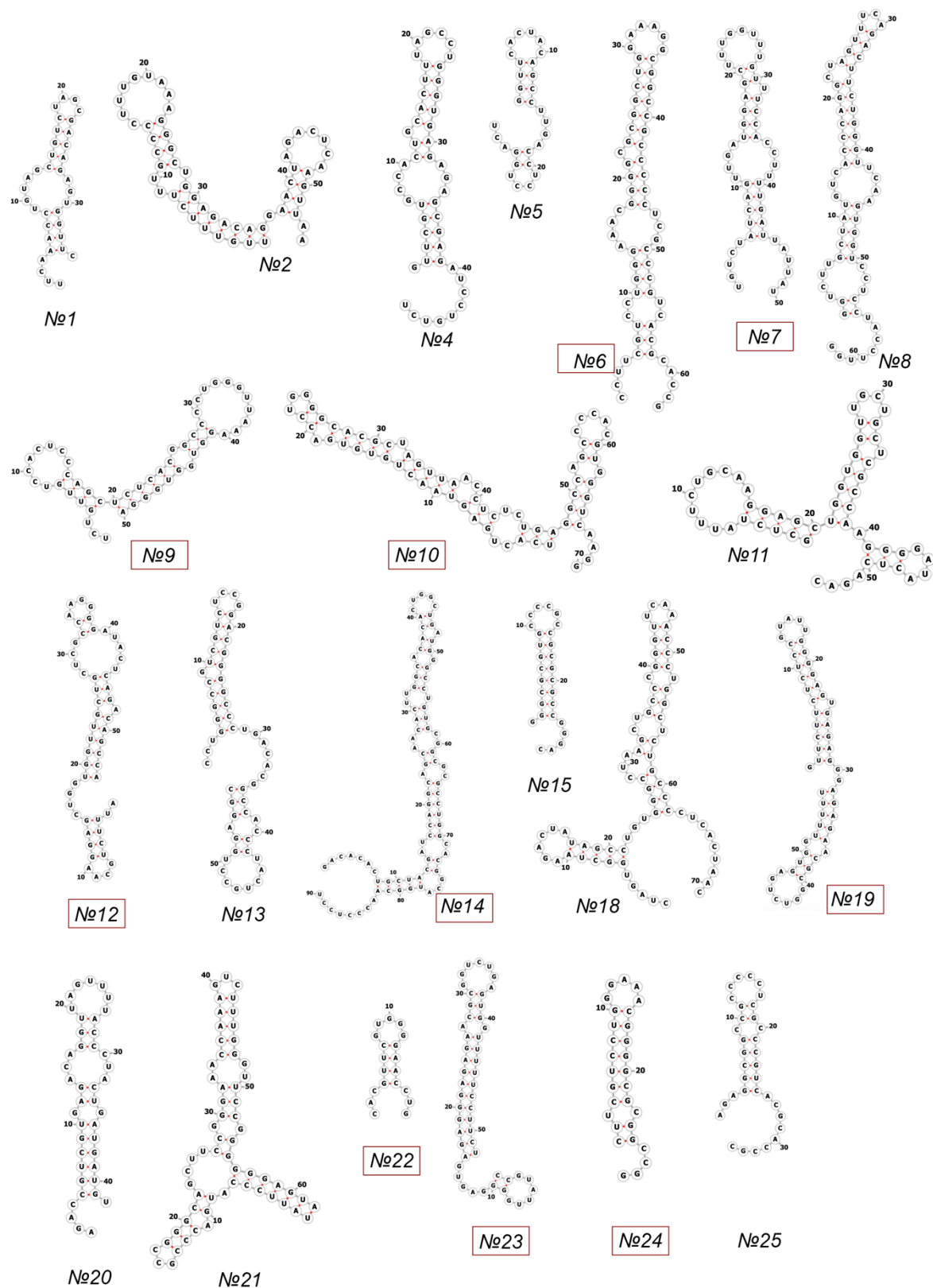


Рисунок 29. Предсказанные структуры РНК, взаимодействующих с Ku70 в клетках. Приведены структуры РНК из таблицы 4, кроме последовательностей № 3, 16 и 17. Номера структур на рисунке соответствуют порядковому номеру РНК в таблице 4. Красной рамкой обведены номера РНК, имеющих GrG динуклеотид в терминальной петле.

4.3.4. 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. Эти вектора трансфицировали в клетки НЕК 293Т дикого типа и с моноаллельным нокаутом субъединиц DNA-РК, чтобы проверить влияние этих замен на стимулирующее действие Ku (Рисунок 30). 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.

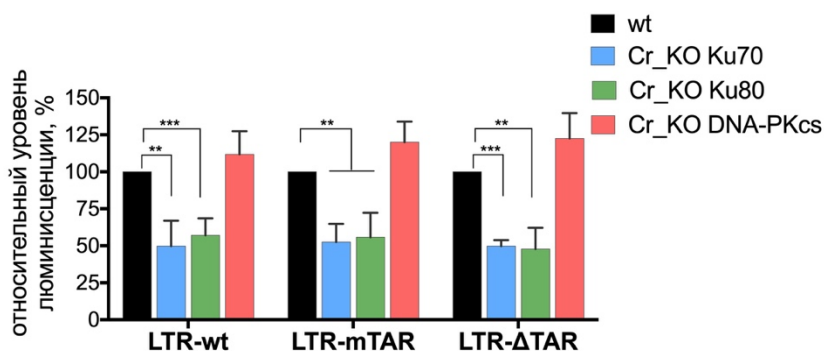


Рисунок 30. Влияние моноаллельного нокаута белков Ku70, Ku80 и DNA-PKcs в клетках НЕК 293Т на экспрессию с промоторов ВИЧ-1 дикого типа (LTR-wt), LTR с делецией региона, кодирующего выпетливание в TAR РНК (LTR-mTAR), и региона, кодирующего TAR РНК (LTR-ΔTAR). Приведено среднее минимум 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (согласно t-критерию Стьюдента).

4.3.5. Ku - новый компонент комплекса 7SK мРНК

Как было описано в обзоре литературы, TAR и 7SK РНК играют важную роль в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1. 7SK РНК является малой ядерной некодирующей РНК, участвующей в регуляции элонгации транскрипции РНК полимеразой II [25,153]. Показано, что 7SK РНК имеет в составе структурные мотивы, похожие на TAR РНК [154,155]. Надо также отметить, что при анализе данных eCLIP для Ku70, нами было установлено, что в клеточной линии HepG2 есть обогащение в 5,7 раз на участке 235-289 нуклеотидов 7SK РНК. Этот участок не вошел в список РНК, взаимодействующих с Ku,

приведенный в Таблица 5, так как при формировании этого списка уровень отсечки по обогащению был 6,3. Учитывая эти факты, мы решили проанализировать взаимодействие Ku с 7SK РНК.

С целью проверить взаимодействие Ku с 7SK РНК в клетке, мы провели РНК-иммунопреципитацию в клетках HEK 293Т. Для этого клетки трансфицировали векторами для суперэкспрессии Flag-меченных Ku70 и Ku80 pcDNA3-Ku70-3xFlag и pcDNA3-Ku80-3xFlag, соответственно. В качестве контроля клетки трансфицировались пустым вектором pcDNA3.1. После преципитации на анти-Flag агарозе РНК-белковые комплексы были элюированы, и эта фракция разделена на две части для Вестерн-блот анализа преципитированного Ku и анализа со-осажденных РНК. Для этого РНК экстрагировалась, с нее проводили синтез кДНК и с помощью количественной ПЦР оценивали уровень со-осажденной РНК. ПЦР анализ проводили на 7SK РНК и U6 РНК, использованную в качестве контроля. U6 РНК — это малая ядерная некодирующая РНК, которая также содержит шпильки, однако в них нет выпетливания. Обогащение 7SK и U6 РНК рассчитывалось как отношение уровня этих РНК, со-осажденных с Ku70-Flag/Ku80-Flag, к уровню этих РНК, связавшихся неспецифично с анти-Flag смолой при преципитации из клеток, трансфицированных пустым вектором (Рисунок 31.А-Б). Оказалось, что при суперэкспрессии Flag-меченного Ku на анти-Flag смоле наблюдается 2-3-кратное обогащение эндогенной 7SK РНК, но не U6 РНК. Таким образом, мы впервые показали, что белок Ku способен связывать эндогенную РНК 7SK, будучи суперэкспрессированным в клетках HEK 293Т.

С целью подтвердить, что Ku способен связывать 7SK РНК напрямую, а не опосредованно за счет взаимодействия с белками комплекса 7SK РНК, мы изучили связывание рекомбинантного препарата белка Ku и ^{32}P -меченной полноразмерной 7SK РНК (refSeq NR_001445.2), полученной T7-транскрипцией *in vitro*. Образование комплекса детектировали методом изменения подвижности РНК в нативном геле (Рисунок 31.В). 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 (Рисунок 31.Д). 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 (Рисунок 31.Г). Это указывает на преимущественное связывание

гетеродимера с этим регионом 7SK РНК. Также заметна небольшая защита остатков гуанина, расположенных, очевидно, в шпильке 3. Интересно, что по результатам eCLIP эксперимента на клеточной линии HepG2, видно обогащение участка 7SK РНК в районе 235-285 нуклеотидов, которые формируют часть шпильки 3, включая участок терминальной петли, содержащий GpG последовательность, и часть линкера между шпильками 3 и 4. Как видно на рисунке 31.В, Ku образует несколько комплексов с 7SK РНК, причем при использованной при футпринтиге концентрации Ku (100 нМ) наблюдается одна мажорная полоса, соответствующая доминирующему комплексу, и несколько менее четких полос. Возможно, в этих комплексах Ku взаимодействует как раз не только со шпилькой 1, но и со шпилькой 3.

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 белки HEXIM1 и Cdk9. Как описано в обзоре литературы (раздел 2.1.2), эти белки являются важными участниками регуляции транскрипции ВИЧ-1. Cdk9 является каталитической субъединицей фактора транскрипции Р-TEFb, фосфорилирующей С-концевой домен РНКП II, что приводит к снятию элонгационного блока и переходу в стадию активной транскрипции [22,23]. HEXIM1 в составе 7SK мяРНП комплекса ингибирует Cdk9 и является негативным регулятором транскрипции ВИЧ-1 [24,25].

Мы проводили иммунопреципитацию эндогенных белков HEXIM1 и Cdk9 из клеток НЕК 293Т с использованием специфических анти-HEXIM1 или анти-Cdk9 антител на магнитных частицах, покрытых белком G (Dynabeads™ Protein G). Среди со-осажденных 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 антитела против Ku80 (Рисунок 32. А).

