

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Структурно-функциональные особенности взаимодействия интегразы ВИЧ-1 с клеточным белком Ku70

Анисенко Андрей Николаевич

Студент

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

E-mail: a_anisenko@mail.ru

Одной из основных проблем в борьбе с ВИЧ-инфекцией является быстрое возникновение устойчивых форм вируса к лекарственным средствам на основе ингибиторов вирусных ферментов. Поэтому перспективным направлением является разработка ингибиторов, предотвращающих формирование функционально-значимых комплексов вирусных ферментов с клеточными белками. Однако, для этого необходимо понимать механизм этих взаимодействий и структуру комплексов. Недавно стало известно, что вирусный фермент интегразы (ИН) образует комплекс с клеточным белком Ku70, что предотвращает протеосомную деградацию ИН. Целью представленной работы является изучение структурно-функциональных особенностей комплекса IN/Ku70.

Нами были получены прокариотические конструкции для экспрессии интегразы (полноразмерный белок (IN_wt), каталитическая субъединица с С-концевым фрагментом (IN_CC) и С-концевой фрагмент (IN_C)) и белка Ku70 (полноразмерный (Ku70_wt), N-концевой фрагмент с ДНК-связывающей петлей и частью с-концевого фрагмента (Ku70_del1), N-концевой фрагмент с ДНК-связывающей петлей (Ku70_del2)). Была оптимизирована процедура наработки и выделения из клеток *E.coli* полноразмерного белка Ku и его делеционных мутантов, что позволило нам снизить уровень протеолиза белков и достичь максимального выхода растворимых форм белка. Получение очищенных препаратов осуществляли хроматографией на аффинных колонках (Ni-NTA- или глутатион-сефароза). С полученными белками были проведены эксперименты по связыванию методами His6-tag или GST-преципитации.

В наших условиях IN_wt проявляла наибольшее сродство по отношению к делеционному мутанту Ku70_del2. Константа диссоциации данного комплекса составила 70 ± 13 нМ. Для остальных вариантов Ku70_wt и Ku70_del1 аффинность к полноразмерной интегразе была ниже. Также было установлено, что С-концевой фрагмент интегразы взаимодействует с Ku70 (в том числе и с делеционным мутантом Ku_del2) слабее, чем белок дикого типа. При этом, Ku_del2 начинал взаимодействовать с С-концевым фрагментом интегразы при более низких концентрациях по сравнению с полноразмерным Ku70.

Таким образом, можно заключить, что С-концевой фрагмент интегразы, использованный в данной работе, не достаточен для формирования нативного комплекса ИН/Ku70. В связи с этим мы планируем увеличить данный фрагмент до минимального необходимого и достаточного участка. Со стороны Ku70 для формирования прочного комплекса с интегразой ВИЧ-1 достаточным является N-концевой фрагмент, включающий в себя ДНК-связывающую петлю.

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-00833_a.