

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-282

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
И РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ПРОТЕАЗЫ ВИЧ-1,
ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА ***

**DETERMINATION OF THE AMINO ACID SEQUENCE AND DEVELOPMENT
OF A PRODUCER FOR THE MUTANT VARIANT OF HIV-1 PROTEASE CIRCULATING
IN THE SIBERIAN FEDERAL DISTRICT**

Б. О. Труфанов, С. В. Беленькая

*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*

V.O. Trufanov, S.V. Belenkaya

*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS
State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo*

✉ trufano8@mail.ru

Аннотация

В мире зарегистрировано около 38 млн людей, живущих с ВИЧ, более 1,4 млн — в России. Антиретровирусная терапия позволяет контролировать развитие заболевания, но из-за высокой изменчивости возникают субтипы вируса [1], устойчивые к существующим лекарствам. Выявлены мутантные формы PRS17 и PRS5B, резистентные к клиническим ингибиторам протеазы ВИЧ-1 [2], что обуславливает необходимость дальнейшего мониторинга циркулирующих субтипов ВИЧ-1.

Abstract

Approximately 38 million people worldwide are living with HIV, with over 1.4 million cases registered in Russia. The use of antiretroviral therapy controls disease progression, but high variability of HIV-1 leads to new viral subtypes [1], some of which exhibit resistance to medications. Mutant forms PRS17 and PRS5B have been identified as resistant to clinical protease inhibitors [2] underscoring the need for monitoring circulating HIV-1 subtypes.

Цель работы — установить нуклеотидные и аминокислотные замены последовательности протеазы ВИЧ-1 в образцах, циркулирующих на территории Сибирского федерального округа, а также получить штаммы-продуценты и разработать протокол выделения и рефолдинга мутантного варианта протеазы ВИЧ-1.

Для достижения поставленной цели были взяты 267 образцов вирусной РНК (предоставлены лабораторией иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), выделенных из сывороток крови людей, зараженных ВИЧ и проживающих на территории Сибирского федерального округа. Для амплификации нуклеотидной последовательности протеазы ВИЧ-1 проводили ОТ-ПЦР на матрице вирусной РНК ВИЧ- с использованием праймеров HIV-F (5'-aaaaaaggatccaggatggtttagaaaaatggcattcc-3'), HIV-R (5'-aaaaaagcggccgcttaaccgctaccacgtgaaaggtaacaccgctacactg-3'). Полученные последовательности были проанализированы на наличие нуклеотидных и аминокислотных замен.

После выявления характерных аминокислотных замен последовательности протеазы ВИЧ-1, представленной на территории Сибирского федерального округа, ее нуклеотидная последовательность была оптимизирована под экспрессию в системе *E. coli* и клонирована по методу Гибсона в составе экспрессионного вектора pET28-HIV, синтезирующего белок SUMO и рекомбинантную протеазу ВИЧ-1 в единой рамке считывания. Амплификацию вектора и последовательности синтезированной протеазы ВИЧ-1 проводили с использованием праймеров pET28-F/pET28-R (5'-TGATAACTCGAGCACCAC -3'/5'- GCCACCAATCTGCTCACGATG -3') и SUMO-HIV-F/SUMO-HIV-R (5' TGAGCAGATTGGTGGCCCGAGATTACCTGTGGAAAC -3'/5'- GTGGTGCTCGAG TTATCAAAAGTTCAAGGTTGCACCAATCT -3') соответственно. В результате был получен вектор pET28-HIV. Так же была получена плазмида, содержащая глицин-сериновый линкер между белком SUMO и рекомбинантной протеазой ВИЧ-1, — pET28_GS_HIV.

Посредством трансфекции клеток *E. Coli* BL21 codon plus описанными плазмидами были получены штаммы-продуценты мутантной формы вирусной протеазы. Был произведен сравнительный анализ способности полученных белков к рефолдингу и переходу в функциональную форму. Анализ показал, что белок, полу-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-75-00117).

© В. О. Труфанов, С. В. Беленькая, 2025

ченный из продуцентов, трансформированных плазмидой pET28-HIV и pET28 _GS_HIV, подвергается рефолдингу, переходя в растворимую форму. Однако штамм, трансформированный плазмидой pET28-HIV, в отличие от штамма, трансформированного плазмидой pET28 _GS_HIV, не образует зрелую протеазу при обработке протеазой SUMO.

Литература

1. Buonaguro L., Tornesello M. L., Buonaguro F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the world-wide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications // *J. Virology*. 2007. Vol. 81, No. 19. P. 10209–10219.
2. Park J. H. et al. Binding of clinical inhibitors to a model precursor of a rationally selected multidrug resistant HIV-1 protease is significantly weaker than that to the released mature enzyme // *Biochem.* 2016. Vol. 55, No. 16. P. 2390–2400.