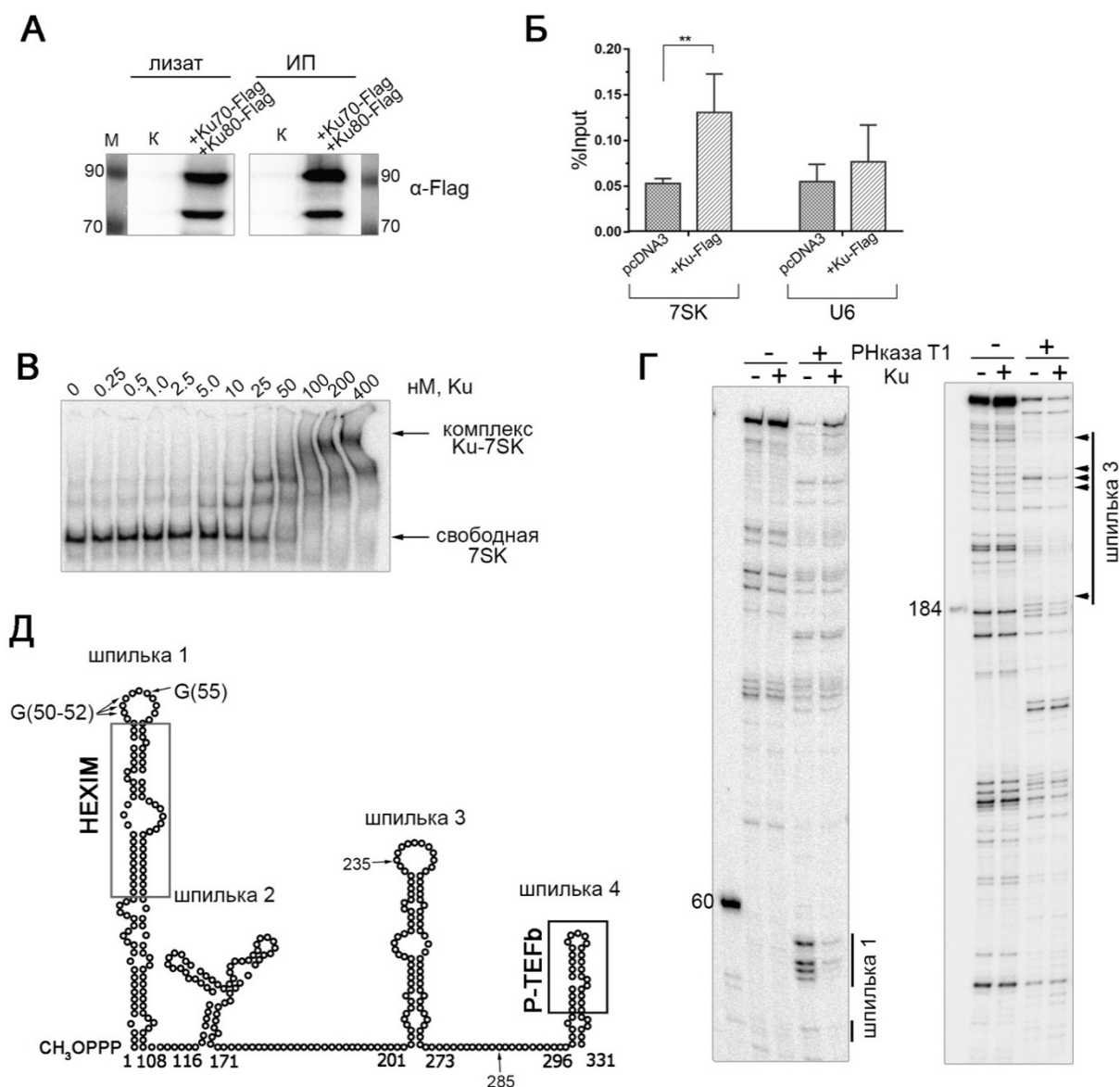


Рисунок 31. Взаимодействие Ku с 7SK РНК. (А-Б). РНК-иммунопреципитация Ku70-Flag/Ku80-Flag на анти-Flag агарозу из клеток линии HEK 293Т, трансфицированных векторами pcDNA3-Ku70-Flag и pcDNA3-Ku80-Flag или контрольным вектором pcDNA3.1 (дорожка К). Часть иммунопреципитированной фракции анализировалась 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 трех независимых экспериментов, ** - $p < 0,01$ (согласно t-критерию Стьюдента). (В). Анализ методом изменения подвижности в геле связывания рекомбинантного гетеродимера 6xHis-Ku70/Ku80 с 32 P-меченной 7SK РНК. 5 нМ РНК инкубировалась с возрастающими концентрациями Ku, указанными над гелем. Стрелками показаны свободная РНК и РНК-белковые комплексы. Радиоавтограф 5% нативного ПААГ. (Г). Анализ сайта связывания Ku в 7SK РНК методом футпринтинга с использованием РНКазы Т1. 5нМ 32 P-меченная 7SK РНК инкубировалась с РНКазой Т1 в присутствии и отсутствии 100 нМ гетеродимера Ku. Продукты футпринтинга были проанализированы в градиентных денатурирующих ПААГ. Радиоавтографы 10-15% геля (слева) и 6-10% (справа). В качестве контроля подвижности нанесены 60 и 184-звенные 32 P-меченные РНК. Д. Структура 4 петель 7SK РНК человека, выделены участки связывания с белками HEXIM и Р-TEFb комплекса 7SK РНП. Адаптировано из работы [156].

Совместное осаждение белков комплекса 7SK мРНК с Ku может быть опосредовано взаимодействиями между Ku и 7SK РНК. Для выяснения роли РНК в ассоциации Ku с Cdk9 мы провели иммунопреципитацию эндогенного Cdk9 в присутствии и отсутствии коктейля РНКаз (Рисунок 32. Б). Эффективность со-осаждения Ku80 с Cdk9 не менялась при обработке лизатов коктейлем РНКаз, что указывает на непосредственные белок-белковые взаимодействия между ними. Ранее в работе [157] было показано взаимодействие Ku70 в клетках линии HeLa с 55-кДа изоформой белка Cdk9, которая составляет его очень малую долю. Мы впервые продемонстрировали взаимодействие Ku с главной 42-кДа изоформой Cdk9.

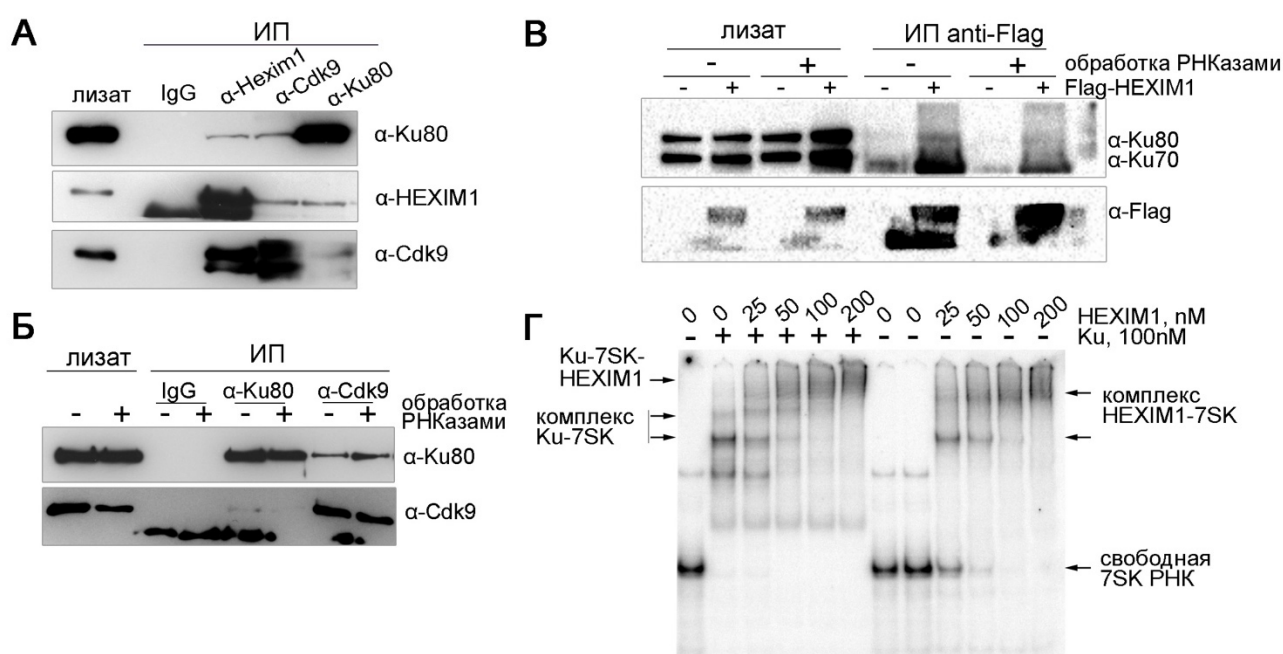


Рисунок 32. Взаимодействие Ku с белками комплекса 7SK РНП в клетках линии НЕК 293Т. (А). Иммунопреципитация эндогенных белков HEXIM1, Cdk9 и Ku80. Лизаты и фракции с иммунопреципитацией (ИП) были проанализированы Вестерн-блотом на наличие HEXIM1, Cdk9 и Ku80. В качестве отрицательного контроля использовалась иммунопреципитация с тотальным иммуноглобулином G кролика. (Б). Иммунопреципитация эндогенных Ku80 и Cdk9 в присутствии (+) и отсутствии (-) коктейля РНКаз. Лизаты и фракции с иммунопреципитацией (ИП) были проанализированы Вестерн-блотом на наличие белков Ku80 и Cdk9. В качестве отрицательного контроля использовалась иммунопреципитация с тотальным иммуноглобулином G кролика. (В). Анти-Flag иммунопреципитация из клеток НЕК 293Т, трансфицированных вектором, кодирующим HEXIM1-Flag (+), или контрольным вектором рсDNA3.1 (-). Иммунопреципитация выполнялась в присутствии (+) и отсутствии (-) коктейля РНКаз. Вестерн-блот анализ лизатов и фракцией с иммунопреципитацией (ИП) с использованием антител против Ku70 и Ku80, а также Flag-пептида. (Г). Анализ связывания рекомбинантного 100 нМ 6xHis-Ku70/Ku80 с 5нМ ³²P-меченной 7SK РНК в присутствии и отсутствии возрастающей концентрации рекомбинантного GST-HEXIM1.

В случае с HEXIM1, иммунопреципитацию Flag-меченного HEXIM1 проводили из клеток, трансфицированных либо пустым вектором pcDNA3, либо вектором pcDNA3-HEXIM1-3xFLAG, также в присутствии или отсутствии коктейля РНКаз (Рисунок 32.В). При Вестерн-блот анализе мы наблюдали эндогенный Ku80, со-осажденный с Flag-HEXIM1 в нативных условиях, в то время как обработка лизатов РНКазами снижала количество преципитированного Ku80. Кроме того, для проверки возможности прямого взаимодействия между белками Ku80 и HEXIM1, мы получили рекомбинантный препарат белка HEXIM1 с GST-тэгом. Для этого кодирующая часть гена HEXIM1 (refSeq NM_006460.3) была получена с помощью ПЦР с кДНК клеток НЕК 293Т и клонирована в вектор прокариотической экспрессии GST-содержащих белков pGEX-6p-1. Выделение и очистка GST-HEXIM1 осуществлялись стандартным методом аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе. Мы проанализировали взаимодействие рекомбинантных белков 6xHis-Ku70/Ku80 и GST-HEXIM1 с помощью GST-соосаждения, однако их связывания не обнаружили. На основании этих результатов мы сделали вывод, что соосаждение эндогенных белков HEXIM1 и Cdk9 из клеток, очевидно, происходило за счет их связывания с 7SK РНК.

Для проверки возможности образования тройного комплекса, содержащего HEXIM1, Ku и 7SK РНК, мы провели связывание рекомбинантных белков GST-HEXIM1, 6xHis-Ku70/Ku80 и ³²P-меченной полноразмерной 7SK РНК, полученной T7-транскрипцией *in vitro* (Рисунок 32.Г). В отсутствие HEXIM1 гетеродимер 6xHis-Ku70/Ku80 формировал два комплекса с полноразмерной 7SK РНК, а также комплекс с частично деградированной 7SK. При добавлении HEXIM1 на геле исчезали полосы, соответствующие комплексу полноразмерной 7SK с Ku, и появлялись более тяжелые комплексы. Отметим, что они обладали несколько меньшей электрофоретической подвижностью, чем комплекс, содержащий 7SK РНК и две молекулы HEXIM1. Таким образом, можно сделать вывод, что ассоциация Ku с белком HEXIM1 происходит через их взаимодействие с 7SK РНК.

Примечательно, что оба белка предпочтительно связываются с первой шпилькой 7SK РНК. Очевидно, HEXIM1 и Ku не мешают друг другу взаимодействовать с 7SK РНК, сайт посадки HEXIM1 находится на стебле шпильки, в то время как Ku связывается с терминальной петлей. С другой стороны, было показано, что *in vitro* HEXIM1 также может взаимодействовать с третьей шпилькой 7SK РНК [158], и, возможно, в присутствии Ku мы детектируем как раз такой троичный комплекс.

Таким образом, мы показали взаимодействие Ku как с 7SK РНК, так и с белками комплекса 7SK мРНК, что позволяет рассматривать Ku как новый компонент комплекса 7SK мРНК, участвующий в регуляции транскрипции клеточных генов и генов ВИЧ-1.

Интересно, что в работе, опубликованной в начале 2020 гг., было показано, что при нокауте DNA-PKcs на промоторе ВИЧ-1 снижается уровень активатора элонгации транскрипции P-TEFb (субъединицы Cdk9 и CyclinT1) [71]. В нашей репортерной системе мы не видим влияния каталитической субъединицы DNA-PKcs на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, а только положительное влияние Ku и взаимодействие Ku с белками комплекса 7SK РНК. Это позволяет предположить, что, возможно, при снижении уровня Ku в клетке, также как и в работе [71] при снижении DNA-PKcs, происходит меньшее привлечение P-TEFb или всего комплекса 7SK РНК к промотору ВИЧ-1, что могло бы объяснять негативное влияние снижения уровня Ku на транскрипцию. Учитывая, что P-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.

4.3.6. Определение стадии транскрипции, зависящей от Ku

Как было описано в разделе 2.1.2., 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 мРНК фактора P-TEFb, который активирует элонгацию транскрипции, что приводит к синтезу полноразмерного вирусного транскрипта [22,23,134,135]. Следовательно, по изменению уровня синтезированных TAR и полноразмерной мРНК можно оценить стадию, на которую влияет тот или иной фактор. С целью проверить, на какую стадию транскрипции влияет Ku, 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. Для количественной ПЦР мы использовали праймеры, комплементарные TAR региону и 3'-нетранслируемой области (3'НТО) вирусной мРНК (Рисунок 33. А). Праймеры на TAR РНК показывают, насколько эффективно иницируется транскрипция, а праймеры на 3'НТО - уровень полноразмерной синтезированной мРНК, т.е. общую эффективность транскрипции. 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.

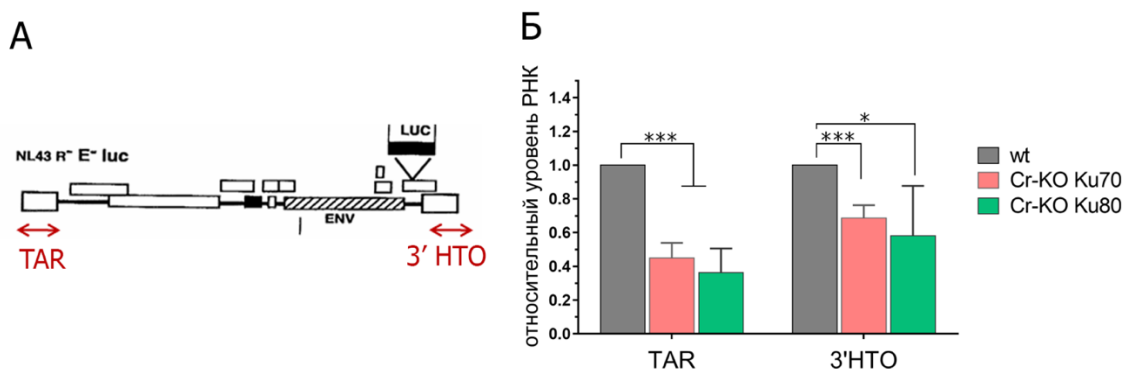


Рисунок 33. Влияние Ku на уровень разных фрагментов вирусной мРНК. (А). Схема вирусного генома в векторе pNL4-3.Luc.R-E- с указанием регионов TAR и 3'-нетранслируемой области (3'НТО), детектируемых праймерами при анализе уровня вирусной мРНК. **(Б).** Анализ уровня TAR РНК и полноразмерной вирусной РНК (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. Его фосфорилирование по Ser5 осуществляет фактор транскрипции TFIIH [159], 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. Как написано выше, при транскрипции ВИЧ-1 снятие элонгационного блока осуществляется после привлечения к промотору вирусным белком Tat фактора Р-TEFb, который и фосфорилирует Ser2 в СКД РНКП II [21–23,134,135]. По изменению количества фосфорилированных форм РНКП II можно судить об эффективности протекания той или иной стадии транскрипции. Соответственно, мы решили подтвердить, что Ku влияет в первую очередь на инициацию транскрипции, используя еще и этот подход. Для этого необходимо было провести 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 Ku, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV, с последующей детекцией со-осажденных участков ДНК методом ПЦР в реальном времени.

