

**Оценка эффектов производных пирроло[1,2-А]хинолина на репарацию  
двухцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного объединения концов  
(ННЕJ)**

**Научный руководитель – Анисенко Андрей Николаевич**

*Гаркуль Лидия Дмитриевна*

*Студент (специалист)*

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

*E-mail: lida.inbox@gmail.com*

Современная терапия ВИЧ-1 в основном направлена на ингибирование вирусных ферментов. Проблемой такого подхода является возникновение лекарственно устойчивых штаммов вируса, приводящих к необходимости постоянной смены препаратов. Сегодня в качестве альтернативного подхода рассматривается применение ингибиторов, препятствующих взаимодействию вирусных и их клеточных белков-помощников. Ранее нами было показано, что взаимодействие интегразы ВИЧ-1 с клеточным белком Ku70 важно для успешного завершения ранних этапов репликации ВИЧ-1. Этот комплекс регулирует процесс постинтеграционной репарации ВИЧ-1 [1]. Такой тип ингибиторов, предотвращающих взаимодействие вирусных и клеточных белков, пока не нашел клинического применения. Одной из причин этого является недостаточное понимания механизма взаимодействий вирусных ферментов с клеточными, в связи с чем такие ингибиторы могут нарушать клеточные функции белка-партнера вирусного фермента. Ранее мы показали, что производные пирроло[1,2-А]хинолина эффективно нарушают взаимодействие интегразы и клеточного белка Ku70. Целью данной работы является изучение влияния наиболее активного соединения (далее s17) на клеточные функции Ku70, а именно, его эффект на репарацию двухцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного объединения концов (ННЕJ).

Для проверки активности Ku70 в присутствии ингибитора использовались два методологических подхода.

Первый эксперимент подразумевает оценку кинетики восстановления индуцированных двухцепочечных разрывов ДНК в присутствии s17. Клетки инкубировались в присутствии этопозида в течение одного часа. Далее клетки отмывали от этопозида и оставляли на разное время в среде, содержащей DMSO, тестируемое соединение s17 или ингибитор ННЕJ (Nu7441). Уровень повреждений ДНК в этих клетках оценивали с помощью метода электрофореза единичных клетках (comet assay).

Во втором эксперименте оценивали общую эффективность функционирования ННЕJ-пути. Для этого клетки НЕК293Т трансфецировали вектором, кодирующий репортер GFP, последовательность которого разделена 41 нуклеотидной вставкой, которая мешает экспрессии репортера. Совместно с репортером в эти клетки вносились плазмиды, кодирующие гидовые РНК к 41-нуклеотидной вставке и Cas9-нуклеазу. Cas9 вносит разрывы в репортер, восстановление целостности которого по ННЕJ-пути приводит к экспрессии GFP. Трансфецированные клетки инкубировали 2 дня в присутствии s17, Nu7441 или контрольной среде с DMSO. Количество позитивных клеток оценивалось на проточном цитофлуометре.

Результаты обоих экспериментов не показали статистических различий между клетками в обычной среде и клетками, которые инкубировались в присутствии s17, однако, было обнаружено подавление ННЕJ-пути ингибитором Nu7441, что подтверждает работоспособность выбранных методов. Данные результаты говорят об отсутствии негативного эффекта s17 как на кинетику, так и на эффективность ННЕJ-пути.

**Источники и литература**

- 1) Knyazhanskaya, E., Anisenko, A., Shadrina, O. et al. NHEJ pathway is involved in post-integrational DNA repair due to Ku70 binding to HIV-1 integrase.