

## ПОСТИНТЕГРАЦИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ВИЧ-1 СОПРЯЖЕНА С АКТИВАЦИЕЙ КЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ DNA-ПК И АТМ И ФОСФОРИЛОВАНИЕМ ИХ МИШЕНЕЙ

© 2024 А.Н. Анисенко<sup>1,2,3\*</sup>, А.А. Нефедова<sup>3</sup>, И.И. Киреев<sup>2</sup>, М.Б. Готтих<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: a\_anisenko@mail.ru

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2024

После доработки 18.04.2024

Принята к публикации 25.04.2024

Интеграция ДНК копии генома ВИЧ-1 в клеточный геном приводит к появлению в нем ряда повреждений, репарация которых абсолютно необходима для успешной репликации вируса. Ранее мы показали, что клеточные протеинкиназы АТМ и DNA-ПК, которые в норме обеспечивают репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, важны для инициации процесса постинтеграционной репарации ВИЧ-1, несмотря на то что в результате интеграции не образуются двуцепочечные разрывы ДНК. В данной работе мы проанализировали изменение статуса фосфорилирования киназ АТМ (pSer1981), DNA-ПК (pSer2056) и родственной им киназы АТР (pSer428), а также их мишеней: Chk1 (pSer345), Chk2 (pThr68), H2AX (pSer139) и p53 (pSer15), в процессе постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Мы показали, что АТМ и DNA-ПК, но не АТР, автофосфорилируются в ходе постинтеграционной репарации, а также фосфорилируют белки-мишени Chk2 и H2AX, что указывает на общность механизмов сигналинга при репарации двуцепочечных разрывов ДНК и постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ВИЧ-1, DNA-ПК, АТМ, протеинкиназы, репарация ДНК, постинтеграционная репарация.

DOI: 10.31857/S0320972524060113 EDN: XLBUOU

### ВВЕДЕНИЕ

Жизненный цикл вируса иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) – сложный многостадийный процесс, направленный на встраивание вирусного генетического материала в геном клетки и продукцию новых вирионов. На первых этапах после проникновения вируса в клетку его РНК-геном переводится в форму двуцепочечной ДНК (кДНК) под действием вирусного фермента – обратной транскриптазы. Эта кДНК в комплексе с другим важным вирусным ферментом – интегразой – транспортируется в ядро, где интеграз

катализирует встраивание кДНК в геном клетки. Этот процесс, называемый интеграцией, приводит к появлению повреждений клеточной ДНК в местах встраивания вирусной кДНК: пятинуклеотидных одноцепочечных участков, расположенных по краям от встроеной кДНК, а также неспаренных динуклеотидов CA на 5'-концах кДНК [1–3].

Эти повреждения должны быть исправлены для того, чтобы завершить интеграцию, восстановить целостность генома и обеспечить репликацию вируса [4]. Процесс исправления повреждений и восстановления целостности генома получил название постинтеграционной репара-

Принятые сокращения: кДНК – ДНК копия генома ВИЧ-1; ПИР – постинтеграционная репарация; АТМ – мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок; АТР – атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок; Chk1 и Chk2 – киназы 1 и 2 контрольной точки; DNA-ПК – ДНК-зависимая протеинкиназа, DNA-ПКcs – каталитическая субъединица DNA-ПК; HR – гомологичная рекомбинация; NHEJ – процесс негомологичного соединения концов.

\* Адресат для корреспонденции.

ции (ПИР). Известно, что основную роль в ПИР играют клеточные белки [4–6], однако точный механизм этого процесса не удалось установить до сих пор, как и не удалось прийти к консенсусу в вопросе, какие именно клеточные белки обеспечивают восстановление целостности поврежденной ДНК.

В начале 2000-х годов стали появляться указания на возможное участие протеинкиназ из семейства PIKK – ключевых регуляторов репарации двуцепочечных разрывов в ДНК – в репликации ВИЧ-1. К таким участникам относятся ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK), сформированная белками Ku70, Ku80 и каталитической субъединицей DNA-PK (DNA-PKcs), и мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) [7–10]. Однако вопрос о том, в каком именно этапе жизненного цикла вируса эти белки принимают участие, оставался открытым. В частности, вызвала сомнения возможность участия этих белков в процессе ПИР, поскольку в результате интеграции возникают одноцепочечные бреши в ДНК, но не образование двуцепочечных разрывов. Тем не менее нам удалось показать, что клеточные белки Ku70, Ku80, DNA-PKcs и ATM участвуют в процессе ПИР, причем к местам повреждений ДНК, вызванных интеграцией, эти белки привлекаются за счет образования комплекса между интегразой ВИЧ-1 и белком Ku70, входящим в состав DNA-PK [11, 12]. Ингибиторы фосфорилирующей активности как DNA-PK, так и ATM подавляли вирусную репликацию, действуя именно на этапе постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [11, 12]. Это позволило сделать вывод, что обе протеинкиназы, DNA-PK и ATM, активируются в результате взаимодействия с интегразой и запускают тем самым процессы репарации ДНК и регуляции клеточного цикла. Однако до сих пор не известно, какие именно мишени этих киназ фосфорилируются в ходе ПИР и насколько этот процесс в целом напоминает репарацию двуцепочечных разрывов ДНК.

В настоящем исследовании мы оценили, фосфорилируются ли стандартные мишени клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК, инициируемого протеинкиназами ATM и DNA-PK, в ходе ПИР ВИЧ-1. Параллельно было проанализировано, происходит ли фосфорилирование третьей протеинкиназы из семейства PIKK – ATR (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок; ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein) и ее основной мишени, Chk1. Эта киназа инициирует репарацию одноцепочечных разрывов в ДНК, например, при остановке репликативной вилки, но не участвует в процессе ПИР. Таким образом, мы оценили накопление фосфорилированных форм самих протеинкиназ: pSer2056-DNA-PKcs,

pSer1981-ATM и pSer428-ATR, а также их наиболее распространенных мишеней: pSer345-Chk1, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX и pSer15-p53, в ответ на трансдукцию клеток лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. Установлено, что протеинкиназа ATR, как и ее мишень, киназа 1 контрольной точки (Chk1), практически не модифицируются в ходе ПИР, в то время как ATM и DNA-PKcs подвергаются автофосфорилированию. Фосфорилируются также по указанным выше сайтам все протестированные мишени ATM и DNA-PK: Chk2, H2AX и p53. Важно, что фосфорилирование ATM, DNA-PKcs, киназы 2 контрольной точки (Chk2) и гистона H2AX происходит только в случае успешной интеграции и последующего образования комплекса интегразы с Ku70, а фосфорилирование p53 не связано с интеграцией и происходит в ответ на накопление линейной формы кДНК ВИЧ-1. Нам также удалось впервые показать, что фосфорилированный гистон H2AX образует в ядрах трансдуцированных клеток локусы, типичные для процесса репарации двуцепочечных разрывов в ДНК, причем их количество и средняя интенсивность флуоресценции локусов напрямую отражают эффективность протекания ПИР и могут использоваться в качестве маркера эффективности этого процесса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток и наработка VSV-G псевдотипированных репликативно-некомпетентных векторов на основе генома ВИЧ-1.** Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Для наработки VSV-G псевдотипированных репликативно-некомпетентных лентивирусных векторов на основе генома ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы (HIV\_wt) клетки HEK293T котрансфицировали кальций-фосфатным методом плазмидами pCMV-VSV-G («Addgene», США; #8454), pCMVΔR8.2 («Addgene»; #12263) и LeGo-G/BSΔ («Addgene»; #27354) в соотношении 1/2/3 по массе. Для сборки векторов с мутантными формами интегразы HIV\_mut, HIV\_E152A, HIV\_F185A плазида pCMVΔR8.2 была заменена на аналогичную плазмиду с указанной мутацией, полученную в нашей лаборатории. Через 6 ч после трансфекции среду заменяли на новую. Лентивирусные векторы собирали через 48 и 72 ч после трансфекции. Векторы концентрировали ультрацентрифугированием с использованием углового ротора Type 45 Ti («Beckman», США) в течение 2 ч при 30 000 g и температуре 4 °С.