Однако сначала нам необходимо было проверить, 1) соосаждаются ли фосфорилированные формы РНКП II с промотором ВИЧ-1 за антитела к РНКП-II-PhSer2 и РНКП-II-PhSer5, 2) можно ли действительно различить инициаторную и элонгационную форму РНКП II на промоторе ВИЧ-1 доступными нам антителами. Для этого мы провели

иммунопреципитацию хроматина за антитела к гистону H3 (контроль прохождения иммунопреципитации хроматина) и антитела к РНКП-II-PhSer2 (элонгационная форма) и РНКП-II-PhSer5 (инициаторная форма) из фиксированных лизатов клеток линии НЕК 293Т дикого типа, трансфицированных только репортерной плазмидой pGL-LTR-HIV, или репортерной плазмидой pGL-LTR-HIV и плазмидой, кодирующей вирусный белок Tat (Рисунок 34).

Во-первых, оказалось, что экспрессия вирусного белка Tat не влияет на соосаждение гистона H3 с промотором ВИЧ-1 и геном репортера, находящегося под этим промотором (Рисунок 34 А). Во-вторых, было показано, что за антитела к фосфорилированным формам РНК полимеразы II происходит иммунопреципитация, при этом обогащение ДНК за антитела к РНКП II практически в 10 раз меньше, чем за антитела к гистону (Рисунок 34 Б). Это связано с тем, что ассоциация ДНК с гистонами более тесная, чем с другими белками, и, соответственно, ко-иммунопреципитация ДНК за антитела к РНКП II проходит менее эффективно. Тем не менее, обогащение участков ДНК за антитела к РНКП II значительно больше неспецифического соосаждения ДНК за IgG (Рисунок 34 Б). В-третьих, оказалось, что экспрессия в клетке Tat стимулирует со-осаждение ДНК за антитела к обеим формам РНК полимеразы II: ассоциация элонгационной формы РНКП II-PhSer2 с промотором LTR ВИЧ-1 в результате экспрессии Tat в среднем выросла в 7 раз, ассоциация инициаторной формы РНКП II-PhSer5 с промотором LTR - в среднем только в 2.2 раза. Таким образом, эксперименты по иммунопреципитации хроматина за антитела к фосфорилированным формам РНКП II при экспрессии вирусного активатора транскрипции Tat, показывают, что экспрессия с промотора ВИЧ-1 происходит активнее, растет количество ассоциированных с промотором обеих форм РНКП II, но в первую очередь, больше элонгационной формы, что согласуется с хорошо изученным механизмом действия белка Tat [160]. Таким образом, мы могли приступить к экспериментам по изучению влияния уровня клеточного белка Ku в клетке на ассоциацию элонгационной и инициаторной форм РНКП II с промотором ВИЧ-1 для точного определения стадии транскрипции, на которую Ku оказывает положительный эффект.

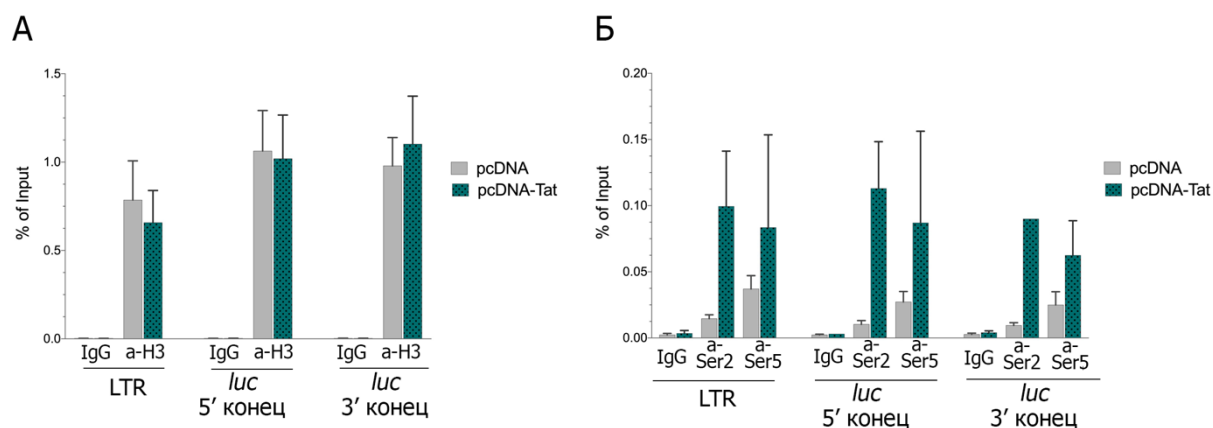


Рисунок 34. Иммунопреципитация хроматина за антитела к гистону H3 (А) и к фосфорилированным формам РНК полимеразы II (Б): фосфо-Ser2 (обозначено как Ser2) и фосфо-Ser5 (обозначено как Ser5) в клетках НЕК 293Т, трансфицированных репортером и контрольной пустой плазмидой (pcDNA) или репортером и плазмидой, кодирующей вирусный белок Tat (pcDNA-Tat). Анализ соосажденной при иммунопреципитации ДНК проводился методом количественной ПЦР с праймерами к LTR – к промотору ВИЧ-1, к началу гена люциферазы светлячка (luc 5'конец), экспрессирующемуся с промотора LTR, и к 3'концу гена люциферазы (luc 5'конец). Приведено среднее минимум 3 независимых повторов со стандартным отклонением.

Как описано выше в разделе 4.2.2, моноаллельный нокаут обеих субъединиц гетеродимера Ku (Ku70 и Ku80) в равной степени снижает уровень экспрессии с промотора ВИЧ-1. При этом при нокауте одной субъединицы Ku в клетке, уровень другой также значительно снижается (Рисунок 17), поскольку субъединицы вне гетеродимера нестабильны в клетке. В связи с этим мы изучили степень ассоциации фосфорилированных форм РНКП II с промотором только при пониженном уровне субъединицы Ku70: в клетках НЕК 293Т с моноаллельным нокаутом Ku70. Для этого клетки Cr-KO Ku70 и клетки дикого типа (wt) трансфицировались репортерным вектором pGL-LTR-HIV. В подготовленных лизатах клеток мы параллельно провели иммунопреципитацию хроматина за антитела к гистону H3 и фосфорилированным формам РНКП II (Рисунок 35).

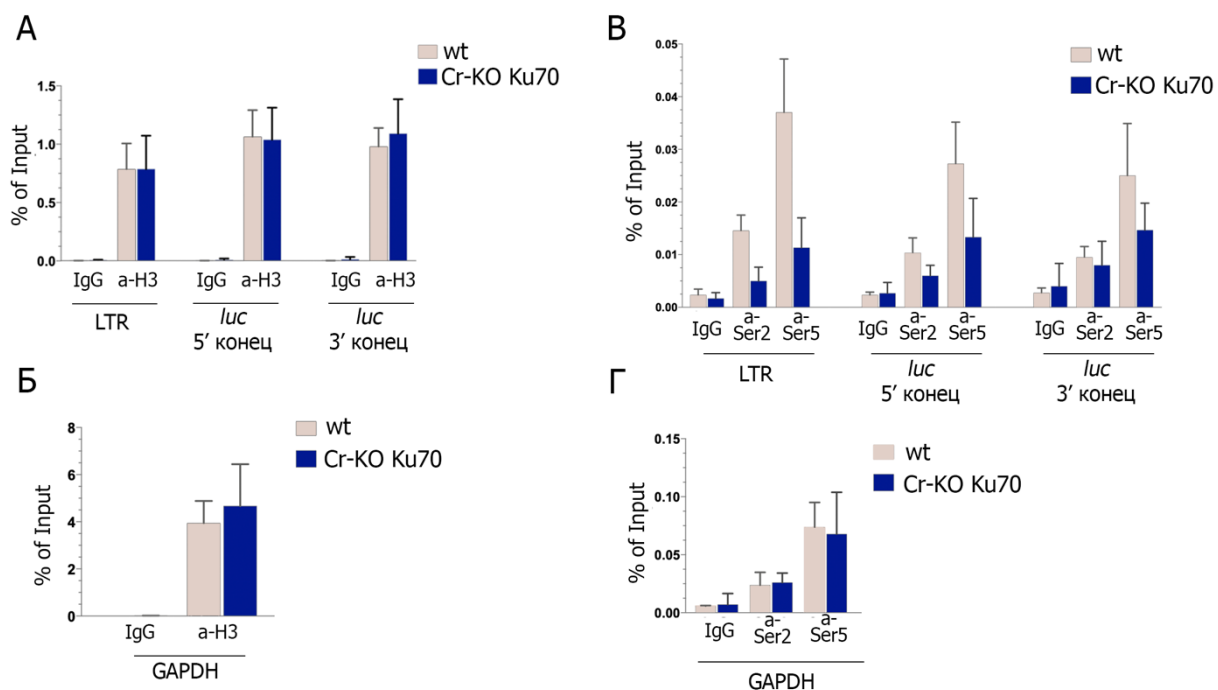


Рисунок 35. Иммунопреципитация хроматина в клетках НЕК 293Т дикого типа (wt) и с моноаллельным нокаутом Ku70 (Cr-KO Ku70). (А-Б). За антитела к гистону H3 с детекцией соосажденной ДНК количественной ПЦР с праймерами к участкам репортерного вектора (А) и к участкам геномной ДНК (гену GAPDH) (Б). **(В-Г).** 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.

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 (Рисунок 35 А, 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 (Рисунок 35 В). При этом нокаут Ku70 не влияет на ассоциацию обеих фосфорилированных форм РНКП II с геном GAPDH (Рисунок 35 Г). Таким образом, репрессия транскрипции с промотора ВИЧ-1 при снижении уровня Ku в клетке наблюдается в связи с пониженным количеством фосфорилированной РНКП II. По всей видимости, 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.

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 [161]. 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 провиресе, 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.

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

В разделе 4.3. 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 поиск такого возможного фактора в данных транскриптомного и протеомного анализа клеточных линий с пониженным уровнем субъединиц Ku. Этот раздел посвящен аналитической работе по поиску возможных посредников в эффекте Ku на транскрипцию ВИЧ-1.

4.4.1. 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, клетки с моноаллельным нокаутом Ku80, и клетки с моноаллельным нокаутом DNA-PKcs. Подготовку библиотек для секвенирования с предварительным удалением рибосомальной РНК осуществлял сотрудник нашей лаборатории Анисенко А.Н. Секвенирование библиотек, картирование прочтений на геном, а также поиск дифференциально экспрессируемых (ДЕ) генов между контролем и нокаутами генов Ku70, Ku80, DNA-PKcs проводились компанией ЗАО "Геноаналитика".

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. При таком подходе мы отсекаем те изменения экспрессии клеточных генов, которые происходят из-за снижения в клетке уровня всего комплекса DNA-PK и нарушения процесса репарации по классическому пути NHEJ, в котором DNA-PK участвует.

Мы считали дифференциально экспрессированными 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. Из них мы взяли только те, у которых изменение при нокауте DNA-PKcs было статистически незначимым ($padj > 0.05$). Таким образом, мы получили список из 249 генов, которые дифференциально экспрессировались в нокаутах Ku70, Ku80, но экспрессия которых не изменилась в нокауте по DNA-PKcs (Рисунок 36).

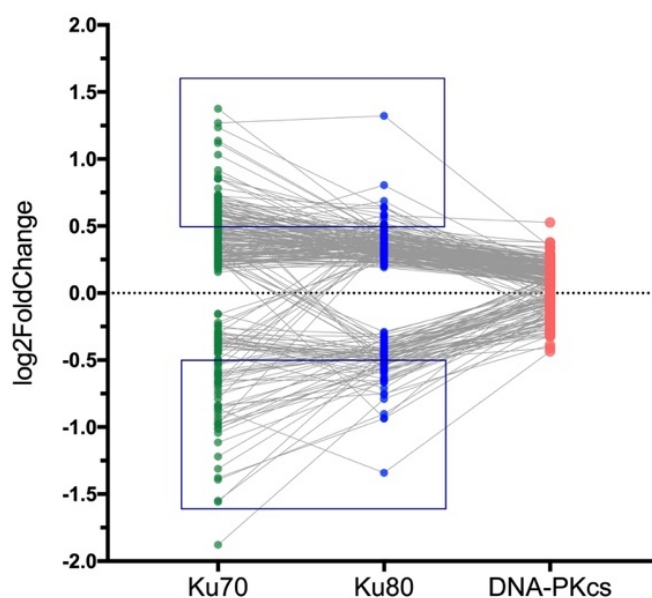


Рисунок 36. Изменение экспрессии генов в клеточных линиях НЕК 293Т с моноаллельным нокаутом Ku70, Ku80 и DNA-PKcs. Каждая точка соответствует одному гену, у которого изменение экспрессии было статистически значимо при нокауте Ku70, Ku80, но не DNA-PKcs. Линии связывают один и тот же ген в разных столбцах. В рамку заключены гены, которые были выбраны для дальнейшего анализа.

