

МГУ имени М.В. Ломоносова

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

№ госрегистрации
АААА-А17-117120820044-4

УТВЕРЖДАЮ
Директор/декан

«__» _____ Г.

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

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Структура и функции биологических макромолекул и макромолекулярных
комплексов. Биокатализ.

по теме:

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

Зам. директора/декана
по научной работе

«__» _____ Г.

Руководитель темы
Готтих М.Б.

«__» _____ Г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы:

заведующий отделом, доктор
химических наук, профессор
по специальности

_____ (Готтих М.Б.)

Исполнители темы:

ведущий научный сотрудник,
кандидат химических наук, до-
цент/с.н.с. по специальности

_____ (Друца В.Л.)

ведущий специалист

_____ (Елкина Д.А.)

ведущий научный сотрудник,
кандидат химических наук

_____ (Королев С.П.)

главный научный сотрудник,
доктор химических наук, про-
фессор по специальности

_____ (Кубарева Е.А.)

инженер 1-ой категории

_____ (Мальцева Л.В.)

ведущий научный сотрудник,
доктор химических наук, про-
фессор по кафедре

_____ (Монахова М.В.)

старший научный сотрудник,
кандидат химических наук

_____ (Орецкая Т.С.)

_____ (Романова Е.А.)

РЕФЕРАТ

Ключевые слова:

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

Ключевые слова по-английски:

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

Участие клеточного белка Ku в репликации ВИЧ-1 было показано в нескольких работах, однако стадию жизненного цикла вируса, на которую он влияет, долгое время не удавалось установить. Несколько лет назад нами было достоверно показано, что Ku участвует в репарации повреждений ДНК, возникающих в процессе интеграции вирусной ДНК в клеточный геном. Причем в этой пост-интеграционной репарации Ku участвует в составе холофермента DNA-PK (ДНК-зависимая протеинкиназа), основной функцией которого в клетке является репарации двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов (NHEJ). Транскрипция с вирусного промотора начинается только после успешной пост-интеграционной репарации. Нам было необходимо выяснить, принимает ли Ku участие и в этом процессе. За отчетный период впервые проведено систематическое исследование влияния каждой из субъединиц Ku (Ku70 и Ku80), а также каталитической субъединицы DNA-PKcs на уровень транскрипции с промотора ВИЧ-1. На репортерной системе и на уже интегрированном провирусе показано, что гетеродимер Ku является положительным фактором транскрипции, а каталитическая субъединица DNA-PKcs не влияет на экспрессию с промотора ВИЧ-1. Впервые обнаружено привлечение гетеродимера Ku к промотору ВИЧ-1 на плазмидном векторе и на уже интегрированном провирусе. Впервые установлено, что Ku важен для стадии инициации транскрипции. Проведено исследование РНК-связывающих свойств гетеродимера Ku человека. Показано, что Ku предпочтительно взаимодействует со шпильчатыми 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 мяРНК: HEXIM1 и Cdk9, и, возможно, именно это взаимодействие определяет привлечение Ku на промотор ВИЧ-1.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на эффективность антиретровирусных препаратов (АРТ), наличие клеток-резервуаров ВИЧ, в которых не происходит активной транскрипции интегрированного вирусного генома, позволяет вирусу избежать действия терапии. Исследование молекулярных механизмов активации транскрипции и выяснение роли конкретных клеточных белков в этом процессе является важной проблемой молекулярной биологии и вирусологии. Решение этой проблемы позволит предложить новые мишени для АРТ, а также разработать подходы к активации транскрипции с промотора ВИЧ, для того, чтобы сделать клетки, содержащие «молчащий» провирус доступными для воздействия АРТ и действия иммунной системы организма. Одним из клеточных белков, изменение уровня которого в клетке влияет на эффективность транскрипции с промотора ВИЧ-1, является гетеродимерный белок Ku - ДНК-связывающий компонент ДНК-зависимой протеин-киназы (DNA-PK). Показано, что в ядре клетки белок Ku колокализуется с сайтами элонгации транскрипции РНК полимеразы II и взаимодействует с ее элонгационной формой. Есть данные о том, что *in vitro* DNA-PK может фосфорилировать РНК полимеразу II. Однако достоверный механизм воздействия гетеродимера Ku на транскрипцию с интегрированного провируса и возможность участия этого белка в активации транскрипции при реактивации провируса не известен.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Впервые проведено систематическое исследование влияния белка Ku, который является гетеродимером и состоит из субъединиц Ku70 и Ku80, на процесс транскрипции с LTR промотора ВИЧ-1. С использованием системы векторов, кодирующих репортерный белок – люциферазу светлячка – под контролем промотора ВИЧ-1, а также для сравнения – контрольных промоторов, проверено, как отдельные субъединицы белка Ku влияют на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Установлено, что снижение уровня Ku70 и Ku80 в клетке с помощью соответствующих миРНК приводит к падению экспрессии люциферазы с LTR промотора примерно вдвое, а повышение уровня обеих субъединиц Ku путем их суперэкспрессии в равной степени активирует экспрессию люциферазы с этого промотора, причем этот эффект является дозозависимым. 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. При этом важно, что изменение уровня субъединиц Ku70 и Ku80 крайне слабо влияло на транскрипцию с контрольных промоторов: CMV, TK, PGK. Таким образом, впервые установлено, что Ku является положительным фактором транскрипции с промотора LTR ВИЧ-1, причем это влияние специфично связано именно с LTR промотором. Проверка влияния на экспрессию люциферазы каталитической субъединицы DNA-PKcs показало, что для всех тестируемых промоторов снижение уровня и ингибирование DNA-PKcs оказывали лишь незначительный неспецифичный положительный эффект. Таким образом, DNA-PKcs не участвует в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1. Аналогичные результаты были получены также на интегрированном репликативно-некомпетентном провирусе в микроглиальных клетках человека HC69.5, что позволило нам достоверно утверждать, что именно гетеродимер Ku70/Ku80 является положительным фактором транскрипции с интегрированного провируса. Важно было выяснить также, влияет ли Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 при первичном акте заражения клетки. Учитывая, что изменение внутриклеточного уровня Ku существенно влияет на эффективность постинтеграционной репарации (Anisenko et al., *Scientific reports*, 2017, 7:5649; Knyazhanskaya et al., *Retrovirology*, 2019, 16(1):30), а транскрипция происходит только после репарации повреждений, возникающих при интеграции вирусной кДНК в геном клетки, просто используя клетки с пониженным/повышенным уровнем Ku, невозможно оценить его влияние только на одну стадию репликации. Был разработан новый подход, который позволит изучать влияние Ku на отдельные этапы репликации ВИЧ-1, для чего была получена уникальная клеточная линия HEK 293T-Ku70-AID-osTIR1, в геном которой интегрирован растительный белок osTIR1 под промотором, транскрипция с которого индуцируется при добавлении доксициклина, а ген эндогенного белка Ku70 модифицирован таким образом, что с него синтезируется белок Ku, содержащий на С-конце укороченный вариант ауксин-индуцибельного дегрона (Ku70-AID). Белки, содержащие такой дегрон, подвергаются быстрой протеолитической деградации в клетке при добавлении растительного гормона ауксина (Капитонова и др., *Молекулярная биология*. 2021, 55(4), 543). Анализ кинетики деградации белка Ku70 и восстановления его уровня в клеточной линии HEK 293T-Ku70-AID-osTIR1

