

Разработка тест-системы для высокопроизводительного скрининга ингибиторов взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и Ku70

Научный руководитель – Анисенко Андрей Николаевич

Галкин Семен Олегович

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: simon.galkin@gmail.com

Вирусом иммунодефицита человека каждый год инфицируются около 2.5 миллионов человек, погибают порядка миллиона. При этом в Российской Федерации проблема ВИЧ-инфекции стоит особо остро, в некоторых городах распространение вируса принимает масштабы эпидемии. ВИЧ способен быстро мутировать и, как следствие, вырабатывать устойчивость к существующим препаратам, направленным на подавление активности вирусных ферментов. Поэтому актуальной остается задача разработки новых типов анти-ВИЧ препаратов со сниженной вероятностью развития резистентности. Большие надежды возлагаются на соединения, препятствующие образованию комплексов вирусных белков с клеточными белками-помощниками, выполняющими важные функции в вирусной репликации.

Интегразы ВИЧ катализируют встраивание вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. В процессе интеграции ВИЧ привлекает множество клеточных факторов, в том числе и белок Ku70, взаимодействие с которым важно для репарации постинтеграционных повреждений. Нарушение взаимодействия между интегразой и Ku70, препятствует эффективному завершению процесса интеграции, а именно, восстановлению постинтеграционных повреждений ДНК. Следовательно, комплекс интегразы-Ku70 является привлекательной мишенью для поиска новых анти-ВИЧ препаратов.

Для эффективного поиска ингибиторов взаимодействия интегразы и Ku70, мы разработали высокопроизводительную тест-систему на основе генетически-закодированных флуоресцентных меток в составе интегразы ВИЧ-1 и белка Ku70. Для этого в прокариотический вектор, кодирующий интегразу с N-концевым GST-тагом, был введен фрагмент, кодирующий флуоресцентный белок mCerulean, а в Ku70 с N-концевым His6-меткой, был введен tRFP. Белки экспрессировали в прокариотической системе и очищали методом аффинной хроматографии. Далее интегразу закрепляли на 96-луночной планшете, покрытом глутатионом. С интегразой инкубировали Ku70 и потенциальный ингибитор, затем лунка планшета промывалась от несвязавшихся белков. Наличие ингибирования определялось по сигналу от tRFP в Ku70, а сигнал от mCerulean в интегразе использовался для нормирования полученных результатов. Полученная тест-система была валидирована с использованием известного ингибитора взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и белка Ku70 - 11-OM-E. Результаты, полученные в нашей тест-системе, совпадают с результатами классического метода соосаждения белков на аффинной смоле с последующим определением количеств связанных белков методом Вестерн-блота. Предложенный нами метод является быстрым и удобным для высокопроизводительных скринингов соединений, т.к. анализ 96 образцов занимает порядка 3 часов, при этом использование автоматических пипетирующих станций позволяет эффективно масштабировать эксперимент.