Стоит отметить, что наблюдаемые изменения в экспрессии генов были не очень большими, хотя и статистически значимыми, у половины генов логарифм изменения экспрессии $\log_2\text{FoldChange}$ был в пределах $(-0.5; 0.5)$, что соответствует изменению менее, чем в 1.4 раза (Рисунок 36). Для дальнейшего рассмотрения мы взяли только гены, изменение которых было более 1.4 раз. Таких генов оказалось 124. Поскольку в рамках этой работы мы искали изменения в экспрессии в первую очередь транскрипционных факторов, которые потом могли бы повлиять на транскрипцию ВИЧ-1, то из 124 генов мы отобрали те, которые ассоциированы с регуляцией транскрипции, т.е. те, которые имели хотя бы одну из аннотаций gene ontology (GO), указывающих на участие белка в транскрипции (Таблица 6). Таким образом, в нашей выборке осталась 21 гипотетическая ген-мишень (Таблица 7). (Полная таблица с характеристиками выбранных генов приведена в дополнительных материалах).

Поиск опубликованных работ по взаимосвязи каждого выбранного гена и ВИЧ-1 показал, что для 8 генов есть ассоциация с ВИЧ-1, при этом для 4 генов была показана их роль в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 (ATF3, TRIM56, CEBPG и JunD). Данные показывают, что ATF3, CEBPG и JunD могут являться положительными регуляторами транскрипции ВИЧ-1, в то время как для TRIM56 данные противоречивы: он может быть как положительным, так и отрицательным регулятором. Из положительных регуляторов транскрипции в наших клетках с нокаутом по Ку снизилась экспрессия ATF3 (почти в 2 раза в клетках с нокаутом Ку70) и CEBPG (почти в 1,5 раза в клетках с нокаутом Ку70), это позволило нам предположить, что негативный эффект нокаута Ку на промотор ВИЧ-1 мог быть вызван снижением уровня ATF3 и/или CEBPG. Также интересным является ген гистон-метилтрансферазы SETD1A, уровень мРНК которой, с одной стороны, в полтора раза повышен в клетках с нокаутом Ку, с другой стороны, эта метилтрансфераза участвует в три-метилировании гистона H3 по остатку K4 на промоторе ВИЧ-1. А метка H3K4me3 ассоциирована с репрессированным состоянием промотора ВИЧ-1 [162].

Таким образом, в результате проведенного исследования изменения транскриптома в ответ на снижение уровня Ку в клетке, гены ATF3, CEBPG, TRIM56 и SETD1A могут быть предложены в качестве кандидатов, которые опосредуют влияние Ку на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

Таблица 6. Аннотации gene ontology (GO) для отбора генов, участвующих в регуляции транскрипции

идентификатор GO	название термина
GO:0000122	negative regulation of transcription by RNA polymerase II
GO:0000976	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0000976	transcription regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0000978	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific
GO:0000987	cis-regulatory region sequence-specific DNA binding
GO:0001216	DNA-binding transcription activator activity
GO:0003677	DNA binding
GO:0003682	chromatin binding
GO:0003690	double-stranded DNA binding
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity
GO:0003713	transcription coactivator activity
GO:0003714	transcription corepressor activity
GO:0006325	chromatin organization
GO:0006342	chromatin silencing
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II
GO:0006366	transcription by RNA polymerase II
GO:0006368	transcription elongation from RNA polymerase II promoter
GO:0008134	transcription factor binding
GO:0016584	nucleosome positioning
GO:0030261	chromosome condensation
GO:0031490	chromatin DNA binding
GO:0031492	nucleosomal DNA binding
GO:0031936	negative regulation of chromatin silencing
GO:0042393	histone binding
GO:0042800	histone methyltransferase activity (H3-K4 specific)
GO:0043388	positive regulation of DNA binding
GO:0043433	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity
GO:0043565	sequence-specific DNA binding
GO:0044648	histone H3-K4 dimethylation
GO:0045815	positive regulation of gene expression, epigenetic
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated
GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II
GO:0051091	positive regulation of DNA-binding transcription factor activity
GO:0080182	histone H3-K4 trimethylation
GO:0097692	histone H3-K4 monomethylation
GO:0098532	histone H3-K27 trimethylation
GO:1902275	regulation of chromatin organization
GO:1990841	promoter-specific chromatin binding

Таблица 7. Гены, ассоциированные с регуляцией транскрипции, дифференциально экспрессируемые в клетках НЕК 293Т при нокауте Ku70 и Ku80

Символ	Название гена	Изменен ие в Cr_KO Ku70	Изменен ие в Cr_KO Ku80	Данные о влиянии на ВИЧ-1
XBP1	X-box-binding protein 1 (XBP-1) (Tax-responsive element-binding protein 5)	0,52	0,79	В миелоидных клетках и Т-клетках ВИЧ-позитивных доноров наблюдался повышенный уровень экспрессии XBP1 относительно ВИЧ-негативных доноров [163]
ATF3	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3 (Activating transcription factor 3)	0,55	0,74	ATF3 участвует в привлечение комплекса ремодулирования хроматина SWI/SNF к промотору ВИЧ-1 в клетках Jurkat Т [164]
TRIM56	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56 (Tripartite motif-containing protein 56)	0,55	0,39	TRIM56 ингибирует экспрессию поздних генов ВИЧ-1 [168] Позитивное влияние на репликацию псевдовируса на основе ВИЧ-1[165]
ZNF469	Zinc finger protein 469	0,56	0,59	
RUNX1T1	Protein CBFA2T1 (Cyclin-D-related protein)	0,58	1,35	
TRIM66	Tripartite motif-containing protein 66	0,59	0,76	Позитивное влияние на репликацию псевдовируса на основе ВИЧ-1[165]
CEBPG	CCAAT/enhancer-binding protein gamma (C/EBP gamma)	0,67	0,76	Для экспрессии генов ВИЧ-1 субтипа В важны последовательности, расположенные выше промотора, которые являются сайтами связывания белков семейства C/EBP [166–170]
ZNF518A	Zinc finger protein 518A	0,76	0,69	
TOB1	Protein Tob1 (Transducer of erbB-2 1)	1,24	1,43	
TNRC18	trinucleotide repeat containing 18	1,42	1,23	
GRWD1	glutamate rich WD repeat containing 1	1,42	1,27	

ADRM1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1 (110 kDa cell membrane glycoprotein) (Gp110)	1,43	1,32	
E2F4	E2F transcription factor 4	1,50	1,27	E2F4 взаимодействует с вирусным транскриптиватором транскрипции белком Tat в дрожжевой двугибридной системе [171]
SETD1A	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A (Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit SET1)	1,50	1,27	Участвует в сайленсинге транскрипции с промотора ВИЧ-1 посредством метилирования гистонов (H3K9me3) [162]
DEK	DEK proto-oncogene	1,58	1,26	
HIST1H1C	Histone H1.2 (Histone H1c) (Histone H1d) (Histone H1s-1)	1,60	1,19	
MYBBP1A	MYB binding protein 1a	1,65	1,28	
JUND	JunD proto-oncogene%2C AP-1 transcription factor subunit	1,65	1,35	В LTR ВИЧ-1 есть сайты связывания транскрипционных факторов c-Fos и JunD, которые активируют транскрипцию провируса в ответ на активацию протеинкиназы C [172]
RNF187	E3 ubiquitin-protein ligase RNF187 (RING finger protein 187)	1,66	1,26	
HIST1H1E	Histone H1.4 (Histone H1b) (Histone H1s-4)	2,05	1,33	
HIST1H2AH	Histone H2A type 1-H (Histone H2A/s)	2,60	1,36	

4.4.2. 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 клеток линии НЕК 293Т с моноаллельным нокаутом Ku70. Учитывая, что моноаллельный нокаут каждой из субъединиц гетеродимера Ku (Ku70 и Ku80) одинаково влиял на эффективность экспрессии люциферазы под контролем LTR промотора ВИЧ-1, протеомный анализ мы проводили на клетках со сниженной экспрессией только субъединицы Ku70. Для этого было проанализировано 4 биологических повтора лизатов клеток линии НЕК 293Т дикого типа и клеток НЕК 293Т Cr-KO Ku70. Подготовку образцов, масс-спектрометрический анализ и количественное сравнение представленности пептидов белков в образцах с помощью программного обеспечения MaxQuant проводил сотрудник ИБХ им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН к.х.н., с.н.с. Зиганшин Р. Х. Таким образом, у нас были данные об изменении 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, у которых уровень в двух клеточных линиях отличался статистически значимо (с Т-тест p -value менее 0.05). Таких находок оказалось 901, из них 898 были уникально мэпированы на соответствующие гены. Логарифм изменения уровня белка в клетках с моноаллельным нокаутом Ku70 относительно клеток дикого типа для каждого гена приведен на Рисунок 37. Из них для поиска факторов транскрипции, вовлеченных в регуляцию экспрессии ВИЧ-1, мы отобрали только те гены, уровень изменения белка которых больше 1.4 раза, то есть те, у которых $\log_2 FC > 0.5$ или < -0.5 : таких генов оказалось 388.

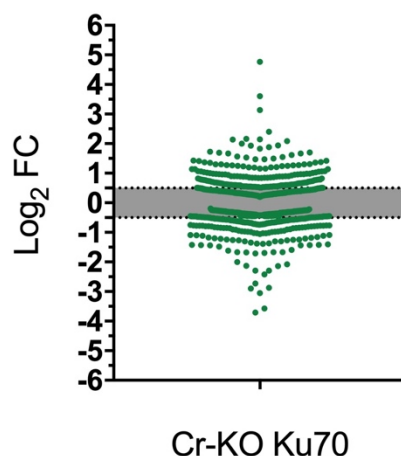


Рисунок 37. Изменение уровня белков в клеточной линии НЕК 293Т с моноаллельным нокаутом Ku70 относительно клеток дикого типа. Каждая точка соответствует одному гену, у которого изменение уровня белка было статистически значимо при нокауте Ku70. Пунктирные линии отделяют гены с логарифмом изменения уровня белка в пределах (-0.5; 0.5).

Стоит отметить, что среди всех идентифицированных белков не было белков ATF3, CEBPG, TRIM56 и SETD1A, которые имели изменения уровня мРНК и были предложены нами в качестве возможных посредников Ку-зависимой регуляции ВИЧ-1.

В NCBI была создана база данных известных взаимосвязей между белками и процессами ВИЧ-1 и клеточными генами «HIV-1 Human Interaction Database» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/retroviruses/hiv-1/interactions/>). На момент последнего ее обновления (сентябрь 2017) она включала информацию из 6822 статей о взаимодействиях вирусных белков с клеточными (8005 записей, покрывающих 3757 генов) и информацию о влиянии клеточных генов на репликацию ВИЧ-1 (229 публикаций, 1595 занесенных в базу фактов влияния для 1583 генов). Из этой базы 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 более чем в 1.4 раз в клетках с нокаутом Ku70. Таких генов оказалось всего 38, включая сам ген белка Ku70. В рамках данной работы нам было необходимо найти среди них белки, вовлеченные в регуляцию транскрипции ВИЧ-1, поэтому мы отобрали тех, которые имели хотя бы одну из аннотаций gene ontology (GO), указывающих на участие белка в транскрипции (Таблица 6), аналогично тому, как мы делали при поиске в данных транскриптома. В итоге, получился список из 8 генов, для которых есть данные о связи с ВИЧ-1, которые способны участвовать в транскрипции, и для которых количество белка значительно изменилось при моноаллельном нокауте Ku70 в клетках НЕК 293Т. Все они собраны в Таблица 8.

Таблица 8. Гены, ассоциированные с регуляцией транскрипции и имеющие изменения в уровне белка в клетках НЕК 293Т при нокауте Ku70, найденные в базе данных взаимодействия ВИЧ-1 с клеточными факторами

Ген	Название белка	Уровень белка в клетках Cr-KO Ku70 относ. wt	p-value	Данные об участии в репликации ВИЧ-1
IGHMBP2	DNA-binding protein SMUBP-2	0,5	0,019	Нокдаун IGHMBP2 с помощью siРНК ингибирует репликацию ВИЧ-1 в клетках TZM-bl [173]
NR2C2AP	Nuclear receptor 2C2-associated protein	1,51	0.008	Нокдаун NR2C2AP с помощью siРНК стимулирует эффективность ранних стадий репликации ВИЧ-1 в клетках HeLa-CD4 [174]
SQSTM1	Sequestosome-1	1,72	0,033	Экспрессия gp120 (Env) ВИЧ-1 снижает уровень SQSTM1 в клетках SH-SY5Y [175]
TFAP4	Transcription factor AP-4	1,91	0,034	Нокдаун TFAP4 с помощью siРНК ингибирует репликацию ВИЧ-1 в клетках TZM-bl [173]; AP-4 имеет сайт связывания CAGCTG через 1 нуклеотид после ТАТА-бокса и нарушает взаимодействие ТВР (ТАТА-binding protein) с ним [176]; AP-4 репрессирует транскрипцию с LTR промотора ВИЧ-1 через закрытие ТАТА-бокса и привлечение гистондеацетилазы HDAC1[177]
MED28	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 28	1,96	0,013	Один из компонентов комплекса Медиатор, активирующего транскрипцию РНКП II Нокдаун MED28 с помощью siРНК ингибирует репликацию ВИЧ-1 в клетках HeLa [173], [178] и ингибирует Tat-зависимую активацию транскрипции с LTR промотора ВИЧ-1 [178]

MED4	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4	2,49	0,008	Один из компонентов комплекса Медиатор, активирующего транскрипцию РНКП II; Нокдаун MED4 с помощью siРНК ингибирует репликацию ВИЧ-1 в клетках HeLa [173], [178], [179] и ингибирует Tat-зависимую активацию транскрипции с LTR промотора ВИЧ-1 [178]
POLR2K	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC4	2,82	0,049	Компонент комплекса РНК полимеразы II, участвующего в транскрипции генов ВИЧ-1; Нокдаун POLR2K с помощью siРНК ингибирует активацию транскрипции с LTR промотора ВИЧ-1 [179]
PTMA	Prothymosin alpha	8,79	0,041	РТМА подавляет репликацию ВИЧ-1 в макрофагах через индукцию экспрессии интерферона I [180]; Взаимодействует с белком Rev ВИЧ-1 [181]

Среди этих 8 генов (Таблица 8), 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 [178,179], 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. В то же время 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 [176,177], 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.

