

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Разработка флуоресцентного метода анализа активности интегразы ВИЧ-1 и скрининга потенциальных ингибиторов 3'-процессинга

Анисенко Андрей Николаевич

Студент

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

E-mail: a_anisenko@mail.ru

Интеграза – один из ключевых ферментов жизненного цикла ретровирусов, осуществляющий реакцию встраивания вирусной кДНК в геном инфицированной клетки, поэтому изучение данного фермента имеет большое значение для разработки новых методов лечения ВИЧ-инфекции.

Интеграза осуществляет две последовательные реакции: отщепление динуклеотида с 3'-конца обеих цепей вирусной кДНК (3'-процессинг) и последующее встраивание вирусной кДНК в ДНК клетки-хозяина (перенос цепи). В настоящее время для изучения активности интегразы ВИЧ-1 и поиска ее ингибиторов *in vitro*, как правило, используют радиоактивно-меченый ДНК-субстрат. Продукты реакций, катализируемых интегразой, анализируют методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией. Подобная методика обладает рядом недостатков: работа связана с радиоактивными препаратами, производительность этого метода довольно низкая, что обусловлено длительным экспериментом, включающим несколько стадий: приготовление меченого субстрата; проведение реакций, осуществляемых интегразой; разделение продуктов методом гель-электрофореза; детекция радиоактивных продуктов реакции. В нашей работе был предложен новый метод, основанный на использовании флуоресцентно-меченого субстрата и позволяющий анализировать протекание 3'-процессинга в режиме реального времени.

Мы обнаружили эффект разгорания флуоресценции при формировании двухцепочечного субстрата интегразы, содержащего флуоресцеин на 3'-конце процессируемой цепи. При осуществлении реакции 3'-процессинга интегразой наблюдается тушение флуоресценции, вызванное отщеплением содержащего флуоресцеин динуклеотида. С использованием данных литературы дано теоретическое объяснение наблюдаемым эффектам. Было проведено изучение кинетики накопления продукта 3'-процессинга, а также тестирование ряда известных ингибиторов двумя способами: методом гель-электрофореза с использованием радиоактивно-меченого субстрата и по изменению флуоресценции. Показано, что кинетика 3'-процессинга и значения IC₅₀ для известных ингибиторов, полученные по данным двух различных методов, обладают высокой степенью корреляции. Таким образом, в работе впервые показано, что по изменению флуоресценции ДНК-субстрата интегразы можно следить за протеканием 3'-процессинга и анализировать эффективность ингибиторов этого процесса. С использованием предложенного нами метода были протестированы две серии соединений и обнаружены новые ингибиторы интегразы с IC₅₀ около 10 мкМ.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-01586.