

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии гена Российской академии наук

*На правах рукописи*

**Зотова (Шунаева) Анастасия Андреевна**

**Факторы рестрикции и репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 в  
условиях межклеточной трансмиссии**

03.03.03 – Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук  
Мазуров Дмитрий Вячеславович

Доктор биологических наук, профессор  
Филатов Александр Васильевич

Москва, 2019

# Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Общая характеристика вируса ВИЧ-1 .....	13
1.1.2 Жизненный цикл ВИЧ-1 .....	14
1.1.3 Вспомогательные белки ВИЧ-1.....	16
1.1.3.1 Vpr.....	16
1.1.3.2 Vpru.....	17
1.1.3.3 Vif.....	17
1.1.3.4 Nef.....	17
1.2 Факторы рестрикции ВИЧ-1 .....	18
1.2.1 TRIM.....	19
1.2.2 SAMHD1 .....	22
1.2.3 APOBEC3 (CEM15).....	23
1.2.4 MXB.....	25
1.2.5 Schlafen11 (SLFN11) .....	25
1.2.6 MARCH8 (с-MIR).....	26
1.2.7 SERINC3 и SERINC5 .....	26
1.2.8 BST-2 (CD317, Tetherin) .....	27
1.3 Факторы репликации ВИЧ-1 .....	31
1.4 Общая характеристика Т-лимфотропного вируса человека первого типа (HTLV-1).....	32
1.5 Факторы рестрикции и репликации HTLV-1 .....	34
1.6 Способы выявления новых факторов рестрикции и репликации ВИЧ-1 и HTLV-1.....	35
1.6.1 Библиотека нокаутов GeCKO .....	36
1.7 Межклеточная инфекция ретровирусами.....	37
1.7.1 Количественный анализ межклеточной инфекции.....	38
1.8. РНК-интерференция. Использование микро-РНК (miRNA) и коротких РНК, образующих шпильки (shRNA), в генотерапии.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Материалы .....	43
2.1.1 Клеточные культуры.....	43
2.1.2 Бактериальные культуры.....	43
2.1.3 Растворы.....	43
2.1.4 Антитела.....	44
2.1.5 Праймеры и олигонуклеотиды.....	44

2.1.6 Прочие реагенты и материалы, используемые в работе .....	46
2.2 Молекулярно-биохимические методы.....	47
2.2.1 Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК.....	47
2.2.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	47
2.2.3 Приготовление компетентных клеток E.Coli .....	47
2.2.4 Трансформация.....	48
2.2.5 Анализ последовательностей ДНК и РНК.....	48
2.2.6 Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР.....	48
2.2.7 Анализ эффективности сплайсинга репортерной РНК методом количественной ПЦР.....	50
2.2.8 Конструирование плазмид .....	52
2.2.9 Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA).....	55
2.2.10 Вестерн-блоттинг .....	55
2.3. Методы работы с эукариотическими клетками .....	56
2.3.1 Трансфекция и инфекция .....	56
2.3.2 Проточная цитометрия и клеточный сортинг .....	58
2.3.3. Флуоресцентная микроскопия .....	59
2.3.4. Метод SORTS .....	59
2.4 Подготовка образцов на глубокого секвенирования и анализ данных .....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	64
3.1 Усовершенствование интрон-содержащих векторов для оценки уровня межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1 .....	64
3.1.1 Разработка репортерных векторов на основе флуоресцентных белков GFP-turbo и RFP-turbo .....	64
3.1.2 Оптимизация сайта для вставки интрона в последовательность генов-репортеров .....	66
3.1.3 Снижение уровня интрон-содержащей РНК в вирусных частицах при экспрессии интрон-специфичных shRNA.....	69
3.1.4 Модификация интрона последовательностью miR-shR_330 улучшает сплайсинг и экспрессию репортерных векторов. ....	73
3.1.5 Анализ количества клеток, инфицированных двумя или несколькими частицами ВИЧ-1, с использованием новых векторов.....	75
3.2. Репликация дефектного по вспомогательным белкам ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии и при инфекции свободными вирусными частицами.....	77
3.2.1 Получение упаковочных плазмид с мутациями во вспомогательных генах.....	77
3.2.2. Оценка репликации дефектного ВИЧ-1 в нелимфоидных клетках линии НЕК 293Т/CD4/Х4.....	79
3.2.3 Оценка репликации дефектного ВИЧ-1 в лимфоидных клеточных линиях человека.....	83

3.2.4 Делеция в гене vри приводит к увеличению количества клеток, инфицированных несколькими вирусами .....	85
3.2.5 Нокаут по гену BST2 нивелирует увеличение межклеточной инфекции Vри-дефектного ВИЧ-1 в клетках.....	86
3.2.6 Роль BST2 в агрегации вирусных частиц ВИЧ-1 .....	89
3.3 Поиск факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO .....	91
3.3.1 Создание клеточных линий CEM и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов GeCKO ..	91
3.3.2 Оценка качества и полноты переноса библиотеки нокаутов GeCKO в клеточные линии CEM и Raji/CD4. ....	92
3.3.2.1 Определение специфичности моноклонального антитела с помощью библиотеки нокаутов CRISPR-Cas9 .....	95
3.3.3 Поиск факторов репликации вируса HTLV-1. ....	97
3.3.4 Получение нокаутных по гену KPNA1 клеток с помощью метода SORTS и оценка роли KPNA1 в репликации HTLV-1. ....	102
3.3.4.1 Разработка метода SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection) .....	102
3.3.4.2 Оценка роли KPNA1 в репликации HTLV-1. ....	103
3.3.5 Разработка скринингового теста для поиска факторов репликации ВИЧ-1 .....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
ВЫВОДЫ .....	108
БЛАГОДАРНОСТИ .....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность и степень разработанности темы исследования