при добавлении доксициклина и ауксина показал, что уже через 2 ч в лизатах клеток детектируется белок osTIR1, уровень которого увеличивается после индукции и достигает максимума через 24 ч. Постепенное снижение уровня Ku70 в клетке начинается уже спустя 6 ч после добавления ауксина, через 16 ч уровень Ku70 оказался понижен на 65%. Поддержание пониженного уровня Ku70-AID продолжается на протяжении всего времени, пока в среде присутствуют индукторы. Удаление индукторов из среды приводит к снижению концентрации osTIR1 на 70% за первые 20 часов, при этом уровень Ku70 начинает восстанавливаться через 24 ч после замены среды с индукторами и через 35-40 ч достигает уровня этого белка в необработанных клетках. Для сравнения проведен анализ кинетики деградации белка Ku70 в клетках линии 293Т при обработке специфичными миРНК, который показал, что снижение уровня Ku70 на 60% наблюдается только через 48 ч после трансфекции и его уровень не восстанавливается в течение следующих 96 ч. Таким образом, разработанная система ауксин-индуцибельной деградации белка Ku70 позволяет быстрее снижать и восстанавливать его уровень. В полученной клеточной линии удалось исследовать влияние уровня белка Ku70 на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Для трансдукции использовали два лентивирусных вектора: pNL4-3.Luc.R-E-, в котором люцифераза находится под контролем LTR промотора, зависящего от Ku70, и pCMV, где люцифераза под контролем CMV промотора, на транскрипцию с которого Ku70 влияния не оказывает. Определена кинетика стадий интеграции, пост-интеграционной репарации и транскрипции при трансдукции клеток лентивирусным вектором pNL4-3.Luc.R-E- с использованием метода Alu-специфичного ПЦР и его модифицированного варианта. Показано, что независимо от вектора, начало экспрессии люциферазы по времени совпадает с появлением в клетках полностью репарированной ДНК. Для оценки влияния уровня белка Ku70 на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 при трансдукции клеточной линии НЕК 293Т-Ku70-AID-osTIR1 псевдовirusами на основе обоих лентивирусных векторов варьировали время добавления индукторов: доксициклина и ауксина. Установлено, что Ku70 влияет на пост-интеграционную репарацию в случае обоих псевдовirusов и на транскрипцию с LTR промотора в лентивирусном векторе pNL4-3.Luc.R-E-. С целью поиска механизма влияния Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1, мы проверили, ассоциирован ли гетеродимер с вирусным промотором. Для этого провели иммунопреципитацию хроматина на клетках линии НЕК 293Т, трансфицированных репортерным вектором pGL-LTR-HIV, и на микроглиальных клетках человека HC69.5, несущих интегрированный репликативно-некомпетентный провирус. Было установлено, что Ku ассоциирован с промотором ВИЧ-1 и в плазмидной ДНК, и в уже интегрированном латентном провирuse. Помимо этого, были исследованы РНК-связывающие свойства гетеродимера Ku человека. Показано, что Ku предпочтительно взаимодействует со шпилечными РНК, содержащими выпетливание около G-богатой терминальной петли шпильки. Показано, что РНК связывается с Ku в его ДНК-связывающем сайте. Кроме того, впервые *in vitro* и в клеточной культуре обнаружено взаимодействие Ku с 7SK РНК – важным регулятором транскрипции ВИЧ-1. Показано, что Ku предпочтительно взаимодействует с первой консервативной шпилькой 7SK РНК. Обнаружено, что Ku взаимодействует с белками комплекса 7SK мРНК: HEXIM1 и Cdk9, и, возможно, именно это взаимодействие определяет привлечение Ku на промотор ВИЧ-1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За отчетный период впервые установлено, что суперэкспрессия белка SFPQ приводит к повышению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1 в клеточной линии НЕК 293Т. 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. Показано, что каталитическая субъединица DNA-PKcs не оказывает влияния на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Получен препарат рекомбинантного белка His-Ku70/Ku80 и охарактеризованы его РНК-связывающие свойства. 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. 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
Объем финансирования темы в 2022 году
Таблица А.1

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