**Определение титра лентивирусных векторов.** Для определения титра вектора HIV\_wt

в лунки 24-луночного планшета («Corning», США) переносили по 100 000 клеток НЕК293Т. Через 24 ч готовили серию 10-кратных разведений исходного образца вектора, и 5 мкл исходного вектора или его разведений использовали для трансдукции клеток НЕК293Т. Через 48 ч с момента трансдукции оценивали процентное содержание GFP-положительных клеток, содержащих зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein), в популяции с помощью метода проточной цитометрии на приборе CytoFlex («Beckman»), и на основании этих данных рассчитывали концентрацию трансдуцирующих единиц в образцах. Поскольку векторы HIV\_mut, HIV\_E152A и HIV\_F185A в своем составе содержат мутантные формы интегразы и у них нарушен один из этапов раннего цикла ВИЧ-1, титр псевдовирусных частиц в этом случае оценить с использованием проточной цитометрии было невозможно. В этом случае титр определяли с помощью ИФА-теста к р24-антигену ВИЧ-1 («Вектор-Бест», Россия).

**Вестер-блот-анализ.** 1 млн клеток НЕК293Т трансдуцировали лентивирусным вектором HIV\_wt при множественности инфекции (MOI), равной 10, или эквивалентным количеством лентивирусных векторов HIV\_mut, HIV\_E152A или HIV\_F185A. Через 2 ч среду с несвязавшимся вектором отбирали, клетки промывали 2 раза 1× ФСБ (фосфатно-солевой буфер, pH = 7,4), после чего помещали в среду для культивирования. Через 10 ч после трансдукции клетки лизировали при 4 °C RIPA-буфером («Servicebio», Китай) с добавлением ингибиторов фосфатаз Phosphatase inhibitor cocktail 2 и 3 («Sigma», США), а также ингибиторов протеаз Halt protease inhibitor cocktail («Pierce», США). Перед анализом остатки клеток удаляли центрифугированием при 14 000 g в течение 10 мин при 4 °C. Для каждой экспериментальной точки определяли содержание белка в образцах с помощью набора DC protein assay kit («Bio-Rad», США), на гель наносили одинаковое количество белка. Анализируемые образцы клеточных лизатов разделяли в градиентном (4–15%) геле Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels («Bio-Rad»), переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad») методом полусухого переноса на приборе Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad»). Исследуемые белки визуализировали первичными мышиными антителами на фосфорилированные формы p53 (pSer15), первичными кроличьими антителами на DNA-PK (pSer2056), ATM (pSer1981), ATR (pSer428), Chk1 (pThr68), Chk2 (pSer345), γH2AX (pSer139) («Cell Signaling Technology», США). В качестве вторичных антител использовали HRP-конъюгированные антитела против кроличьих или мышиных антител («Cell Signaling Technology»). Визуализацию целевых белковых полос проводили с помощью

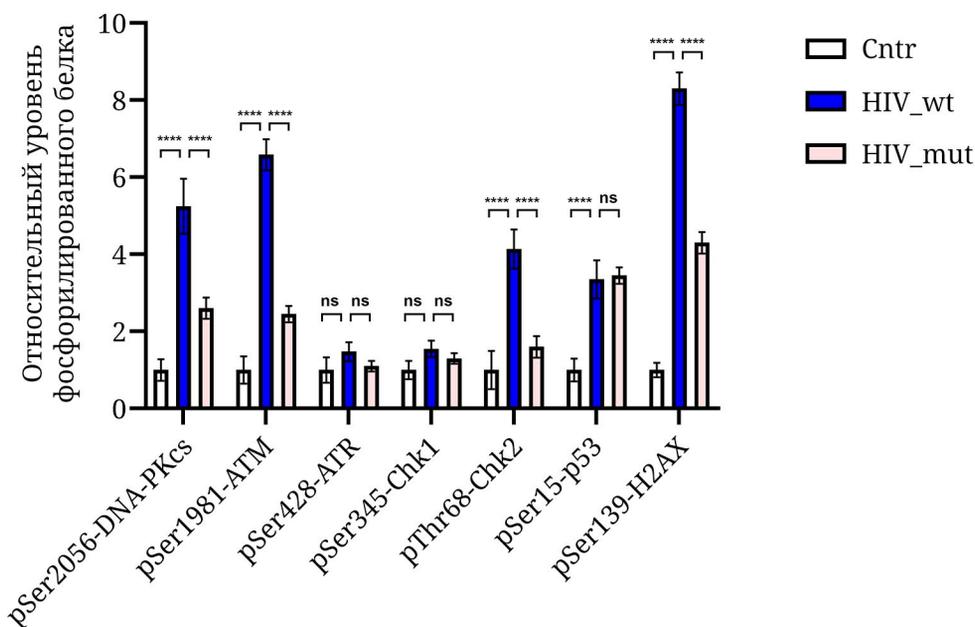
субстрата пероксидазы хрена Clarity Western ECL substrate («Bio-Rad») в системе детекции люминесценции ChemiDoc MP system («Bio-Rad»).

Для оценки влияния активности DNA-PK и ATM на накопление фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139) при трансдукции клеток лентивирусным вектором использовали ингибиторы DNA-PK – Nu7441 («Sigma») и ATM – Ku-55933 («Sigma») в концентрациях, при которых наблюдается 50%-ное подавление ПИР [12]. Ингибиторы были растворены в диметилсульфоксиде. В работе с ингибиторами во всех экспериментальных точках поддерживали уровень диметилсульфоксида в среде на уровне 0,5%.

**Оценка образования локусов γH2AX.** Клетки НЕК293Т рассеивали на предварительно обработанные фибронектином покровные стекла, через 24 ч клетки трансдуцировали лентивирусными векторами HIV\_wt, HIV\_mut, HIV\_E152A, HIV\_F185A при MOI = 15. Через 12 ч после трансдукции клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом (ПФА) на 1× ФСБ в течение 15 мин при комнатной температуре. Параллельно с указанными образцами был подготовлен препарат нетрансдуцированных клеток для оценки эндогенного уровня локусов (отрицательный контроль), а также клетки, обработанные в течение 1 ч перед фиксацией 50 мкМ этопозидом (положительный контроль). Окрашивание препаратов проводили по протоколу набора реагентов HCS DNA Damage Kit («Invitrogen», США). На последнем этапе образцы заключали в среду (Mowiol, DAPI 1 мкг/мл, DABCO 1 мг/мл, «Sigma»). Детектировали флуоресценцию Alexa Fluor 555 и DAPI на микроскопе Eclipse-Ti2 («Nikon», Япония) с объективом 60×/1.4 и sCMOS-камерой Neo («Andor», Ирландия) (эффективный размер пикселя – 110 нм). Подсчет количества локусов и интенсивностей локусов проводили в программе ImageJ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**DNA-PKs, ATM и их мишени Chk2, H2AX и p53 фосфорилируются в ответ на трансдукцию клеток векторами на основе генома ВИЧ-1.** Ранее при изучении вопроса возможного участия представителей семейства PIKK-киназ в ранних этапах репликации ВИЧ-1, а именно в регуляции ПИР, мы показали, что протекание ПИР зависит от фосфорилирующей активности ATM и DNA-PK, но не ATR [12]. Поскольку эти две киназы обычно активируются при появлении двуцепочечных разрывов ДНК [13], а в продукте интеграции кДНК ВИЧ-1 такие разрывы отсутствуют, можно было предположить, что дальнейший спектр клеточных реакций может отличаться от реакций,