Проведенная аналитическая работа с данными транскриптомного и протеомного анализов клеток НЕК 293Т дикого типа и с пониженным уровнем Ku позволила нам найти гены ATF3, CEBPB, TRIM56, SETD1A и TFAP4, которые могут участвовать в Ku-зависимой регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1. Однако, стоит признать, что изменения уровня мРНК генов ATF3, CEBPB, TRIM56, SETD1A, идентифицированных при анализе транскриптомных данных, не очень большие, хотя статистически значимые. Возможно, что такие изменения уровня мРНК не привели бы к изменению уровня соответствующего белка, и, соответственно, не могли бы объяснять влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Тем не менее, полностью исключить вероятность их участия мы не можем. Белок AP-4 не является общепризнанным фактором, регулирующим экспрессию генов ВИЧ-1, и про его роль в ней есть только две работы [176,177], опубликованные 1994 г. и 2006 г., но тем более интересным может стать факт вовлечения Ku в транскрипцию генов ВИЧ-1 за его счет. Описанный в этом разделе анализ открывает новое направление в поиске механизма Ku-зависимой регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во время своего жизненного цикла ВИЧ-1 взаимодействует со многими клеточными белками, которые могут участвовать в регуляции репликации вируса на разных стадиях как негативно, так и позитивно. Настоящая работа была посвящена изучению роли двух клеточных факторов, белка SFPQ и белкового комплекса DNA-PK, в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1.

Анализ опубликованных работ про участие белков параспеклей SFPQ и NONO, а также NEAT1 РНК в репликации ВИЧ-1 выявил несколько стадий, на которые эти факторы могут влиять: обратная транскрипция, интеграция, поддержание уровня несплайсированной вирусной мРНК. Также вполне возможна их роль в клеточном ответе при заражении вирусом, как это было описано для вируса гриппа и вируса простого герпеса. Проведенная работа позволила начать в лаборатории новое направление исследований, посвященных изучению механизма участия белков SFPQ и NONO в жизненном цикле ВИЧ-1 на стадии транскрипции с промотора ВИЧ-1. Нами впервые было показано, что SFPQ имеет сайт связывания в U3 фрагменте вирусного LTR участка, что определяет его положительное влияние на экспрессию с промотора ВИЧ-1 в клетках линии НЕК 293Т.

Белковый комплекс DNA-PKcs, состоящий из ДНК-связывающего гетеродимера Ku (Ku70/Ku80) и каталитической субъединицы протеинкиназы DNA-PKcs, - один из компонентов репарации двуцепочечных разрывов ДНК по классическому пути негомологичного объединения концов. До недавнего времени не было однозначных данных о роли субъединиц этого комплекса в репликации ВИЧ-1 [16,40,41], так как предполагалось его влияние на разные стадии репликации, что зачастую затрудняло интерпретацию результатов. Новые данные о привлечении комплекса DNA-PK к месту интеграции через взаимодействие Ku с интегразой ВИЧ-1 для обеспечения постинтеграционной репарации генома [37–39] позволили заключить, что во многих исследованиях роли комплекса DNA-PK в транскрипции ВИЧ-1 наблюдаемый эффект может быть вызван именно его участием в репарации после интеграции, а не в транскрипции. В связи с этим нами было проведено исследование влияния отдельных субъединиц DNA-PK на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в условиях, когда интеграция отсутствует. Нами было показано, что снижение уровня обеих субъединиц Ku приводит к снижению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1 в клетках линии НЕК 293Т, а их суперэкспрессия, в свою очередь, к повышению. Но в то же время, эффекта от каталитической субъединицы DNA-PKcs не наблюдалось. Таким образом, гетеродимер Ku является положительным регулятором транскрипции ВИЧ-1, и механизм регуляции не связан с каталитической активностью DNA-PKcs. Хотя до сих пор

не удалось установить внутренний сайт связывания Ku с LTR участком ВИЧ-1, мы впервые продемонстрировали присутствие Ku на промоторе ВИЧ-1 в репортерном векторе и в уже интегрированном в геном провирусе в клетках НЕК 293Т и микроглиальных клетках.

В процессе исследования механизма привлечения Ku к вирусному промотору были дополнительно изучены РНК-связывающие свойства гетеродимера Ku, для чего был сконструирован вектор для экспрессии рекомбинантного гетеродимера в клетках *E.coli* и разработана методика его очистки.

Все больше данных появляется о возможной роли Ku в различных клеточных процессах, помимо репарации по пути NHEJ, и для некоторых из них важно взаимодействие Ku с РНК. Мы показали, что структура РНК определяет сродство к ней белка Ku человека: предпочтительной для связывания вторичной структурой является шпилька с небольшим выпетливанием около терминальной петли, обладающей G-богатой последовательностью; а сайт связывания РНК в Ku совпадает с сайтом связывания ДНК. Примечательно, что это согласуется с наблюдениями, сделанными для белка Ku дрожжей [150]. Такой структурой обладает TAR РНК - важный регулятор транскрипции ВИЧ-1, формирующаяся на 5'-конце всех вирусных мРНК. Ранее для эндогенного Ku в ядерных лизатах было показано взаимодействие с TAR РНК [137], мы, в свою очередь, подтвердили *in vitro*, что они взаимодействуют напрямую, без посредников. Тем не менее функциональную значимость этого взаимодействия для транскрипции ВИЧ-1 установить не удалось: Ku одинаково влиял на транскрипцию и в присутствии, и в отсутствии TAR РНК. Однако анализ РНК связывающих свойств гетеродимера Ku и анализ данных eCLIP для Ku70 позволил предположить взаимодействие Ku с другой РНК, участвующей в регуляции транскрипции ВИЧ-1, – 7SK мРНК. Мы впервые показали, что Ku взаимодействует с 7SK РНК как *in vitro*, так и в клетках НЕК 293Т. Более того, с помощью футпринтинга мы установили сайт связывания Ku в структуре 7SK РНК – это окончание ее первой шпильки. Также было показано взаимодействие Ku с белками, присутствующими в комплексе с 7SK РНК - HEXIM1 и циклин-зависимой киназой Cdk9. Она является компонентом фактора транскрипции Р-TEFb, важного для элонгации транскрипции клеточных генов, а также генов ВИЧ-1. Таким образом, мы можем предложить Ku в качестве нового компонента комплекса 7SK мРНК.

Мы проверили, на какую стадию транскрипции влияет Ku, и оказалось, что подавление Ku значительно снижает количество фосфорилированной по Ser5 инициаторной формы РНКП II на промоторе ВИЧ-1 и уровень синтезированной TAR РНК. Эти наблюдения свидетельствуют о важности Ku в первую очередь для инициации транскрипции. И хотя изначально мы предполагали, что его эффект связан с

взаимодействием с компонентами комплекса 7SK мяРНП, регулирующего элонгацию транскрипцию, возможно, что функциональное значение этого взаимодействия заключается в другом. Возможно, что наличие Ku на промоторе ВИЧ-1 как раз обусловлено его участием в комплексе 7SK мяРНП, который, по некоторым данным, привлекается к промотору ВИЧ-1 во время инициации транскрипции.

Основная часть данной работы была посвящена поиску механизма регуляции транскрипции генов ВИЧ-1 белком Ku, для которого подразумевалось непосредственное вовлечение Ku в этот процесс, тем не менее мы не можем упускать из виду и возможность опосредованного влияния Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Возможно, существует другой фактор, который сам непосредственно регулирует экспрессию генов ВИЧ-1, а Ku, в свою очередь, регулирует его уровень в клетке. В связи с этим, мы провели аналитическую работу по поиску такого возможного фактора транскрипции. Для этого были проанализированы данные изменения экспрессии клеточных генов на транскриптомном и протеомном уровнях, что позволило предложить гены ATF3, CEBPG, TRIM56, SETD1A и TFAR4 в качестве посредников в Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1. Среди них TFAR4 кажется наиболее перспективным кандидатом для объяснения негативного эффекта нокаута Ku на транскрипцию генов ВИЧ-1: этот ген кодирует транскрипционный фактор AP-4, который мешает инициации транскрипции, а его уровень повышается в 2 раза в клетках с нокаутом Ku70. Таким образом, проведенный нами анализ транскриптомных и протеомных данных открывает новые возможные пути влияния Ku на транскрипцию.

VI. 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 протеин-киназы 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.

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] J. Votteler, U. Schubert, Human Immunodeficiency Viruses: Molecular Biology, in: *Encycl. Virol.*, Elsevier Ltd, 2008: pp. 517–525. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00428-3>.
- [2] A. Engelman, P. Cherepanov, The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights., *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2012) 279–90. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2747>.
- [3] M.D. Miller, C.M. Farnet, F.D. Bushman, Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes: Studies of Organization and Composition Downloaded from, 1997. <http://jvi.asm.org/> (accessed August 5, 2020).
- [4] N.K. Raghavendra, N. Shkriabai, R.L.J. Graham, S. Hess, M. Kvaratskhelia, L. Wu, Identification of host proteins associated with HIV-1 preintegration complexes isolated from infected CD4+cells, *Retrovirology*. (2010). <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-66>.
- [5] C.J. Schweitzer, T. Jagadish, N. Haverland, P. Ciborowski, M. Belshan, Proteomic analysis of early HIV-1 nucleoprotein complexes, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 559–572. <https://doi.org/10.1021/pr300869h>.
- [6] B. Studamire, S.P. Goff, Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: Multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors, *Retrovirology*. 5 (2008) 48. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-48>.
- [7] S. Emiliani, A. Mousnier, K. Busschots, M. Maroun, B. Van Maele, D. Tempé, L. Vandekerckhove, F. Moisan, L. Ben-Slama, M. Witvrouw, F. Christ, J.C. Rain, C. Dargemont, Z. Debyser, R. Benarous, Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25517–25523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501378200>.
- [8] Y. Zheng, Z. Ao, B. Wang, K.D. Jayappa, X. Yao, Host protein Ku70 binds and protects HIV-1 integrase from proteasomal degradation and is required for HIV replication, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 17722–17735. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.184739>.
- [9] C.-W. Lin, A. Engelman, The Barrier-to-Autointegration Factor Is a Component of Functional Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preintegration Complexes, *J. Virol.* 77 (2003) 5030–5036. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.8.5030-5036.2003>.
- [10] C.M. Farnet, F.D. Bushman, HIV-1 cDNA integration: Requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro, *Cell*. 88 (1997) 483–492. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81888-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81888-7).
- [11] A. Meyerhans, A. Meyerhans, T. Breinig, T. Breinig, J. Vartanian, J. Vartanian, S. Wain-

- hobson, S. Wain-hobson, Forms and Function of Intracellular HIV DNA, *J. Virol.* (1999) 14–21.
- [12] Y. Wu, HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA., *Retrovirology*. 1 (2004) 13. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-13>.
- [13] R.D. Sloan, M.A. Wainberg, The role of unintegrated DNA in HIV infection., *Retrovirology*. 8 (2011) 52. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-52>.
- [14] C. Van Lint, S. Bouchat, A. Marcello, HIV-1 transcription and latency: an update., *Retrovirology*. 10 (2013) 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-67>.
- [15] Y. Desfosses, M. Solis, Q. Sun, N. Grandvaux, C. Van Lint, A. Burny, A. Gatignol, M.A. Wainberg, R. Lin, J. Hiscott, Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression by Clade-Specific Tat Proteins, *Society*. 79 (2005) 9180–9191. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.9180>.
- [16] О.А. Шадрина, Е.С. Княжанская, С.П. Королев, М.Б. Готтих, Клеточные белки Ku и HMG1 как участники транскрипции ВИЧ-1, *Acta Naturae (Русскоязычная Версия)*. 8 (2016) 29–43.
- [17] L. Colin, E. Verdin, C. Van Lint, HIV-1 chromatin, transcription, and the regulatory protein Tat., *Methods Mol. Biol.* 1087 (2014) 85–101. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_8.
- [18] D.S. Ruelas, W.C. Greene, An integrated overview of HIV-1 latency, *Cell*. 155 (2013) 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.044>.
- [19] M.J. Churchill, D.J. Cowley, S.L. Wesselingh, P.R. Gorry, L.R. Gray, HIV-1 transcriptional regulation in the central nervous system and implications for HIV cure research, *J. Neurovirol.* 1 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0271-5>.
- [20] H. Kwak, J.T. Lis, Control of Transcriptional Elongation, *Annu. Rev. Genet.* (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155440>.
- [21] B.M. Peterlin, D.H. Price, Controlling the Elongation Phase of Transcription with P-TEFb, *Mol. Cell.* (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.014>.
- [22] B. Cheng, D.H. Price, Properties of RNA Polymerase II Elongation Complexes Before and After the P-TEFb-mediated Transition into Productive Elongation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 21901–21912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702936200>.
- [23] K. Fujinaga, D. Irwin, Y. Huang, R. Taube, T. Kurosu, B.M. Peterlin, Dynamics of Human Immunodeficiency Virus Transcription: P-TEFb Phosphorylates RD and Dissociates Negative Effectors from the Transactivation Response Element, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 787–795. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.787-795.2004>.
- [24] Q. Li, J.J. Cooper, G.H. Altwerger, M.D. Feldkamp, M.A. Shea, D.H. Price, HEXIM1 is a

- promiscuous double-stranded RNA-binding protein and interacts with RNAs in addition to 7SK in cultured cells., *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2503–12.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm150>.
- [25] Z. Yang, Q. Zhu, K. Luo, Q. Zhou, The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription., *Nature.* 414 (2001) 317–22.
<https://doi.org/10.1038/35104575>.
 - [26] J. Leblanc, J. Weil, K. Beemon, Posttranscriptional regulation of retroviral gene expression: Primary RNA transcripts play three roles as pre-mRNA, mRNA, and genomic RNA, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* (2013). <https://doi.org/10.1002/wrna.1179>.
 - [27] J. Karn, C.M. Stoltzfus, Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2012).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>.
 - [28] C. Martin Stoltzfus, Chapter 1 Regulation of HIV-1 Alternative RNA Splicing and Its Role in Virus Replication, 1st ed., Elsevier Inc., 2009. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)74001-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)74001-1).
 - [29] V.S.R.K. Yedavalli, K.-T. Jeang, Rev-ing up post-transcriptional HIV-1 RNA expression, *RNA Biol.* 8 (2011) 195–199. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14803>.
 - [30] A.I. Dayton, Within you, without you: HIV-1 Rev and RNA export., *Retrovirology.* 1 (2004) 35. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-35>.
 - [31] D. Toro-Ascuy, B. Rojas-Araya, F. Valiente-Echeverría, R. Soto-Rifo, Interactions between the HIV-1 unspliced mRNA and host mRNA decay machineries, *Viruses.* (2016).
<https://doi.org/10.3390/v8110320>.
 - [32] S. Schwartz, M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B.K. Felber, G.N. Pavlakis, Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression., *J. Virol.* (1992).
 - [33] S. Schwartz, B.K. Felber, G.N. Pavlakis, Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein., *J. Virol.* (1992).
 - [34] R. Schneider, M. Campbell, G. Nasioulas, B.K. Felber, G.N. Pavlakis, Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation., *J. Virol.* 71 (1997) 4892–4903.
 - [35] E. Afonina, M. Neumann, G.N. Pavlakis, Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2307–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2307>.

