

Роль белка AP4 в Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1

Пономарёва Татьяна Юрьевна

Студент (специалист)

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

E-mail: tanyaponomareva2001@mail.ru

Исследование белков, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1, крайне важно, так как более глубокое понимание механизмов регуляции транскрипции позволит разработать новые стратегии терапии ВИЧ-1. Ранее в нашей лаборатории было показано, что снижение уровня любой из субъединиц белкового комплекса Ku, состоящего из Ku70 и Ku80, приводит к репрессии транскрипции с промотора ВИЧ-1. При анализе протеомов клеток дикого типа и с нокаутом гена Ku70 было обнаружено, что снижение уровня Ku70 приводит к повышению уровня фактора транскрипции AP4, который, согласно опубликованным данным, является негативным фактором транскрипции с промотора ВИЧ-1. Целью данной работы стала проверка предположения, что повышение уровня AP4 определяет негативное влияние подавления Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

В процессе исследования с помощью Вестерн-блота было подтверждено, что при снижении как уровня Ku70, так и Ku80 посредством нокаута и нокадауна уровень AP4 увеличивается в 1.5-2 раза. Далее было изучено влияние суперэкспрессии AP4 на экспрессию люциферазы под контролем промотора LTR ВИЧ-1 с репортерного вектора pGL3-LTR в клетках НЕК 293Т. Кроме репортерного вектора с промотором дикого типа (LTR-wt), был также использован его делеционный вариант, в котором отсутствовал предполагаемый сайт посадки фактора AP4 в промоторе LTR (LTR-DAP4). Оказалось, что суперэкспрессия AP4 значительно подавляет транскрипцию с промотора LTR-wt в дозозависимом манере, а влияние на промотор LTR-DAP4 менее значительно и не зависит от степени суперэкспрессии AP4. Таким образом, белок AP4 является негативным фактором транскрипции ВИЧ-1 и в нашей клеточной линии. Далее мы проверили, как влияет нокаут и нокадаун Ku70 на экспрессию репортера с промотора ВИЧ-1 LTR-wt и его делеционного варианта LTR-DAP4. При подавлении Ku70 транскрипция с делеционного варианта репортерного вектора уменьшается также, как и с репортерного вектора дикого типа. Кроме того, была проведена иммунопреципитация хроматина в клетках дикого типа и в клетках с нокаутом Ku70, трансфицированных репортерным вектором pGL3-LTR. Было выяснено, что уровень AP4, ассоциированного с промотором ВИЧ-1 дикого типа, при нокауте Ku70 не увеличивается, а даже немного уменьшается. Таким образом, результаты проделанных экспериментов свидетельствуют о том, что повышение уровня AP4 при нокауте и нокадауне Ku не объясняет репрессию с промотора ВИЧ-1.