**Рис. 1.** Анализ уровня фосфорилирования белков DNA-PKcs, ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 и H2AX в клетках, трансдуцированных HIV\_wt, HIV\_mut или нетрансдуцированном контроле (Cntr), через 12 ч после добавления лентивирусных векторов. На графике представлены уровни фосфорилированной формы белка в клетках, трансдуцированных HIV\_wt или HIV\_mut, относительно нетрансдуцированного образца (среднее  $\pm$  SD по трем независимым повторам). Статистическая значимость изменений в уровне фосфорилированного белка оценивалась с помощью двухфакторной ANOVA с поправкой на множественные сравнения по Тьюки; ns – статистические отличия отсутствуют, \*\*\*\*  $p$ -value < 0,0001

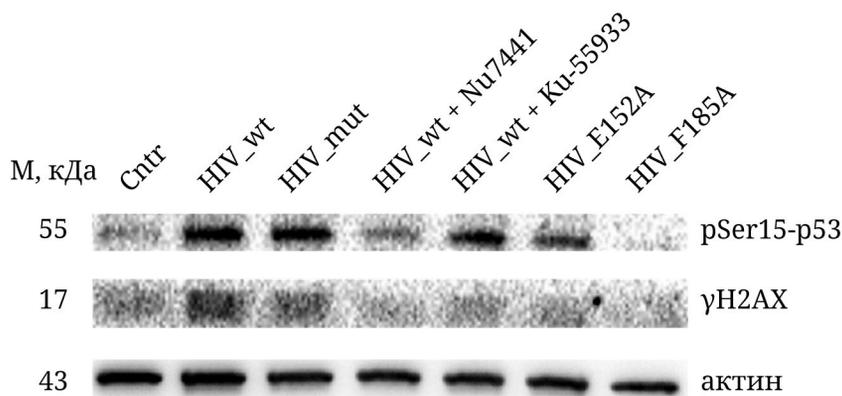
характерных для репарации двуцепочечных разрывов. В связи с этим необходимо было проверить, фосфорилируются ли хорошо известные мишени ATM и DNA-PK при обработке клеток лентивирусными векторами на основе генома ВИЧ-1.

В качестве таких мишеней далее мы рассматривали сами ферменты DNA-PKcs и ATM, т.к. они автофосфорилируются в ходе активации, а также их нижестоящие мишени Chk2, p53 и репаративный гистон H2AX. Помимо них, мы дополнительно решили проанализировать статус фосфорилирования ATR (автофосфорилируется при активации) и его мишени Chk1 в качестве негативного контроля, поскольку киназа ATR не участвует в репликации ВИЧ-1, и, следовательно, она не должна активироваться в ходе ПИР. Клетки HEK293T трансдуцировали VSV-G псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы (HIV\_wt), и через 12 ч в белковых лизатах оценивали статус фосфорилирования Ser2056 в составе DNA-PKcs, Ser1981 – в составе ATM, Thr68 – в Chk2, Ser139 – в H2AX и Ser15 – в p53, а также Ser428 – в ATR и Ser345 – в Chk1. В качестве контрольного образца использовались нетрансдуцированные клетки (рис. 1). Анализ фосфорилированных форм проводили через 12 ч после трансдукции, поскольку максимальная эффективность ПИР наблюдается в интервале 10–18 ч после трансдукции [12].

В образцах, обработанных вектором HIV\_wt, детектировались фосфорилированные формы белков pSer2056-DNA-PKcs, pSer1981-ATM, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX ( $\gamma$ H2AX), а также pSer15-p53, причем их количества существенно превышали фоновые значения в контрольных образцах (рис. 1). В этих условиях, как и ожидалось, ни ATR, ни его мишень Chk1 практически не фосфорилировались.

Изменение статуса фосфорилирования указанных белков может быть вызвано как протеканием ПИР, в ходе которого активируются DNA-PK и ATM, так и другими факторами, не связанными с ПИР. Для того чтобы понять, действительно ли модификации белков вызваны ПИР, мы дополнительно оценили поведение этих мишеней при обработке клеток лентивирусным вектором HIV\_mut, кодирующим интегразу, с аминокислотными заменами E212A/L213A, препятствующими ее взаимодействию с Ku70 [14]. Такие мутации в составе интегразы нарушают эффективное протекание ПИР у ВИЧ-1 [11]. В этом случае практически все мишени, за исключением p53, фосфорилировались слабее (рис. 1).

**Накопление  $\gamma$ H2AX и pSer15-p53 происходит по двум независимым путям.** Для выяснения причин различий фосфорилирования H2AX и p53 при трансдукции клеток векторами на основе ВИЧ-1 нами дополнительно был получен вектор HIV\_E152A, содержащий в своем составе каталитически неактивную форму интегразы



**Рис. 2.** Вестерн-блот-анализ фосфорилированных форм p53 (pSer15) и H2AX (pSer139). Cntr – нетрансдуцированные вектором клетки; HIV\_wt, HIV\_mut, HIV\_E152A, HIV\_F185A – клетки, трансдуцированные векторами на основе ВИЧ-1 с природным вариантом интегразы или соответствующей мутантной формой; образцы HIV\_wt + Nu7441 и HIV\_wt + Ku-55933 после трансдукции клеток вектором HIV\_wt дополнительно обрабатывали ингибитором DNA-ПКCs – Nu7441 (2 мкМ), или ингибитором ATM – Ku-55933 (5 мкМ)

(замена E152A) и не способный интегрировать вирусную кДНК [15], а также вектор HIV\_F185A, содержащий интегразу с заменой F185A. Эта аминокислотная замена в составе интегразы препятствует ее связыванию с обратной транскриптазой ВИЧ-1, что нарушает корректное протекание обратной транскрипции [16]. В результате при трансдукции клеток вектором HIV\_E152A в них накапливается линейная двуцепочечная кДНК, но она не может встроиться в геном клетки-хозяина, а в случае вектора HIV\_F185A не происходит даже обратная транскрипция и в клетках присутствует лишь РНК-геном вируса.