- [36] A.C. Black, J. Luo, S. Chun, A. Bakker, J.K. Fraser, J.D. Rosenblatt, Specific binding of polypyrimidine tract binding protein and hnRNP A1 to HIV-1 CRS elements., *Virus Genes*. 12 (1996) 275–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8883365> (accessed August 8, 2019).
- [37] A.N. Anisenko, E.S. Knyazhanskaya, A.O. Zalevsky, J.Y. Agapkina, A.I. Sizov, T.S. Zatsepin, M.B. Gottikh, Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05659-5>.
- [38] M. Gottikh, A. Anisenko, E. Knyazhanskaya, D. Mazurov, The HIV-1 integrase interaction with Ku70 in the postintegrational gap repair, *Retrovirology*. 15 (2018) 17–18.
- [39] E. Knyazhanskaya, A. Anisenko, O. Shadrina, A. Kalinina, T. Zatsepin, A. Zalevsky, D. Mazurov, M. Gottikh, NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase, *Retrovirology*. 16 (2019) 30. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0492-z>.
- [40] Е.С. Княжанская, О.А. Шадрина, А.Н. Анисенко, М.Б. Готтих, Роль ДНК-зависимой протеинкиназы в репликации ВИЧ-1, *Молекулярная Биология*. 50 (2016) 639–654.
- [41] A.N. Anisenko, M.B. Gottikh, Role of Cellular DNA Repair Systems in HIV-1 Replication, *Mol. Biol. (Mosk)*. 53 (2019) 355–366. <https://doi.org/10.1134/S0026898419030029>.
- [42] Y. Gu, S. Jin, Y. Gao, D.T. Weaver, F.W. Alt, Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 8076–8081. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.15.8076>.
- [43] K. Burleigh, J.H. Maltbaek, S. Cambier, R. Green, M. Gale, R.C. James, D.B. Stetson, Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway, *Sci. Immunol.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4219>.
- [44] J.R. Walker, R.A. Corpina, J. Goldberg, Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair., *Nature*. 412 (2001) 607–14. <https://doi.org/10.1038/35088000>.
- [45] S. Chen, K. V Inamdar, P. Pfeiffer, E. Feldmann, M.F. Hannah, Y. Yu, J.W. Lee, T. Zhou, S.P. Lees-Miller, L.F. Povirk, Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 24323–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010544200>.
- [46] W.S. Dynan, S. Yoo, Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase

- catalytic subunit with nucleic acids., *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1551–1559.
<https://doi.org/10.1093/nar/26.7.1551>.
- [47] S.J. Collis, T.L. DeWeese, P.A. Jeggo, A.R. Parker, The life and death of DNA-PK, *Oncogene*. 24 (2005) 949–961. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208332>.
 - [48] L. Spagnolo, A. Rivera-Calzada, L.H. Pearl, O. Llorca, Three-Dimensional Structure of the Human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 Complex Assembled on DNA and Its Implications for DNA DSB Repair, *Mol. Cell*. 22 (2006) 511–519.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.013>.
 - [49] V.L. Fell, C. Schild-Poulter, The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 763 (2015) 15–29.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.06.002>.
 - [50] A. Kuhn, V. Stefanovsky, I. Grummt, The nucleolar transcription activator UBF relieves Ku antigen-mediated repression of mouse ribosomal gene transcription, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 2057–2063. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2057>.
 - [51] S.H. Yang, A. Nussenzweig, L. Li, D. Kim, H. Ouyang, P. Burgman, G.C. Li, Modulation of thermal induction of hsp70 expression by Ku autoantigen or its individual subunits, *Mol Cell Biol.* 16 (1996) 3799–3806.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8668197.
 - [52] W. Giffin, J. Kwast_Welfeld, D.J. Rodda, G.G. Prefontaine, A.M. Traykova, Y. Zhang, N.L. Weigel, Y.A. Lefebvre, R.J. Haché, Sequence-specific DNA binding and transcription factor phosphorylation by Ku Autoantigen/DNA-dependent protein kinase. Phosphorylation of Ser- 527 of the rat glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 5647–5658. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5647>.
 - [53] M.W. Knuth, S.I. Gunderson, N.E. Thompson, L.A. Strasheim, R.R. Burgess, Purification and characterization of proximal sequence element-binding protein 1, a transcription activating protein related to Ku and TREF that binds the proximal sequence element of the human U1 promoter, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17911–17920.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211668> (accessed July 8, 2019).
 - [54] J.W. Lim, H. Kim, K.H. Kim, The Ku Antigen-Recombination Signal-binding Protein J?? Complex Binds to the Nuclear Factor-??B p50 Promoter and Acts as a Positive Regulator of p50 Expression in Human Gastric Cancer Cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 231–237.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M308609200>.
 - [55] D. Jiang, Y. Zhou, R.A. Moxley, H.W. Jarrett, Purification and Identification of Positive Regulators Binding to a Novel Element in the c-Jun Promoter †, *Biochemistry*. 47 (2008)

- 9318–9334. <https://doi.org/10.1021/bi800285q>.
- [56] R.L. Woodard, M.G. Anderson, W.S. Dynan, Nuclear extracts lacking DNA-dependent protein kinase are deficient in multiple round transcription, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.478>.
 - [57] R.L. Woodard, K.J. Lee, J. Huang, W.S. Dynan, Distinct Roles for Ku Protein in Transcriptional Reinitiation and DNA Repair, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15423–15433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010752200>.
 - [58] X. Mo, W.S. Dynan, Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites., *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 8088–99. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.8088>.
 - [59] A. Dvir, S.R. Peterson, M.W. Knuth, H. Lu, W.S. Dynan, Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 11920–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11920>.
 - [60] S.R. Peterson, A. Dvir, C.W. Anderson, W.S. Dynan, DNA binding provides a signal for phosphorylation of the RNA polymerase II heptapeptide repeats, *Genes Dev.* 6 (1992) 426–438. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.426>.
 - [61] A. Dvir, L.Y. Stein, B.L. Calore, W.S. Dynan, Purification and characterization of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II, *J Biol Chem.* 268 (1993) 10440–10447. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486698>.
 - [62] L. Jeanson, J.F. Mouscadet, Ku represses the HIV-1 transcription. Identification of a putative Ku binding site homologous to the mouse mammary tumor virus NRE1 sequence in the HIV-1 long terminal repeat, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4918–4924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110830200>.
 - [63] C. Masson, S. Bury-Moné, E. Guiot, A. Saez-Cirion, D. Schoëvaert-Brossault, C. Brachet-Ducos, O. Delelis, F. Subra, L. Jeanson-Leh, J.-F. Mouscadet, Ku80 participates in the targeting of retroviral transgenes to the chromatin of CHO cells., *J. Virol.* 81 (2007) 7924–7932. <https://doi.org/10.1128/JVI.02015-06>.
 - [64] B. Lucic, H.C. Chen, M. Kuzman, E. Zorita, J. Wegner, V. Minneker, W. Wang, R. Fronza, S. Laufs, M. Schmidt, R. Stadhouders, V. Roukos, K. Vlahovicek, G.J. Filion, M. Lusic, Spatially clustered loci with multiple enhancers are frequent targets of HIV-1 integration, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12046-3>.
 - [65] A. Ibarra, C. Benner, S. Tyagi, J. Cool, M.W. Hetzer, Nucleoporin-mediated regulation of cell identity genes, *Genes Dev.* 30 (2016) 2253–2258. <https://doi.org/10.1101/gad.287417.116>.

- [66] B. Marini, A. Kertesz-Farkas, H. Ali, B. Lucic, K. Lisek, L. Manganaro, S. Pongor, R. Luzzati, A. Recchia, F. Mavilio, M. Giacca, M. Lusic, Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection, *Nature*. 521 (2015) 227–231.
<https://doi.org/10.1038/nature14226>.
- [67] F. Di Nunzio, T. Fricke, A. Miccio, J.C. Valle-Casuso, P. Perez, P. Souque, E. Rizzi, M. Severgnini, F. Mavilio, P. Charneau, F. Diaz-Griffero, Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication, *Virology*. 440 (2013) 8–18.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.008>.
- [68] S. Waninger, K. Kuhen, X. Hu, J.E. Chatterton, F. Wong-Staal, H. Tang, Identification of cellular cofactors for human immunodeficiency virus replication via a ribozyme-based genomics approach, *J Virol*. 78 (2004) 12829–12837.
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.12829>.
- [69] G. Manic, A. Maurin-Marlin, F. Laurent, I. Vitale, S. Thierry, O. Delelis, P. Dessen, M. Vincendeau, C. Leib-Mösch, U. Hazan, J.F. Mouscadet, S. Bury-Moné, Impact of the Ku Complex on HIV-1 Expression and Latency, *PLoS One*. 8 (2013).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069691>.
- [70] S. Tyagi, A. Ochem, M. Tyagi, DNA-dependent protein kinase interacts functionally with the RNA polymerase II complex recruited at the human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat and plays an important role in HIV gene expression, *J. Gen. Virol*. 92 (2011) 1710–1720. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029587-0>.
- [71] S. Zicari, A.L. Sharma, G. Sahu, L. Dubrovsky, L. Sun, H. Yue, T. Jada, A. Ochem, G. Simon, M. Bukrinsky, M. Tyagi, DNA dependent protein kinase (DNA-PK) enhances HIV transcription by promoting RNA polymerase II activity and recruitment of transcription machinery at HIV LTR, *Oncotarget*. 11 (2020) 699–726.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.27487>.
- [72] H. Bunch, S.K. Calderwood, TRIM28 as a novel transcriptional elongation factor, *BMC Mol. Biol*. 16 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12867-015-0040-x>.
- [73] X. Ma, T. Yang, Y. Luo, L. Wu, Y. Jiang, Z. Song, T. Pan, B. Liu, G. Liu, J. Liu, F. Yu, Z. He, W. Zhang, J. Yang, L. Liang, Y. Guan, X. Zhang, L. Li, W. Cai, X. Tang, S. Gao, K. Deng, H. Zhang, TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb, *Elife*. 8 (2019). <https://doi.org/10.7554/eLife.42426>.
- [74] A.N. Anisenko, E.S. Knyazhanskaya, A.O. Zalevsky, J.Y. Agapkina, A.I. Sizov, T.S. Zatsepin, M.B. Gottikh, Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting., *Sci. Rep*. 7 (2017) 5649.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05659-5>.

- [75] A.H. Fox, Y.W. Lam, A.K.L. Leung, C.E. Lyon, J. Andersen, M. Mann, A.I. Lamond, Paraspeckles: a novel nuclear domain., *Curr. Biol.* 12 (2002) 13–25.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00632-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00632-7).
- [76] L.-L. Chen, G.G. Carmichael, Altered Nuclear Retention of mRNAs Containing Inverted Repeats in Human Embryonic Stem Cells: Functional Role of a Nuclear Noncoding RNA, *Mol. Cell.* 35 (2009) 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.027>.
- [77] T. Naganuma, S. Nakagawa, A. Tanigawa, Y.F. Sasaki, N. Goshima, T. Hirose, Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles, *EMBO J.* 31 (2012) 4020–4034. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.251>.
- [78] Y.T.F. Sasaki, T. Ideue, M. Sano, T. Mituyama, T. Hirose, MENε/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0807899106>.
- [79] G.J. Knott, C.S. Bond, A.H. Fox, The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: A multipurpose molecular scaffold, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 3989–4004.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw271>.
- [80] S. Ren, M. She, M. Li, Q. Zhou, R. Liu, H. Lu, C. Yang, D. Xiong, The RNA/DNA-binding protein PSF relocates to cell membrane and contributes cells' sensitivity to antitumor drug, doxorubicin., *Cytometry. A.* 85 (2014) 231–41.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22423>.
- [81] M.T. Furukawa, H. Sakamoto, K. Inoue, Interaction and colocalization of HERMES/RBPMS with NonO, PSF, and G3BP1 in neuronal cytoplasmic RNP granules in mouse retinal line cells., *Genes Cells.* 20 (2015) 257–66.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12224>.
- [82] M. Lee, A. Sadowska, I. Bekere, D. Ho, B.S. Gully, Y. Lu, K.S. Iyer, J. Trehwella, A.H. Fox, C.S. Bond, The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 3826–3840. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv156>.
- [83] D.M. Passon, M. Lee, O. Rackham, W.A. Stanley, A. Sadowska, A. Filipovska, A.H. Fox, C.S. Bond, 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.* 109 (2012) 4846–4850. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120792109>.
- [84] S. Li, Z. Li, F.-J. Shu, H. Xiong, A.C. Phillips, W.S. Dynan, Double-strand break repair deficiency in NONO knockout murine embryonic fibroblasts and compensation by spontaneous upregulation of the PSPC1 paralog., *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 9771–80.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku650>.

