

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ БИБЛИОТЕКИ GPI-ЗАЯКОРЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СКРИНИНГА В ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТАХ

Научный руководитель – Круглова Наталья Андреевна

Боровикова София Евгеньевна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: borovikova_sofiya@mail.ru

Инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), остается острой социальной проблемой для всего человечества. Многообещающим подходом к лечению ВИЧ-инфекции может стать генная терапия. Для создания устойчивых к ВИЧ клеток могут использоваться различные модификации генома, одна из которых - встраивание конструкций, кодирующих поверхностно экспрессирующиеся пептидные ингибиторы слияния ВИЧ. Такие ингибиторы блокируют слияние клеточной и вирусной мембран и препятствуют проникновению ВИЧ.

Одним из ингибиторов слияния является пептид 2P23. Ранее в нашей лаборатории была разработана конструкция для поверхностной экспрессии пептидных ингибиторов слияния, в том числе 2P23, в которой пептид включен в состав короткой GPI-заякоренной молекулы CD52 [1]. Однако при встраивании конструкции с 2P23 в геном клеток с помощью системы CRISPR/Cas9 уровень пептида на мембране был низким. Было выдвинуто предположение, что, модифицируя последовательности аминокислот на N- и C-концах пептида, можно добиться увеличения уровня пептида на поверхности.

Для поиска высокоэкспрессирующихся вариантов была создана библиотека с тремя рандомизированными аминокислотами с N- и C-конца пептида 2P23. Для этого был заказан синтез олигонуклеотидов, один из которых содержал рандомизированные участки с NNK-повторами, где N-любой нуклеотид, а K - G или T. Олигонуклеотиды отжигали, достраивали и проводили низкоцикловую ПЦР-амплификацию с внешними праймерами. Далее ПЦР-продукт клонировали в плазмидный лентивирусный вектор. Полученную библиотеку плазмид использовали для наработки псевдовирусных частиц, которыми заражали клоны модифицированных культур НЕК 293Т/CD4/CCR5 и СЕМ/CCR5. После трансдукции клетки окрашивали антителами против 2P23 и оценивали уровень экспрессии пептида на поверхности с помощью проточной цитофлуориметрии. Клетки с экспрессирующейся на поверхности библиотекой пептидов были подвергнуты нескольким раундам сортировки и протестированы в вирусологических тестах.

В результате селекции с реплицирующимся вирусом ВИЧ-1 отобраны устойчивые к инфекции популяции клеток. Полученный с их геномной ДНК ПЦР-продукт будет отправлен на NGS. С помощью биоинформатического анализа данных секвенирования будут определены последовательности пептидов с повышенной экспрессией и потенциально улучшенными защитными свойствами.

Источники и литература

- 1) Maslennikova A. et al. Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41 // mBio. 2022. № 1 (13).