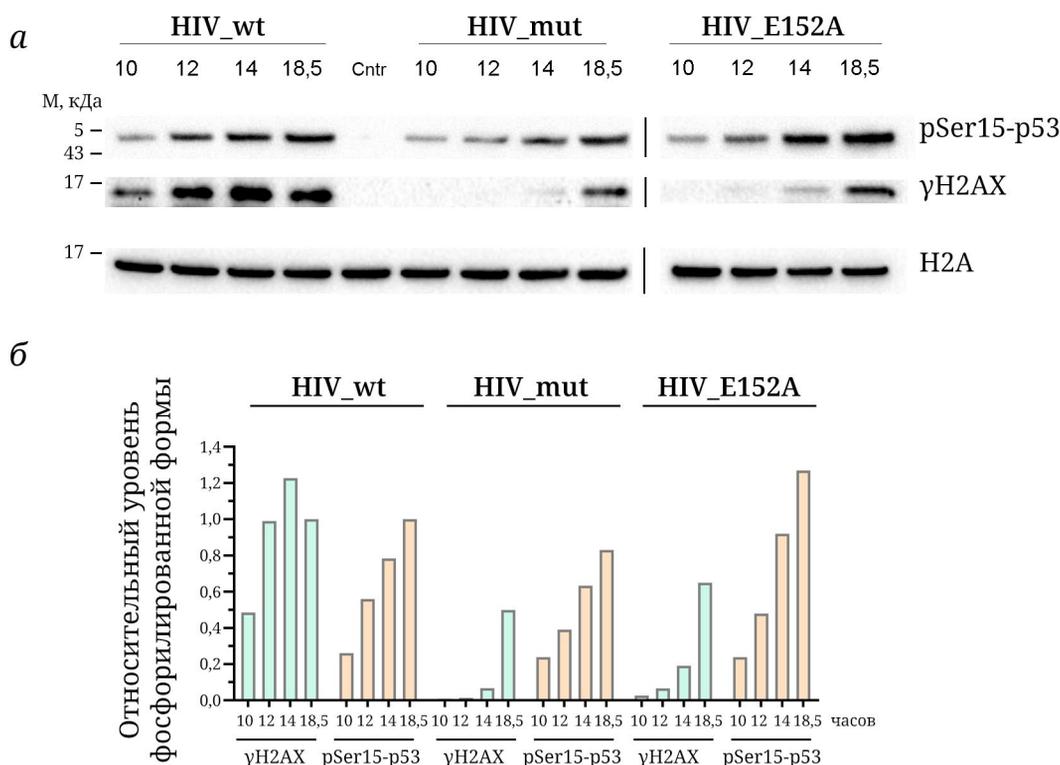
Клетки НЕК293Т трансдуцировали векторами HIV\_wt, HIV\_mut, HIV\_E152A или HIV\_F185A, и через 12 ч в лизатах оценивали количество  $\gamma$ H2AX и pSer15-p53 методом Вестерн-блоттинга (рис. 2). Гистон H2AX эффективно фосфорилировался только в случае HIV\_wt, а фосфорилирование p53 происходило во всех случаях, когда в клетке синтезировалась кДНК, т.е. при трансдукции клеток векторами HIV\_wt, HIV\_mut и HIV\_E152A. Следовательно, фосфорилирование p53 не зависело ни от образования комплекса интегразы с Ku70, ни от способности интегразы встраивать вирусную кДНК в геном клетки, однако оно не наблюдалось при трансдукции клеток вектором HIV\_F185, не способным к обратной транскрипции. На основании этих данных можно предположить, что сигналом для фосфорилирования Ser15 в составе p53 является сам факт появления линейной двуцепочечной ДНК в трансдуцированных клетках.

Мы также оценили кинетику накопления  $\gamma$ H2AX и pSer15-p53 при трансдукции клеток векторами HIV\_wt, HIV\_mut и HIV\_E152A в интервале времени 10–18,5 ч после трансдукции, когда наблюдается максимальная эффективность ПИР [12]. В случае псевдовируса HIV\_wt высокий уровень

фосфорилирования H2AX наблюдался уже через 10 ч после трансдукции и сохранялся на протяжении всего этапа ПИР вплоть до 18,5 ч (рис. 3). При трансдукции клеток вектором HIV\_mut также накапливается  $\gamma$ H2AX, но профиль его накопления существенно отличался: через 10 ч уровень  $\gamma$ H2AX незначительно превышал фоновые значения, после чего постепенно нарастал, достигая максимума к 18,5 ч. Аналогичный профиль накопления  $\gamma$ H2AX был зафиксирован для вектора HIV\_E152 (рис. 3). Очевидно, фосфорилирование H2AX в случае HIV\_mut и HIV\_E152A обусловлено накоплением в ядрах трансдуцированных клеток линейной кДНК вектора, а не повреждениями ДНК, возникающими в ходе интеграции, как в случае HIV\_wt. Профили накопления pSer15-p53 идентичны для всех трех типов векторов: через 10 ч после трансдукции фосфорилированная форма белка незначительно превосходит контрольные уровни, постепенно возрастает, достигая максимального уровня через 18,5 ч (рис. 3).

Вышеописанные результаты демонстрируют, что фосфорилирование p53 по Ser15 происходит не на этапе ПИР, однако остается открытым вопрос, участвуют ли в этой модификации киназы ATM и DNA-ПК. Для ответа на него мы оценили накопление фосфорилированной формы p53 при трансдукции клеток НЕК293Т вектором HIV\_wt в присутствии ингибитора DNA-ПКCs (Nu7441) или ингибитора ATM (Ku-55933). Оба ингибитора одинаково эффективно подавляли накопление  $\gamma$ H2AX (рис. 2). Фосфорилирование p53 эффективно подавлялось ингибитором DNA-ПКCs, а ингибитор ATM значительно в меньшей степени влиял на этот процесс (рис. 2).

Таким образом, в ответ на интеграцию вирусной кДНК и ПИР специфично фосфорилируются только H2AX. Фосфорилирование p53 происходит



**Рис. 3.** Кинетика накопления  $\gamma$ H2AX и pSer15-p53 в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами HIV\_wt, HIV\_mut или HIV\_E152A через 10, 12, 14 и 18,5 ч после трансдукции. *а* – Вестерн-блот-анализ; *б* – количественный анализ результатов вестерн-блоттинга. За 1 принят уровень  $\gamma$ H2AX и pSer15-p53 в клетках, трансдуцированных HIV\_wt через 18,5 ч после добавления вектора. Образец, обозначенный как Cntr, не трансдуцирован вектором

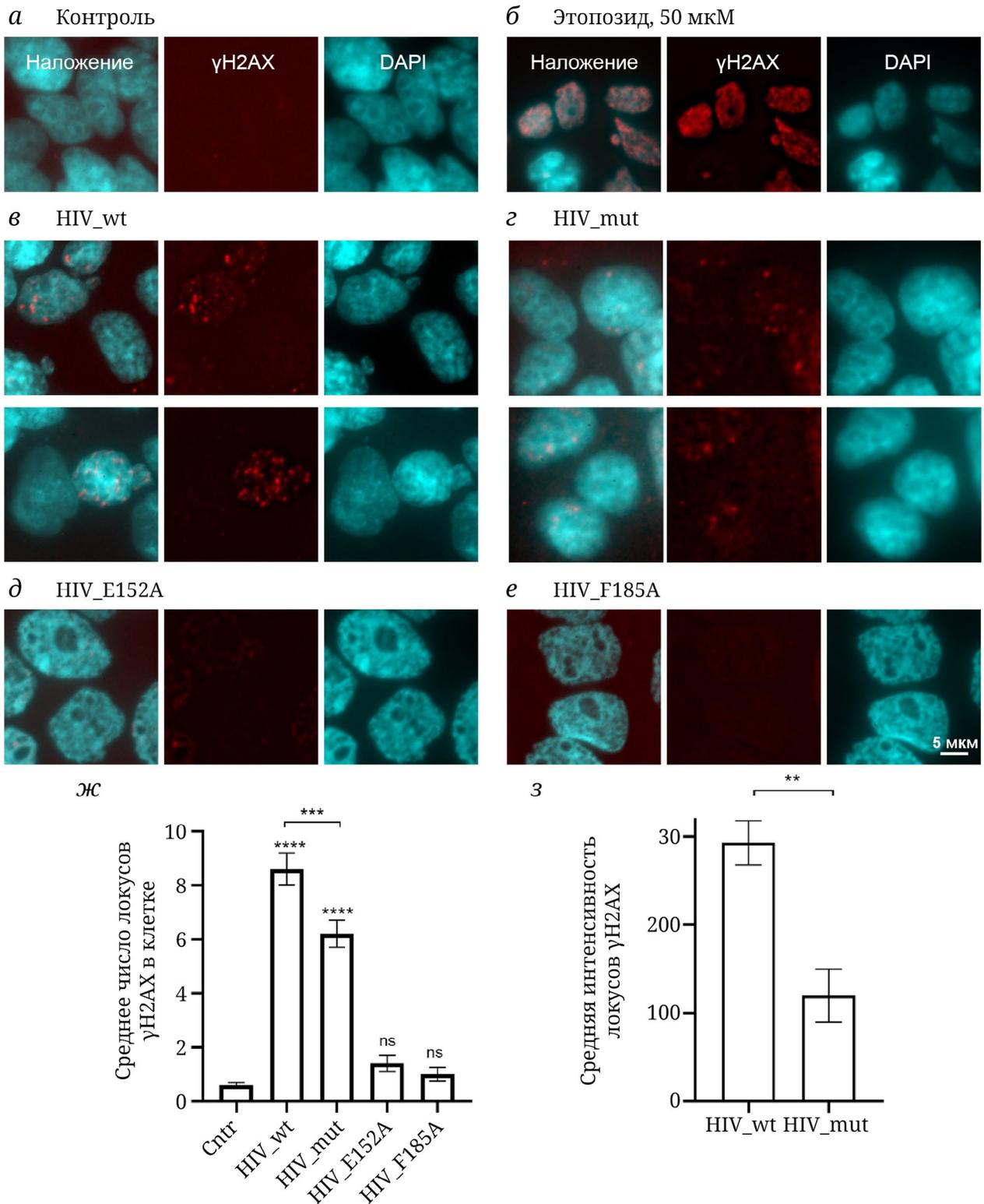
в ответ на накопление в трансдуцированных клетках линейной кДНК ВИЧ-1, хотя и зависит от активности DNA-РКс.