- [85] M. Mathur, P.W. Tucker, H.H. Samuels, PSF Is a Novel Corepressor That Mediates Its Effect through Sin3A and the DNA Binding Domain of Nuclear Hormone Receptors, *Mol. Cell. Biol.* (2001). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.7.2298-2311.2001>.
- [86] X. Dong, O. Shylnova, J.R.G. Challis, S.J. Lye, Identification and characterization of the protein-associated splicing factor as a negative co-regulator of the progesterone receptor., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13329–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409187200>.
- [87] X. Dong, J. Sweet, J.R.G. Challis, T. Brown, S.J. Lye, Transcriptional Activity of Androgen Receptor Is Modulated by Two RNA Splicing Factors, PSF and p54nrb, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 4863–4875. <https://doi.org/10.1128/mcb.02144-06>.
- [88] X. Dong, C. Yu, O. Shynlova, J.R.G. Challis, P.S. Rennie, S.J. Lye, p54nrb Is a Transcriptional Corepressor of the Progesterone Receptor that Modulates Transcription of the Labor-Associated Gene, Connexin 43 (Gja1), *Mol. Endocrinol.* (2009). <https://doi.org/10.1210/me.2008-0357>.
- [89] K. Ishitani, T. Yoshida, H. Kitagawa, H. Ohta, S. Nozawa, S. Kato, p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306 (2003) 660–5. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01021-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01021-0).
- [90] A. Emili, M. Shales, S. McCracken, W. Xie, P.W. Tucker, R. Kobayashi, B.J. Blencowe, C.J. Ingles, Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54nrb/nonO bind to the RNA polymerase II CTD., *RNA.* 8 (2002) 1102–11. <https://doi.org/10.1017/s1355838202025037>.
- [91] A.L. Amelio, L.J. Miraglia, J.J. Conkright, B.A. Mercer, S. Batalov, V. Cavett, A.P. Orth, J. Busby, J.B. Hogenesch, M.D. Conkright, A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0707999105>.
- [92] S.A. Ong, J.J. Tan, W.L. Tew, K.S. Chen, Rasd1 modulates the coactivator function of Nono in the cyclic AMP pathway, *PLoS One.* (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024401>.
- [93] H.A. Duong, M.S. Robles, D. Knutti, C.J. Weitz, A molecular mechanism for circadian clock negative feedback, *Science* (80-.). (2011). <https://doi.org/10.1126/science.1196766>.
- [94] S. Kaneko, O. Rozenblatt-Rosen, M. Meyerson, J.L. Manley, The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination, *Genes Dev.* (2007). <https://doi.org/10.1101/gad.1565207>.
- [95] C.L. Bladen, D. Udayakumar, Y. Takeda, W.S. Dynan, 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.* 280 (2005) 5205–5210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412758200>.
- [96] D. Udayakumar, W.S. Dynan, Characterization of DNA binding and pairing activities associated with the native SFPQ·NONO DNA repair protein complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.024>.
- [97] S. Li, W.W. Kuhne, A. Kulharya, F.Z. Hudson, K. Ha, Z. Cao, W.S. Dynan, Involvement of p54(nrb), a PSF partner protein, in DNA double-strand break repair and radioresistance., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 6746–53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp741>.
- [98] M. Salton, Y. Lerenthal, S.-Y. Wang, D.J. Chen, Y. Shiloh, Involvement of Matrin 3 and SFPQ/NONO in the DNA damage response., *Cell Cycle.* 9 (2010) 1568–76. <https://doi.org/10.4161/cc.9.8.11298>.
- [99] Y. Morozumi, Y. Takizawa, M. Takaku, H. Kurumizaka, Human PSF binds to RAD51 and modulates its homologous-pairing and strand-exchange activities., *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 4296–307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp298>.
- [100] C. Rajesh, D.K. Baker, A.J. Pierce, D.L. Pittman, The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion., *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 132–45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq738>.
- [101] A. Kuhnert, U. Schmidt, S. Monajembashi, C. Franke, B. Schlott, F. Grosse, K.O. Greulich, H.-P. Saluz, F. Hänel, Proteomic identification of PSF and p54(nrb) as TopBP1-interacting proteins., *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 1744–53. <https://doi.org/10.1002/jcb.24045>.
- [102] Y. Morozumi, R. Ino, M. Takaku, M. Hosokawa, S. Chuma, H. Kurumizaka, Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMC1-mediated homologous pairing., *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 3031–41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1229>.
- [103] A.H. Fox, P54nrb Forms a Heterodimer with PSP1 That Localizes to Paraspeckles in an RNA-dependent Manner, *Mol. Biol. Cell.* (2005). <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0587>.
- [104] K. V Prasanth, S.G. Prasanth, Z. Xuan, S. Hearn, S.M. Freier, C.F. Bennett, M.Q. Zhang, D.L. Spector, Regulating gene expression through RNA nuclear retention., *Cell.* 123 (2005) 249–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.033>.
- [105] C.M. Clemson, J.N. Hutchinson, S.A. Sara, A.W. Ensminger, A.H. Fox, A. Chess, J.B. Lawrence, An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles., *Mol. Cell.* 33 (2009) 717–26.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026>.

- [106] H. Sunwoo, M.E. Dinger, J.E. Wilusz, P.P. Amaral, J.S. Mattick, D.L. Spector, Men ϵ/β nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles, *Genome Res.* (2009).
<https://doi.org/10.1101/gr.087775.108>.
- [107] M. Carmo-Fonseca, J. Rino, RNA seeds nuclear bodies, *Nat. Cell Biol.* (2011).
<https://doi.org/10.1038/ncb0211-110>.
- [108] T. Naganuma, T. Hirose, Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs, *RNA Biol.* (2013). <https://doi.org/10.4161/rna.23547>.
- [109] J.E. Wilusz, C.K. InBaptiste, L.Y. Lu, C.-D. Kuhn, L. Joshua-Tor, P.A. Sharp, A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails., *Genes Dev.* 26 (2012) 2392–407. <https://doi.org/10.1101/gad.204438.112>.
- [110] S. Nakagawa, T. Naganuma, G. Shioi, T. Hirose, Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice., *J. Cell Biol.* 193 (2011) 31–9.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201011110>.
- [111] S.P. Shevtsov, M. Dundr, Nucleation of nuclear bodies by RNA., *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 167–73. <https://doi.org/10.1038/ncb2157>.
- [112] R. Li, A.R. Harvey, S.I. Hodgetts, A.H. Fox, Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localization of the NEAT1-1 isoform outside paraspeckles, *RNA.* (2017). <https://doi.org/10.1261/rna.059477.116>.
- [113] G. Pierron, S. Souquere, G. Beauclair, F. Harper, A. Fox, Highly Ordered Spatial Organization of the Structural Long Noncoding NEAT1 RNAs within Paraspeckle Nuclear Bodies, *Mol. Biol. Cell.* (2010). <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0690>.
- [114] J.A. West, M. Mito, S. Kurosaka, T. Takumi, C. Tanegashima, T. Chujo, K. Yanaka, R.E. Kingston, T. Hirose, C. Bond, A. Fox, S. Nakagawa, Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization, *J. Cell Biol.* (2016).
<https://doi.org/10.1083/jcb.201601071>.
- [115] L.L. Chen, J.N. DeCerto, G.G. Carmichael, Alu element-mediated gene silencing, *EMBO J.* (2008). <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.94>.
- [116] K. Nishikura, Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases, *Annu. Rev. Biochem.* (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-105251>.
- [117] Z. Zhang, G.G. Carmichael, The fate of dsRNA in the Nucleus: A p54nrb-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs, *Cell.* (2001). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00466-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00466-4).
- [118] T. Hirose, G. Virnicchi, A. Tanigawa, T. Naganuma, R. Li, H. Kimura, T. Yokoi, S.

- Nakagawa, M. Bénard, A.H. Fox, G. Pierron, NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies, *Mol. Biol. Cell.* 25 (2014) 169–183. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0558>.
- [119] K. Imamura, N. Imamachi, G. Akizuki, M. Kumakura, A. Kawaguchi, K. Nagata, A. Kato, Y. Kawaguchi, H. Sato, M. Yoneda, C. Kai, T. Yada, Y. Suzuki, T. Yamada, T. Ozawa, K. Kaneki, T. Inoue, M. Kobayashi, T. Kodama, Y. Wada, K. Sekimizu, N. Akimitsu, Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli, *Mol. Cell.* 53 (2014) 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.009>.
- [120] C. Jin, X. Peng, T. Xie, X. Lu, F. Liu, H. Wu, Z. Yang, J. Wang, L. Cheng, N. Wu, Detection of the long noncoding RNAs nuclear-enriched autosomal transcript 1 (NEAT1) and metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 in the peripheral blood of HIV-1-infected patients, *HIV Med.* (2016). <https://doi.org/10.1111/hiv.12276>.
- [121] Q. Zhang, C.Y. Chen, V.S.R.K. Yedavalli, K.T. Jeang, NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression, *MBio.* (2013). <https://doi.org/10.1128/mBio.00596-12>.
- [122] S. Naji, G. Ambrus, P. Cimermančič, J.R. Reyes, J.R. Johnson, R. Filbrandt, M.D. Huber, P. Vesely, N.J. Krogan, J.R. Yates, A.C. Saphire, L. Gerace, Host Cell Interactome of HIV-1 Rev Includes RNA Helicases Involved in Multiple Facets of Virus Production, *Mol. Cell. Proteomics.* (2012). <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.015313>.
- [123] P. Yadav, S. Sur, D. Desai, S. Kulkarni, V. Sharma, V. Tandon, Interaction of HIV-1 integrase with polypyrimidine tract binding protein and associated splicing factor (PSF) and its impact on HIV-1 replication, *Retrovirology.* 16 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0474-1>.
- [124] C. St. Gelais, J. Roger, L. Wu, Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein Negatively Regulates HIV-1 Infection in CD4+ T Cells, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 31 (2015) 806–816. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0313>.
- [125] A.S. Zolotukhin, D. Michalowski, J. Bear, S. V Smulevitch, A.M. Traish, R. Peng, J. Patton, I.N. Shatsky, B.K. Felber, PSF acts through the human immunodeficiency virus type 1 mRNA instability elements to regulate virus expression., *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 6618–30. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.18.6618>.
- [126] A. Kula, L. Gharu, A. Marcello, HIV-1 pre-mRNA commitment to Rev mediated export through PSF and Matrin 3, *Virology.* 435 (2013) 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.032>.
- [127] G. Singh, B.D. Rife, B. Seufzer, M. Salemi, A. Rendahl, K. Boris-Lawrie, Identification

- of conserved, primary sequence motifs that direct retrovirus RNA fate., *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 7366–7378. <https://doi.org/10.1093/nar/gky369>.
- [128] H. Liu, P.W. Hu, J. Couturier, D.E. Lewis, A.P. Rice, HIV-1 replication in CD4⁺ T cells exploits the down-regulation of antiviral NEAT1 long non-coding RNAs following T cell activation, *Virology*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.020>.
- [129] L. Sharmeen, B. Bass, N. Sonenberg, H. Weintraub, M. Groudine, Tat-dependent adenosine-to-inosine modification of wild-type transactivation response RNA., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991) 8096–8100. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8096>.
- [130] A. Phuphuakrat, R. Kraiwong, C. Boonarkart, D. Lauhakirti, T.-H. Lee, P. Auewarakul, Double-Stranded RNA Adenosine Deaminases Enhance Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proteins, *J. Virol.* 82 (2008) 10864–10872. <https://doi.org/10.1128/jvi.00238-08>.
- [131] M. Doria, F. Neri, A. Gallo, M.G. Farace, A. Michienzi, Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection, *Nucleic Acids Res.* (2009). <https://doi.org/10.1093/nar/gkp604>.
- [132] A. Zotova, A. Pichugin, A. Atemasova, E. Knyazhanskaya, E. Lopatukhina, N. Mitkin, E. Holmuamedov, M. Gottikh, D. Kuprash, A. Filatov, D. Mazurov, Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags., *Sci. Rep.* 9 (2019) 3132. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40219-z>.
- [133] J.J.J. Leahy, B.T. Golding, R.J. Griffin, I.R. Hardcastle, C. Richardson, L. Rigoreau, G.C.M. Smith, Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 6083–6087. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.09.060>.
- [134] C. Isel, J. Karn, Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation, *J. Mol. Biol.* 290 (1999) 929–941. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2933>.
- [135] Y.K. Kim, C.F. Bourgeois, C. Isel, M.J. Churcher, J. Karn, Phosphorylation of the RNA Polymerase II Carboxyl-Terminal Domain by CDK9 Is Directly Responsible for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-Activated Transcriptional Elongation, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 4622–4637. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.13.4622-4637.2002>.
- [136] Y. Garcia-Mesa, T.R. Jay, M.A. Checkley, B. Luttge, C. Dobrowolski, S. Valadkhan, G.E. Landreth, J. Karn, D. Alvarez-Carbonell, immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system, *J. Neurovirol.* 23 (2017) 47–66. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0499-3>.
- [137] W. Kaczmarek, S.A. Khan, Lupus Autoantigen Ku Protein Binds Hiv-1 TAR RNA in

vitro.Pdf, Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 935–942.