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1) относятся к семейству ретровирусов и являются патогенными для человека. По разным оценкам, количество инфицированных HTLV-1 составляет от 5 до 10 миллионов человек с эндемичностью распространения преимущественно в Японии, Африке, Южной Америке и странах Карибского бассейна (А. Gessain, О. Cassar, 2012). Вирусом иммунодефицита человека инфицированы более 37 миллионов человек по всему миру (Н. Dutartre и др., 2016). Несмотря на то, что ВИЧ-1 и HTLV-1 относятся к одному и тому же семейству РНК-содержащих ретровирусов и заражают преимущественно CD4 Т-лимфоциты, инфицирование приводит к развитию различных иммунопатологических процессов. ВИЧ-1 снижает число CD4 Т-клеток, что в конечном итоге является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИДа). HTLV-1, напротив, после долгого латентного периода вызывает бесконтрольную пролиферацию зараженных Т-лимфоцитов и развитие острого Т-клеточного лейкоза с неблагоприятным прогнозом. В некоторых случаях, у людей, инфицированных вирусом HTLV-1, развивается воспалительный аутоиммунно-дегенеративный процесс в спинном мозге под названием HTLV-1-ассоциированная миелопатия, или тропический спастический парапарез (tropical spastic paraparesis, TSP) (А. Gessain и др., 1985; К. Takatsuki, 2005).

Факторы рестрикции представляют собой клеточные белки, способные подавлять вирусную репликацию. К наиболее изученным факторам рестрикции ВИЧ-1 относятся белки семейств APOBEC3 (К.N. Bishop и др., 2008; R.S. Harris и др., 2003; А.М. Sheehy и др., 2002), TRIM (D.M. Sayah и др., 2004; M. Stremlau и др., 2004; M. Stremlau и др., 2006), IFITM (А.L. Brass и др., 2009), SAMHD1 (А. Berger и др., 2011; D.C. Goldstone и др., 2011; К. Hrecka и др., 2011), BST2 (S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2008; D. Sauter, A. Specht, F. Kirchhoff, 2010), Serinc3/5 (Y. Usami, Y. Wu, H.G. Göttlinger, 2015) и MX2 (С. Goujon и др., 2013; M. Kane и др., 2013; Z. Liu и др., 2013). Многие из них были обнаружены как белки-партнеры вспомогательных белков Vpr, Vpu, Vif и Nef ВИЧ-1, а также Vpx ВИЧ-2. Несмотря на существование целого ряда факторов рестрикции, противодействующих ВИЧ на разных этапах его репликации, вирус, тем не менее, успешно реплицируется в клетках. Это связано с тем, что ВИЧ в процессе эволюции выработал механизмы, эффективно нейтрализующие действие факторов рестрикции путем экспрессии акцессорных (или иначе, вспомогательных) вирусных белков.

В отличие от инфекции свободными вирусными частицами (классический путь передачи), инфицирование ВИЧ-1 в культуре клеток происходит гораздо более эффективно (D.S. Dimitrov и др., 1993). HTLV-1 передается исключительно через межклеточный контакт: было показано, что сыворотки крови от больных HTLV-1 являются неинфекционными (A. Gessain, O. Cassar, 2012). Интересно, что некоторые факторы рестрикции действуют по-разному в зависимости от способа передачи вируса. Так, по-прежнему открытым остается вопрос о роли BST-2 в межклеточной передаче ВИЧ. С одной стороны, показано ингибирующее влияние BST-2 на передачу инфекции от клетки к клетке (F.P. Blanchet и др., 2013; N. Casartelli и др., 2010; S. Giese, M. Marsh, 2014; B.D. Kuhl и др., 2010); с другой стороны, есть данные о том, что при межклеточной трансмиссии вируса BST-2, напротив, приводит к более эффективному заражению клеток за счет того, что способствует скоплению вирусных частиц на поверхности инфицированной клетки и их передаче через образовавшийся прямой контакт с клеткой-мишенью (C.M. Coleman, P. Spearman, L. Wu, 2011; C. Jolly, N.J. Booth, S.J.D. Neil, 2010; P. Zhong и др., 2013).