**Накопление локусов  $\gamma$ H2AX в ядрах трансдуцированных клеток может служить маркером успешности протекания ПИР.** Обработка клеток ионизирующим излучением или агентами, вызывающими появление в клеточной ДНК двуцепочечных разрывов, приводит к появлению в ядрах клеток локусов  $\gamma$ H2AX. Этот процесс преимущественно контролируется протеинкиназами АТМ и DNA-РК [17]. Каждый локус содержит по крайней мере несколько сотен молекул  $\gamma$ H2AX, и число локусов коррелирует с числом двуцепочечных разрывов по крайней мере на ранних стадиях репарации [18]. В нашем случае в ответ на ретровирусную интеграцию мы обнаружили увеличение уровня фосфорилирования гистона H2AX по Ser139, поэтому мы решили проверить, формируются ли локусы  $\gamma$ H2AX в ядрах трансдуцированных клеток и зависит ли их формирование от способности интегразы взаимодействовать с Ku70.

Для этого клетки HEK293T трансдуцировали вектором HIV\_wt при MOI = 10 или аналогичным по р24 количеством векторов HIV\_mut, HIV\_E152A и HIV\_F185, и через 12 ч после трансдукции ана-

лизировали содержание локусов  $\gamma$ H2AX методом иммуноцитохимии с использованием антител к pSer139-H2AX и последующей визуализацией с помощью конфокальной микроскопии. Лишь в небольшой доле клеток без обработки лентивирусными векторами детектировались единичные локусы  $\gamma$ H2AX (рис. 4, *а*). Для подтверждения работоспособности наших антител, использованных в работе, мы проанализировали накопление  $\gamma$ H2AX в ядрах клеток, обработанных в течение 1 ч перед фиксацией этопозидом (50 мкМ) – известным ингибитором топоизомеразы II, который индуцирует накопление двуцепочечных разрывов в ДНК. В этих условиях практически все ядро клеток давало окрашивание антителами на  $\gamma$ H2AX (рис. 4, *б*), что говорит о множественных повреждениях ДНК при такой концентрации этопозида.

При трансдукции клеток вектором HIV\_wt через 12 ч после добавления псевдовirusа в ядрах клеток мы зафиксировали образование четко различимых локусов гистона  $\gamma$ H2AX разной интенсивности (рис. 4, *в*). В случае обработки клеток векторами HIV\_E152A и HIV\_F185A уровень  $\gamma$ H2AX практически не отличался от контрольных клеток (рис. 4, *д* и *е*). При трансдукции клеток вектором HIV\_mut, не способным эффективно иницировать ПИР, мы также наблюдали формирование



**Рис. 4.** Накопление локусов  $\gamma$ H2AX в клетках HEK293T, трансдуцированных векторами на основе генома ВИЧ-1. *a-e* – Конфокальные изображения локусов  $\gamma$ H2AX в клетках HEK293T без обработки (*a*), обработанных 50 мкМ этопозидом в течение 1 ч перед фиксацией (*б*), трансдуцированных векторами HIV\_wt (*в*), HIV\_mut (*г*), HIV\_E152A (*д*), HIV\_F185A (*е*) при множественности инфекции (MOI), равной 10. Фиксация клеток проводилась через 12 ч после трансдукции. *ж* – Среднее число локусов  $\gamma$ H2AX, приходящихся на одну клетку (проанализировано суммарно 5000 клеток в трех технических повторах для каждого типа воздействия); статистическая значимость отличий оценена с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с поправкой Тьюки на множественные сравнения; ns – отличия отсутствуют, \*\*\* *p*-значение < 0,001, \*\*\*\* *p*-значение < 0,0001; *з* – средняя интенсивность флуоресценции локусов  $\gamma$ H2AX; статистическая значимость отличий оценена с помощью *t*-теста, \*\* *p*-значение < 0,01

локусов  $\gamma$ H2AX (рис. 4, *з*), однако их среднее число на клетку и средняя интенсивность флуоресценции локусов была ниже, чем в случае HIV\_wt в 1,4 и 2 раза соответственно (рис. 4, *ж* и *з*).

Таким образом, данные, полученные с помощью конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга о разнице в накоплении  $\gamma$ H2AX в клетках, трансдуцированных псевдовirusами с интегразой дикого типа и интегразой, не способной связываться с Ku70, позволяют сделать вывод, что  $\gamma$ H2AX может быть использован в качестве маркера эффективности протекания ретровирусной ПИР.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Протеинкиназы из семейства PI3K (PI3K-related kinases), ATM, DNA-PK и ATR, являются ключевыми регуляторами клеточного ответа на повреждения ДНК. ATM и DNA-PK активируются в ответ на двуцепочечные повреждения ДНК, а ATR – на протяженные одонитевые участки ДНК, связанные с RPA-белком (replication protein A). Распознавание этих повреждений и активация соответствующих киназ происходит при участии сенсоров указанных повреждений ДНК. Двуцепочечные разрывы ДНК распознаются гетеродимером Ku70–Ku80 или MRN-комплексом, что приводит к привлечению к местам повреждений DNA-PKcs или ATM соответственно. ATR к протяженным одонитевым участкам ДНК привлекается за счет кофактора – ATRIP [19]. Будучи активированными, эти белки фосфорилируют широкий спектр белков-мишеней, создавая оптимальные условия для репарации повреждений ДНК [19–22]. Две из этих киназ, ATM и DNA-PK, наряду с сигнальной функцией способны напрямую запускать процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Так, комплекс DNA-PK инициирует процесс негомологичного соединения концов (NHEJ, non-homologous end joining), а ATM – гомологичную рекомбинацию (HR, homologous recombination) [13]. Несмотря на такую строгую специализацию каждой из киназ, современные данные говорят в пользу того, что все три киназы могут взаимно влиять, дополняя или модулируя активности друг друга в зависимости от контекста, в котором находится повреждение ДНК [13, 17, 23–28].