- [138] N.S.Y. Ting, Y. Yu, B. Pohorelic, S.P. Lees-Miller, T.L. Beattie, Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase., *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 2090–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gki342>.
- [139] A. Lamaa, M. Le Bras, N. Skuli, S. Britton, P. Frit, P. Calsou, H. Prats, A. Cammas, S. Millevoi, A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p 53 mRNA translation and function, 17 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.15252/embr.201541181>.
- [140] L.A. Hanakahi, 2-Step purification of the Ku DNA repair protein expressed in Escherichia coli, *Protein Expr. Purif.* 52 (2007) 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.10.002>.
- [141] A.N. Anisenko, E.S. Knyazhanskaya, T.S. Zatsepin, M.B. Gottikh, Human Ku70 protein binds hairpin RNA and double stranded DNA through two different sites, *Biochimie.* 132 (2017) 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.001>.
- [142] О.А. Шадрина, Е.С. Княжанская, С.П. Королев, Оптимизация методики получения человеческого белка Ку в ESCHERICHIA COLI, *Universum Химия и Биология Электрон. Научн. Журн.* 10 (2016). <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/3733>.
- [143] А.В. Иванов, Экспрессия генов белков NS5B и NS5A вируса гепатита с. Ингибиторный анализ и белок-белковое взаимодействие, *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта*, 2006.
- [144] A. V. Ivanov, A.N. Korovina, V.L. Tunitskaya, D.A. Kostyuk, V.O. Rechinsky, M.K. Kukhanova, S.N. Kochetkov, Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins, *Protein Expr. Purif.* 48 (2006) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>.
- [145] I.A. Osterman, S.A. Evfratov, P. V Sergiev, O.A. Dontsova, Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation., *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 474–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gks989>.
- [146] S. Paillard, F. Strauss, Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA., *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5619–24. <https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5619>.
- [147] J.A. Downs, S.P. Jackson, A means to a DNA end: the many roles of Ku., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 367–78. <https://doi.org/10.1038/nrm1367>.
- [148] R. Hill, P.W.K. Lee, The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet?, *Cell Cycle.* 9 (2010) 3460–3469. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.13043>.
- [149] S.-H. Lee, C.-H. Kim, DNA-dependent Protein Kinase Complex: a Multifunctional Protein in DNA Repair and Damage Checkpoint, *Mol. Cells.* 13 (n.d.) 159–166.

<http://www.molcells.org/journal/view.html?year=2002&volume=13&number=2&spage=159> (accessed July 8, 2019).

- [150] A.B. Dalby, K.J. Goodrich, J.S. Pflingsten, T.R. Cech, RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer., *RNA*. 19 (2013) 841–51.
<https://doi.org/10.1261/rna.038703.113>.
- [151] J.S. Pflingsten, K.J. Goodrich, C. Taabazuing, F. Ouenzar, P. Chartrand, T.R. Cech, Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model., *Cell*. 148 (2012) 922–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.033>.
- [152] H. Chen, J. Xue, D. Churikov, E.P. Hass, S. Shi, L.D. Lemon, P. Luciano, A.A. Bertuch, D.C. Zappulla, V. Géli, J. Wu, M. Lei, Structural Insights into Yeast Telomerase Recruitment to Telomeres, *Cell*. 172 (2018) 331–343.e13.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.008>.
- [153] T. Mizutani, A. Ishizaka, Y. Suzuki, H. Iba, 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex is recruited to the HIV-1 promoter via short viral transcripts, *FEBS Lett*. 588 (2014) 1630–1636. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.067>.
- [154] M.A. Durney, V.M. D’Souza, Preformed protein-binding motifs in 7SK snRNA: structural and thermodynamic comparisons with retroviral TAR., *J. Mol. Biol*. 404 (2010) 555–67. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.042>.
- [155] S.C. Sedore, S.A. Byers, S. Biglione, J.P. Price, W.J. Maury, D.H. Price, Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: Recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR, *Nucleic Acids Res*. 35 (2007) 4347–4358.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm443>.
- [156] G. Diribarne, O. Bensaude, 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor, *RNA Biol*. 6 (2009) 122–128. <https://doi.org/10.4161/rna.6.2.8115>.
- [157] H. Liu, C.H. Herrmann, K. Chiang, T.-L. Sung, S.-H. Moon, L.A. Donehower, A.P. Rice, 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair., *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 397 (2010) 245–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.092>.
- [158] D. Martinez-Zapien, J.M. Saliou, X. Han, C. Atmanene, F. Proux, S. Cianférani, A.C. Dock-Bregeon, Intermolecular recognition of the non-coding RNA 7SK and HEXIM protein in perspective, *Biochimie*. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.020>.
- [159] Y.K. Kim, C.F. Bourgeois, R. Pearson, M. Tyagi, M.J. West, J. Wong, S.Y. Wu, C.M. Chiang, J. Karn, Recruitment of TFIIH to the HIV LTR is a rate-limiting step in the emergence of HIV from latency, *EMBO J*. 25 (2006) 3596–3604.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601248>.
- [160] A.P. Rice, The HIV-1 Tat Protein: Mechanism of Action and Target for HIV-1 Cure

- Strategies, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017).
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170704130635>.
- [161] G. Mousseau, S.T. Valente, Role of Host Factors on the Regulation of Tat-Mediated HIV-1 Transcription, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 4079–4090.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170622104355>.
- [162] V. Le Douce, L. Colin, L. Redel, T. Cherrier, G. Herbein, D. Aunis, O. Rohr, C. Van Lint, C. Schwartz, LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 1904–1915. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr857>.
- [163] I.H. Solomon, S. Chettimada, V. Misra, D.R. Lorenz, R.J. Gorelick, B.B. Gelman, S. Morgello, D. Gabuzda, White Matter Abnormalities Linked to Interferon, Stress Response, and Energy Metabolism Gene Expression Changes in Older HIV-Positive Patients on Antiretroviral Therapy, *Mol. Neurobiol.* 57 (2020) 1115–1130.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01795-3>.
- [164] A. Henderson, A. Holloway, R. Reeves, D.J. Tremethick, Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter., *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 389–97.
<https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.389>.
- [165] R. König, Y. Zhou, D. Elleder, T.L. Diamond, G.M.C. Bonamy, J.T. Irelan, C. yuan Chiang, B.P. Tu, P.D. De Jesus, C.E. Lilley, S. Seidel, A.M. Opaluch, J.S. Caldwell, M.D. Weitzman, K.L. Kuhen, S. Bandyopadhyay, T. Ideker, A.P. Orth, L.J. Miraglia, F.D. Bushman, J.A. Young, S.K. Chanda, Global Analysis of Host-Pathogen Interactions that Regulate Early-Stage HIV-1 Replication, *Cell.* 135 (2008) 49–60.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.032>.
- [166] Y. Liu, M.R. Nonnemacher, B. Wigdahl, CCAAT/enhancer-binding proteins and the pathogenesis of retrovirus infection, *Future Microbiol.* 4 (2009) 299–321.
<https://doi.org/10.2217/fmb.09.4>.
- [167] S. Shah, A. Alexaki, V. Pirrone, S. Dahiya, M.R. Nonnemacher, B. Wigdahl, Functional properties of the HIV-1 long terminal repeat containing single-nucleotide polymorphisms in Sp site III and CCAAT/enhancer binding protein site i, *Virol. J.* 11 (2014).
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-92>.
- [168] S. Dahiya, Y. Liu, M.R. Nonnemacher, W. Dampier, B. Wigdahl, CCAAT enhancer binding protein and nuclear factor of activated T cells regulate HIV-1 LTR via a novel conserved downstream site in cells of the monocyte-macrophage lineage, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088116>.
- [169] H.L. Ross, S. Gartner, J.C. McArthur, J.R. Corboy, J.J. McAllister, S. Millhouse, B. Wigdahl, HIV-1 LTR C/EBP binding site sequence configurations preferentially

- encountered in brain lead to enhanced C/EBP factor binding and increased LTR-specific activity, *J. Neurovirol.* 7 (2001) 235–249. <https://doi.org/10.1080/13550280152403281>.
- [170] A.J. Henderson, R.I. Connor, K.L. Calame, C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines, *Immunity.* 5 (1996) 91–101. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80313-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80313-1).
- [171] C. Ambrosino, C. Palmieri, A. Puca, F. Trimboli, M. Schiavone, F. Olimpico, M.R. Ruocco, F. Di Leva, M. Toriello, I. Quinto, S. Venuta, G. Scala, Physical and functional interaction of HIV-1 Tat with E2F-4, a transcriptional regulator of mammalian cell cycle, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31448–31458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112398200>.
- [172] M.F. Kagnoff, K.A. Roebuck, Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and expression in intestinal epithelial cells: Role of protein kinase A and C pathways in HIV- 1 transcription, in: *J. Infect. Dis., J Infect Dis*, 1999. <https://doi.org/10.1086/314801>.
- [173] B. AL, D. DM, B. Y, Y. N, E. A, X. RJ, L. J, E. SJ, Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen, *Science.* 319 (2008). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1152725>.
- [174] L. L, O. NM, C. KM, P. C, D. H, B. AM, B. V, B. DH, B. CL, D. MT, M. A, A whole genome screen for HIV restriction factors, *Retrovirology.* 8 (2011). <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-94>.
- [175] J. Pandhare, S. Dash, B. Jones, F. Villalta, C. Dash, A novel role of proline oxidase in HIV-1 envelope glycoprotein-induced neuronal autophagy, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 25439–25451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652776>.
- [176] S.H. Ou, L.F. Garcia-Martínez, E.J. Paulssen, R.B. Gaynor, Role of flanking E box motifs in human immunodeficiency virus type 1 TATA element function., *J. Virol.* 68 (1994) 7188–7199. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7188-7199.1994>.
- [177] K. Imai, T. Okamoto, Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 12495–12505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511773200>.
- [178] A. Ruiz, E. Pauls, R. Badia, E. Riveira-Muñoz, B.C.E. Bailana, J.A. Esté, Characterization of the influence of mediator complex in HIV-1 transcription, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 27665–27676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570341>.
- [179] H. Zhou, M. Xu, Q. Huang, A.T. Gates, X.D. Zhang, J.C. Castle, E. Stec, M. Ferrer, B. Strulovici, D.J. Hazuda, A.S. Espeseth, Genome-Scale RNAi Screen for Host Factors Required for HIV Replication, *Cell Host Microbe.* 4 (2008) 495–504. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.004>.
- [180] A. Teixeira, B. Yen, G.L. Gusella, A.G. Thomas, M.P. Mullen, J. Aberg, X. Chen, Y.

- Hoshida, H. Van Bakel, E. Schadt, C.F. Basler, A. García-Sastre, A. Mosoian, Prothymosin α variants isolated from CD8⁺ T cells and cervicovaginal fluid suppress HIV-1 replication through type I interferon induction, *J. Infect. Dis.* 211 (2015) 1467–1475. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu643>.
- [181] S. Kubota, Y. Adachi, T.D. Copeland, S. Oroszlan, Binding of Human Prothymosin α to the Leucine-Motif/activation Domains of HTLV-I Rex and HIV-1 Rev, *Eur. J. Biochem.* 233 (1995) 48–54. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.048_1.x.

Дополнительные материалы

Приложение 1. Гены, ассоциированные с регуляцией транскрипции, дифференциально экспрессируемые в клетках НЕК 293Т при нокауте Ku70 и Ku80: изменение уровней и значение p-value в клетках с моноаллельным нокаутом Ku70, Ku80 или DNA-PKcs

Символ	Название	Изменение в Cr_KO Ku70	p-value (Adj) для Cr_KO Ku70	Изменени е в Cr_KO Ku80	p-value (Adj) для Cr_KO Ku80	Изменение в Cr_KO DNA- PKcs	p-value (Adj) для Cr_KO DNA-PKcs
XBP1	X-box-binding protein 1 (XBP-1)	0,52	9,45E-21	0,79	0,038	0,98	0,999
ATF3	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3	0,55	1,12E-16	0,74	0,004	0,8	0,165
TRIM56	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	0,55	4,27E-11	0,39	4,35E-19	0,74	0,033
ZNF469	Zinc finger protein 469	0,56	0,001	0,59	0,001	0,76	0,267
RUNX1T1	Protein CBFA2T1	0,58	2,06E-08	1,35	0,013	1,2	0,65
TRIM66	Tripartite motif-containing protein 66	0,59	1,3E-08	0,76	0,038	0,96	0,999
CEBPG	CCAAT/enhancer-binding protein gamma (C/EBP gamma)	0,67	9,5E-09	0,76	0,009	0,91	0,999
ZNF518A	Zinc finger protein 518A	0,76	5,3E-04	0,69	0,001	0,83	0,656
TOB1	Protein Tob1	1,24	0,023	1,43	0,002	1,23	0,455
TNRC18	trinucleotide repeat containing 18	1,42	3,8E-13	1,23	0,018	1,11	0,999
GRWD1	glutamate rich WD repeat containing 1	1,42	1,19E-07	1,27	0,046	1,12	0,999
ADRM1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	1,43	3,13E-06	1,32	0,024	1,10	0,999
E2F4	E2F transcription factor 4	1,50	1,46E-10	1,27	0,024	1,11	0,999
SETD1A	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1A	1,50	9,57E-18	1,27	0,001	1,18	0,295
DEK	DEK proto-oncogene	1,58	7,97E-19	1,26	0,003	1,11	0,999
HIST1H1C	Histone H1.2	1,60	2,91E-25	1,19	0,041	1,14	0,538
MYBBP1A	MYB binding protein 1a	1,65	4,28E-26	1,28	0,001	1,19	0,131
JUND	JunD proto-oncogene%2C AP-1 transcription factor subunit	1,65	2,94E-24	1,35	3,7E-04	1,10	0,999
RNF187	E3 ubiquitin-protein ligase RNF187	1,66	9,72E-27	1,26	0,003	1,09	0,999
HIST1H1E	Histone H1.4	2,05	3,03E-65	1,33	2,51E-05	1,22	0,188
HIST1H2AH	Histone H2A type 1-H	2,60	1,39E-58	1,36	0,003	1,22	0,335

