

Высокопроизводительный скрининг биологической активности новых препаратов, предположительно блокирующих р53-MDM2 взаимодействие

Калинина Марина Александровна

Студент (специалист)

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

E-mail: marinakalinafb@gmail.com

Белок р53 является одним из самых известных онкосупрессоров. Одним из регуляторов активности р53 является р53-специфическая Е3 убиквитин лигаза MDM2, которая подавляет работу р53 в нормальных, не подвергающихся стрессу клетках. В норме в клетке всегда присутствует р53, но MDM2 постоянно его моноубиквитинилирует, тем самым направляя на деградацию в протеосомы. Разрушение конформационного взаимодействия между р53 и MDM2 приводит к увеличению количества р53 в клетках и проявлению его биологических эффектов. Взаимодействие этих белков хорошо изучено как со структурной, так и с биологической точек зрения. Возможно предсказание, направленные синтез и проверка биологического действия препаратов, блокирующих действие MDM2 и активирующих р53.

В данной работе для высокопроизводительного скрининга соединений использовались репортерные клетки легочной аденокарциномы человека A549/LC5, любезно предоставленные П.М. Чумаковым. Эти клетки содержат ген бета-галактозидазы под контролем промотора, содержащего, помимо минимальной последовательности CMV промотора, следующие последовательности: р-53 связывающий элемент из кластера рибосомных генов, консенсусный р53-связывающий элемент и шесть р53-связывающих элементов из мышинового гена р21WAF. Клетки высевались на 96-луночные планшеты и инкубировались с тестовыми соединениями. Затем проводился тест, основанный на способности бета-галактозидазы гидролизовать О-нитрофенил-б-D-галактопиранозид (ONPG) с образованием окрашенного продукта, количество которого измерялось спектрофотометрически с использованием плащечного ридера. Соединения, индуцирующие экспрессию репортера более, чем в 2 раза, считались активаторами р53. Параллельно мы оценивали клеточную токсичность этих соединений с помощью МТТ теста.

Тестирование проводили на роботизированной станции JANUS. Был отработан протокол тестирования с производительностью до 50 препаратов в сутки и проанализированы более 50 соединений (предоставленных кафедрой органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова), была оценена их цитотоксичность и способность к активации р53. Были выделены несколько лидерных соединений (активирующих р53) для дальнейших исследований и модификаций.