При возникновении в клетке двуцепочечных разрывов ДНК и привлечении к ним DNA-PK-комплекса происходит автофосфорилирование каталитической субъединицы DNA-PKcs по аминокислотным остаткам, расположенным в кластерах PQR и ABCDE [29]. Наиболее изученной модификацией DNA-PKcs является фосфорилирование остатка S2056, расположенного в PQR-кластере. Данная

модификация используется в качестве маркера активации DNA-PK [30], но, помимо этого, регулирует ее конформацию и активность [31, 32]. Если к сайту повреждения ДНК привлекается ATM-киназа, она, аналогично DNA-PK, подвергается автофосфорилированию по S1981, что приводит к ее димеризации и переходу в активную форму [33, 34]. Будучи активированными, DNA-PKcs и ATM способны регулировать активности друг друга путем модификации дополнительных сайтов [13, 28], а также фосфорилируют напрямую или посредством активации посредников ряд важных мишеней. Среди них особое внимание привлекают белки Chk2, p53 и репаративный гистон H2AX, накопление фосфорилированных форм которых (pThr68-Chk2, pSer15-p53 и pSer139-H2AX) происходит в ответ на генотоксический стресс [17, 35–38]. Если фосфорилирование Chk2 и p53 необходимо для остановки клеточного цикла и создания благоприятных условий для репарации ДНК через регуляцию экспрессии p53-зависимых генов [39], фосфорилирование гистона H2AX в местах повреждений ДНК регулирует репарацию ДНК напрямую, поскольку фосфорилированная форма гистона служит своеобразной платформой для привлечения к местам повреждений ДНК факторов репарации и удержания их в этом месте вплоть до момента удаления повреждения [40].

Аналогично ATM и DNA-PK, ATR автофосфорилируется по S428 в ходе ее активации в ответ на протяженные одонитевые фрагменты ДНК [41]. Активированная форма ATR фосфорилирует Chk1. При окислительном стрессе ATR также способна стимулировать фосфорилирование гистона H2AX и p53, но путем активации ATM [42].

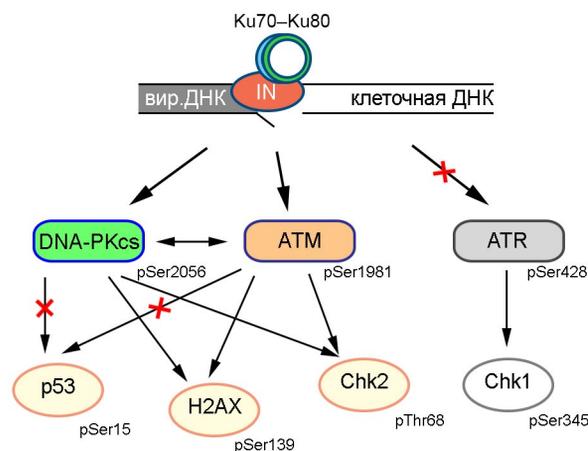
Интеграция генома ВИЧ-1 в клеточную ДНК приводит к появлению повреждений ДНК. К таким повреждениям можно отнести пятинуклеотидные одонитевые участки по краям от места встраивания вирусной кДНК и неспаренные динуклеотиды 5'-AC-3' на 5'-концах вирусной ДНК. Успешная репликация вируса напрямую зависит от репарации указанных повреждений ДНК [11]. Ранее мы показали, что ПИР зависит от способности интегразы ВИЧ-1 взаимодействовать с клеточным белком Ku70 – компонентом DNA-PK-комплекса, а также от активности двух киназ из PI3K-семейства – ATM и DNA-PK, но не ATR [11, 12]. Поскольку двуцепочечные разрывы ДНК отсутствуют в продукте интеграции ВИЧ-1, а активация ATM и DNA-PK зависит от образования комплекса интегразы с Ku70, мы задались вопросом, характерны ли для ПИР события фосфорилирования самих киназ и их мишеней, описанные ранее для репарации двуцепочечных разрывов в ДНК.

В данном исследовании мы проанализировали образование автофосфорилированных форм

киназ pSer1981-ATM и pSer2056-DNA-PKcs, а также их мишеней pSer15-p53, pThr68-Chk2, pSer139-H2AX в ответ на трансдукцию клеток НЕК293Т лентивирусным вектором на основе генома ВИЧ-1. Дополнительно мы проанализировали, накапливается ли при трансдукции клеток фосфорилированная форма ATR (pSer428) и ее мишени Chk1 (pSer345). Мы обнаружили, что в ответ на ретровирусную трансдукцию в клетках накапливаются фосфорилированные формы ATM, DNA-PK, p53, Chk2 и H2AX, но не ATR и Chk1, что еще раз подтверждает отсутствие участия ATR в репликации ВИЧ-1 [12].

С помощью лентивирусного вектора HIV\_mut, не способного инициировать процесс ПИР, было установлено, что автофосфорилирование киназ ATM и DNA-PK, а также фосфорилирование их мишеней Chk2 и H2AX зависит от образования комплекса интегразы-Ku70. В то же время фосфорилирование p53 по Ser15 не зависело от образования этого комплекса, поскольку его эффективность была одинаковой при трансдукции клеток векторами HIV\_wt и HIV\_mut. Анализ кинетики накопления pSer15-p53 при трансдукции клеток HIV\_wt, HIV\_mut и HIV\_E152A, в котором подавлена интеграция, показал, что количество модифицированного p53 постепенно возрастает в интервале 10–18,5 ч, достигая максимума к 18,5 ч. Мы полагаем, что в нашей системе модификация p53 происходит не в результате ПИР, а просто за счет накопления в трансдуцированных клетках линейной неинтегрированной кДНК ВИЧ-1. Это предположение подтверждается отсутствием фосфорилирования p53 при использовании вектора HIV\_F185, в котором не происходит обратной транскрипции.

В аналогичных условиях образование  $\gamma$ H2AX эффективно происходило только в случае вектора, способного инициировать ПИР (HIV\_wt), причем высокий уровень  $\gamma$ H2AX наблюдался на протяжении всего периода ПИР (10–18,5 ч). При трансдукции клеток HIV\_mut и HIV\_E152A  $\gamma$ H2AX также детектировался, но кинетика его накопления существенно отличалась от образцов, трансдуцированных HIV\_wt. Возможно, накопление  $\gamma$ H2AX в случае векторов, не способных к ПИР или интеграции, вызвано появлением в клетках линейной двуцепочечной кДНК аналогично тому, как это происходит при модификации p53. Нам также удалось показать, что  $\gamma$ H2AX в трансдуцированных HIV\_wt клетках распределен в ядре не диффузно, а формирует локусы, характерные для репарации двуцепочечных разрывов ДНК [18]. Отличия в кинетике накопления  $\gamma$ H2AX при трансдукции клеток разными векторами на основе ВИЧ-1 позволили нам предположить, что образование  $\gamma$ H2AX (их число и средняя интенсивность



**Рис. 5.** Фосфорилирование белков из систем клеточного ответа на двуцепочечные разрывы ДНК при постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Интегразы ВИЧ-1, расположенная в местах встраивания генома ВИЧ-1 и, соответственно, маркирующая повреждение ДНК, привлекает гетеродимерный комплекс Ku70–Ku80. Данный комплекс является строго необходимым для привлечения DNA-PK и ATM и последующей активации этих киназ в местах поврежденной ДНК, вызванных интеграцией ВИЧ-1. DNA-PK и ATM автофосфорилируются по pSer2056 и pSer1981. Активированные в ходе ПИР киназы фосфорилируют мишени H2AX и Chk2, но не p53. ATR в ПИР не участвует и не активируется

локусов) может служить индикатором успешности протекания ПИР ВИЧ-1.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграция кДНК ВИЧ-1 не приводит к появлению двуцепочечных разрывов в клеточной ДНК, процесс репарации вызванных интеграцией повреждений генома клетки по крайней мере на начальной стадии очень похож на процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК. В ПИР участвуют те же РИКК-киназы, ATM и DNA-PK, что участвуют в процессах NHEJ и HR, они иницируют процесс ПИР путем автофосфорилирования и фосфорилирования своих мишеней – белков Chk2 и H2AX, как и в случае NHEJ и HR (рис. 5). Однако у этих процессов есть и серьезные отличия. Если к двуцепочечным разрывам в ДНК DNA-PKcs или ATM привлекаются за счет связывания, соответственно, гетеродимера Ku70–Ku80 или MRN-комплекса с ДНК, то в случае ПИР обе эти протеинкиназы привлекаются к местам повреждения ДНК в результате связывания белка Ku70 с вирусной интегразой (рис. 5). Кроме того, в ходе репарации двуцепочечных разрывов происходит фосфорилирование p53. На этапе же ПИР фосфорилирование p53 не происходит. Мы зафиксировали фосфорилированную форму p53 в ответ на накопление в трансдуцированных лентивирусными векторами клетках линейной кДНК ВИЧ-1, причем в образовании этой фосфорилированной формы p53 участвует не ATM, а DNA-PK.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 – важный этап в жизненном цикле вируса, без которого невозможна эффективная продукция новых вирусных частиц. Ранее нам удалось показать, что процесс ПИР запускается протеинкиназами из PIKK-семейства – ATM и DNA-PK, которые обычно участвуют в клетке в репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако в ходе интеграции двуцепочечные разрывы не возникают, и к местам повреждений ДНК эти киназы привлекаются комплексом вирусной интегразы и клеточного белка Ku70 – компонентом DNA-PK.

В данном исследовании мы изучили, как меняется статус автофосфорилирования киназ из семейства PIKK (ATM, DNA-PK и ATR), а также их мишеней (Chk1, Chk2, H2AX и p53) в ходе ПИР ВИЧ-1. Было обнаружено, что ни протеинкиназа ATR, ни ее мишень Chk1 практически не модифицируются, в то время как ATM и DNA-PKs подвергаются автофосфорилированию. Мишени двух последних киназ, а именно: Chk2, H2AX и p53, также фосфорилировались при трансдукции клеток лентивирусными векторами на основе генома ВИЧ-1. Однако если ATM, DNA-PK, Chk2 и H2AX подвергались модификации только в случае успешной интеграции и последующего образования комплекса интегразы ВИЧ-1 с Ku70, p53 модифицировался в ответ на накопление в трансдуцированных клетках кДНК и не зависел от способности интегразы

взаимодействовать с Ku70. Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о том, что, хотя интеграция кДНК ВИЧ-1 не приводит к появлению двуцепочечных разрывов в клеточной ДНК, процесс репарации вызванных интеграцией повреждений генома клетки по крайней мере на начальной стадии похож на процессы репарации двуцепочечных разрывов ДНК, хотя и отличается в контексте фосфорилирования p53.

**Вклад авторов.** А.Н. Анисенко, М.Б. Готтих – концепция и руководство работой; А.Н. Анисенко, А.А. Нефедова, И.И. Киреев – проведение экспериментов; А.Н. Анисенко, А.А. Нефедова, И.И. Киреев, М.Б. Готтих – обсуждение результатов исследования; А.Н. Анисенко, М.Б. Готтих – написание текста.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-10021).

**Благодарности.** Авторы благодарят Программу развития МГУ (ПНР 5.13) и ЦКП «Субдифракционная микроскопия и спектроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского за предоставление доступа к оборудованию.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lesbats, P., Engelman, A. N., and Cherepanov, P. (2016) Retroviral DNA Integration, *Chem. Rev.*, **116**, 12730-12757, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00125>.
2. Vincent, K. A., York-Higgins, D., Quiroga, M., and Brown, P. O. (1990) Host sequences flanking the HIV provirus, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6045-6047, <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6045>.
3. Vink, C., Groenink, M., Elgersma, Y., Fouchier, R. A., Tersmette, M., and Plasterk, R. H. (1990) Analysis of the junctions between human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA and human DNA, *J. Virol.*, **64**, 5626-5627, <https://doi.org/10.1128/jvi.64.11.5626-5627.1990>.
4. Княжанская Е. С., Шадрин О. А., Анисенко А. Н., Готтих М. Б. (2016) Роль ДНК-зависимой протеинкиназы в репликации ВИЧ-1, *Мол. Биол.*, **50**, 639-654.
5. Анисенко А. Н., Готтих М. Б. (2019) Участие клеточных систем репарации ДНК в репликации ВИЧ-1, *Мол. Биол.*, **53**, 355-366.
6. Skalka, A. M., and Katz, R. A. (2005) Retroviral DNA integration and the DNA damage response, *Cell Death Differ.*, **12**, 971-978, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401573>.
7. Daniel, R., Katz, R. A., and Skalka, A. M. (1999) A role for DNA-PK in retroviral DNA integration, *Science*, **284**, 644-647, <https://doi.org/10.1126/science.284.5414.644>.
8. Daniel, R., Greger, J. G., Katz, R. A., Taganov, K. D., Wu, X., Kappes, J. C., and Skalka, A. M. (2004) Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the non-homologous end joining repair pathway, *J. Virol.*, **78**, 8573-8581, <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8573-8581.2004>.
9. Smith, J. A., Wang, F. X., Zhang, H., Wu, K. J., Williams, K. J., and Daniel, R. (2008) Evidence that the Nijmegen breakage syndrome protein, an early sensor of double-strand DNA breaks (DSB), is involved in HIV-1 post-integration repair by recruiting the ataxia telangiectasia-mutated kinase in a process similar to, but distinct from, cellular DSB repair, *Virol. J.*, **5**, 11, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-11>.

10. Lau, A., Swinbank, K. M., Ahmed, P. S., Taylor, D. L., Jackson, S. P., Smith, G. C. M., and O'Connor, M. J. (2005) Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase, *Nat. Cell Biol.*, **7**, 493-500, <https://doi.org/10.1038/ncb1250>.
11. Knyazhanskaya, E., Anisenko, A., Shadrina, O., Kalinina, A., Zatsepin, T., Zalevsky, A., Mazurov, D., and Gottikh, M. (2019) NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase, *Retrovirology*, **16**, 30, <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0492-z>.
12. Anisenko, A., Nefedova, A., Agapkina, Y., and Gottikh, M. (2023) Both ATM and DNA-PK are the main regulators of HIV-1 post-integrational DNA repair, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2797, <https://doi.org/10.3390/ijms24032797>.
13. Blackford, A. N., and Jackson, S. P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response, *Mol. Cell*, **66**, 801-817, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
14. Anisenko, A. N., Knyazhanskaya, E. S., Zalevsky, A. O., Agapkina, J. Y., Sizov, A. I., Zatsepin, T. S., and Gottikh, M. B. (2017) Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting, *Sci. Rep.*, **7**, 5649, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05659-5>.
15. Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J. F. (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase, *Retrovirology*, **5**, 114, <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-114>.
16. Wu, X., Liu, H., Xiao, H., Conway, J. A., Hehl, E., Kalpana, G. V., Prasad, V., and Kappes, J. C. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex, *J. Virol.*, **73**, 2126-2135, <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2126-2135.1999>.
17. Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P. A. (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation, *Cancer Res.*, **64**, 2390-2396, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3207>.
18. Rothkamm, K., and Löbrich, M. (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5057-5062, <https://doi.org/10.1073/pnas.0830918100>.
19. Menolfi, D., and Zha, S. (2020) ATM, ATR and DNA-PKcs kinases – the lessons from the mouse models: inhibition ≠ deletion, *Cell Biosci.*, **10**, 8, <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0376-x>.
20. Schlam-Babayov, S., Bensimon, A., Harel, M., Geiger, T., Aebersold, R., Ziv, Y., and Shiloh, Y. (2021) Phosphoproteomics reveals novel modes of function and inter-relationships among PIKKs in response to genotoxic stress, *EMBO J.*, **40**, e104400, <https://doi.org/10.15252/embj.2020104400>.
21. Anisenko, A., Kan, M., Shadrina, O., Brattseva, A., and Gottikh, M. (2020) Phosphorylation targets of DNA-PK and their role in HIV-1 replication, *Cells*, **9**, 1908, <https://doi.org/10.3390/cells9081907>.
22. Bensimon, A., Schmidt, A., Ziv, Y., Elkon, R., Wang, S. Y., Chen, D. J., Aebersold, R., and Shiloh, Y. (2010) ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage, *Sci. Signal.*, **3**, rs3, <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001034>.
23. Finzel, A., Grybowski, A., Strasen, J., Cristiano, E., and Loewer, A. (2016) Hyperactivation of ATM upon DNA-PKcs inhibition modulates p53 dynamics and cell fate in response to DNA damage, *Mol. Biol. Cell*, **27**, 2360-2367, <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-01-0032>.
24. Schlam-Babayov, S., Ziv, Y., and Shiloh, Y. (2021) It takes three to the DNA damage response tango, *Mol. Cell Oncol.*, **8**, 1881395, <https://doi.org/10.1080/23723556.2021.1881395>.
25. Lu, H., Zhang, Q., Laverty, D. J., Puncheon, A. C., Augustine, M. M., Williams, G. J., Nagel, Z. D., Chen, B. P. C., and Davis, A. J. (2023) ATM phosphorylates the FATC domain of DNA-PKcs at threonine 4102 to promote non-homologous end joining, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 6770-6783, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad505>.
26. Mladenov, E., Fan, X., Paul-Konietzko, K., Soni, A., and Iliakis, G. (2019) DNA-PKcs and ATM epistatically suppress DNA end resection and hyperactivation of ATR-dependent G2-checkpoint in S-phase irradiated cells, *Sci. Rep.*, **9**, 14597, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51071-6>.
27. Liu, S., Opiyo, S. O., Manthey, K., Glanzer, J. G., Ashley, A. K., Amerin, C., Troksa, K., Shrivastav, M., Nickoloff, J. A., and Oakley, G. G. (2012) Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10780-10794, <https://doi.org/10.1093/nar/gks849>.
28. Zhou, Y., Lee, J. H., Jiang, W., Crowe, J. L., Zha, S., and Paull, T. T. (2017) Regulation of the DNA damage response by DNA-PKcs inhibitory phosphorylation of ATM, *Mol. Cell*, **65**, 91-104, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.004>.
29. Kurosawa, A. (2021) Autophosphorylation and self-activation of DNA-dependent protein kinase, *Genes*, **12**, 1091, <https://doi.org/10.3390/genes12071091>.
30. Hsu, F. M., Zhang, S., and Chen, B. P. C. (2012) Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment, *Transl. Cancer Res.*, **1**, 22-34, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2012.04.01>.
31. Lafont, F., Fleury, F., and Benhelli-Mokrani, H. (2020) DNA-PKcs Ser2056 auto-phosphorylation is affected by an O-GlcNAcylation/phosphorylation interplay, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1864**, 129705, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129705>.

32. Chen, B. P. C., Chan, D. W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D. J. (2005) Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14709-14715, <https://doi.org/10.1074/jbc.M408827200>.
33. Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, *Nature*, **421**, 499-506, <https://doi.org/10.1038/nature01368>.
34. So, S., Davis, A. J., and Chen, D. J. (2009) Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites, *J. Cell Biol.*, **187**, 977-990, <https://doi.org/10.1083/jcb.200906064>.
35. Yuan, Z., Guo, W., Yang, J., Li, L., Wang, M., Lei, Y., Wan, Y., Zhao, X., Luo, N., Cheng, P., Liu, X., Nie, C., Peng, Y., Tong, A., and Wei, Y. (2015) PNAS-4, an early DNA damage response gene, induces S phase arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases in lung cancer cells, *J. Biol. Chem.*, **290**, 14927, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658419>.
36. Li, J., and Stern, D. F. (2005) Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **280**, 12041-12050, <https://doi.org/10.1074/jbc.M412445200>.
37. Boehme, K. A., Kulikov, R., and Blattner, C. (2008) p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7785-7790, <https://doi.org/10.1073/pnas.0703423105>.
38. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2, *Cell*, **91**, 325-334, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80416-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80416-X).
39. Loughery, J., Cox, M., Smith, L. M., and Meek, D. W. (2014) Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7666-7680, <https://doi.org/10.1093/nar/gku501>.
40. Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2010) H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy, *J. Nucleic Acids*, **2010**, 920161, <https://doi.org/10.4061/2010/920161>.
41. Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C. C. Y., Glover, J. N. M., Yang, X. H., and Zou, L. (2011) ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation, *Mol. Cell*, **43**, 192-202, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.019>.
42. Kulkarni, A., and Das, K. C. (2008) Differential roles of ATR and ATM in p53, Chk1, and histone H2AX phosphorylation in response to hyperoxia: ATR-dependent ATM activation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **294**, 998-1006, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00004.2008>.

## POST-INTEGRATIONAL DNA REPAIR OF HIV-1 IS ASSOCIATED WITH THE ACTIVATION OF DNA-PK AND ATM CELLULAR PROTEIN KINASES AND PHOSPHORYLATION OF THEIR TARGETS

A. N. Anisenko<sup>1,2,3\*</sup>, A. A. Nefedova<sup>3</sup>, I. I. Kireev<sup>2</sup>, and M. B. Gottikh<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia; e-mail: a\_anisenko@mail.ru

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,  
119991 Moscow, Russia

Integration of the DNA copy of the HIV-1 genome into the cellular genome results in series of damages, the repair of which is critical for successful viral replication. We have previously demonstrated that the ATM and DNA-PK kinases, normally responsible for repairing double-strand breaks in the cellular DNA, are required to initiate HIV-1 post-integration repair, even though integration does not result in double-strand DNA breaks. In this study, we analyzed changes in the phosphorylation status of ATM (pSer1981), DNA-PK (pSer2056) and their related kinase ATR (pSer428), as well as their targets: Chk1 (pSer345), Chk2 (pThr68), H2AX (pSer139) and p53 (pSer15) during HIV-1 post-integration repair. We have shown that ATM and DNA-PK, but not ATR, undergo autophosphorylation during postintegration DNA repair and phosphorylate their target proteins Chk2 and H2AX. These data indicate common signaling mechanisms between double-strand DNA break repair and postintegration repair of HIV-1.

**Keywords:** HIV-1, DNA-PK, ATM, kinases, DNA repair, post-integrational DNA repair