В отличие от факторов рестрикции, факторы репликации обеспечивают пермиссивность клетки для размножения вируса: без них репликация в клетке или невозможна, или малоэффективна (A.L. Brass и др., 2008; R.J. Park и др., 2017). К ним относятся, например, рецепторы на мембране, которые вирус использует для проникновения в клетку: CD4 и CXCR4/CCR5 в случае ВИЧ-1, GLUT-1 и NRP-1 в случае HTLV-1. С развитием технологии глубокого секвенирования и полногеномных исследований стали появляться огромные массивы данных, полученные в результате siРНК-, shРНК- и CRIPSR/Cas9-скринингов в целях обнаружения факторов репликации (A.L. Brass и др., 2008; R. König и др., 2008; D.G. Nguyen и др., 2007; R.J. Park и др., 2017; H. Zhou и др., 2008). Это позволяет открывать новые и интересные с клинической точки зрения белки, играющие роль в репликации ретровирусов.

Антиретровирусная терапия (АРТ) позволяет контролировать титр вируса, однако не способна полностью элиминировать вирус из организма пациента в силу интеграции провирусной ДНК в геном и латентного состояния инфекции. Понимание того, как клетка отвечает на проникновение ВИЧ и HTLV-1 и какие клеточные белки так или иначе участвуют в этом, может способствовать разработке лекарств, направленных на новые клеточные мишени.

В данной работе рассмотрены эффекты делеций вирусных вспомогательных белков, противодействующих факторам рестрикции, на репликацию вируса в разных условиях трансмиссии ВИЧ-1, показана роль фактора рестрикции BST2 в межклеточной инфекции, а также представлены данные по поиску факторов репликации, полученные в

результате скрининга библиотеки нокаутов GeCKO в тестах репликации ВИЧ-1 и HTLV-1, специально разработанных нами для этих целей.

### **Цель и задачи**

**Целью работы** являлось изучение факторов рестрикции ВИЧ-1 в условиях межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, а также разработка скринингового теста для поиска факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Разработать новые интрон-содержащие репортерные векторы на основе люциферазы и флуоресцентных белков с улучшенным сплайсингом и экспрессией для оценки уровня межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1;
- 2) Изучить репликацию ВИЧ-1, дефектного по вспомогательным белкам, в условиях межклеточной трансмиссии и при инфекции свободными вирусными частицами;
- 3) Изучить роль фактора рестрикции BST2 в межклеточной передаче ВИЧ-1;
- 4) Трансдуцировать лимфоидные клетки человека CEM и Raji/CD4 библиотекой нокаутов GeCKO, оценить качество и полноту переноса библиотеки. Продемонстрировать возможности библиотеки нокаутов GeCKO для идентификации белков на примере определения мишени моноклонального антитела с неизвестной специфичностью;
- 5) Разработать инфекционные тесты для скрининга библиотеки GeCKO и на их основе провести поиск факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1;
- 6) Создать методику для селекции клеток, нокаутных по внутриклеточным белкам, и с помощью нее получить и охарактеризовать нокауты по отдельным генам, выявленным в ходе скрининга.

### **Научная новизна работы**

Были получены усовершенствованные интрон-регулируемые векторы, позволяющие с высокой чувствительностью измерять уровень межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1, не отделяя клетки-продуценты от клеток-мишеней. Векторы на основе белков GFP и mCherry позволили впервые оценить множественность инфицирования ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии вируса. Проведен сравнительный анализ репликации ВИЧ-1, дефектного по одному из вспомогательных белков, в условиях межклеточного контакта и инфекции свободным вирусом. Была исследована роль BST2-опосредованной рестрикции ВИЧ-1 в разных условиях; было показано, что при межклеточной трансмиссии BST2 не только не снижает инфекцию ВИЧ-1, как это

наблюдается при инфицировании выделенными вирусными частицами, но напротив, способствует усилению репликации ВИЧ-1 и, что не менее важно, увеличивает вероятность инфицирования клеток-мишеней двумя и более вирусными частицами. Полученные результаты подчеркивают неоднозначную роль факторов рестрикции в биологии ВИЧ-1, эффекты которых зависят от пути трансмиссии вируса.

В работе также представлены результаты скрининга библиотеки нокаутов GeCKO в целях поиска факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1. Выявлены некоторые интересные кандидатные гены, важные для репликации HTLV-1, такие как KPNA1, KPNA4 и GAPR1, роль которых в биологии данного вируса ранее не была установлена.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные в диссертационной работе результаты расширяют наши знания о молекулярных механизмах взаимодействия ретровирусов человека с клетками хозяина и открывают новые пути лекарственного воздействия на репликацию вируса.

Выявленная относительная резистентность ВИЧ-1 с делецией по вспомогательным генам *Vpr* и *Nef* к действию рестрикционных факторов в условиях межклеточной трансмиссии указывает на важность этого механизма распространения инфекции для ускользания вируса от клеточной защиты. Тот факт, что ВИЧ-1 с делецией по гену *Vpr* имеет тенденцию к повышению инфицирования клетки несколькими вирусными частицами говорит о том, что межклеточная трансмиссия может быть источником формирования новых рекомбинантных форм ВИЧ и дополнительной резистентности вируса к лекарствам.

С методической стороны были получены усовершенствованные векторы для детекции репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 в условиях сокультивирования клеток, в том числе на основе флуоресцентных белков. На базе полученных векторов и других подходов разработаны скрининговые инфекционные тесты для поиска факторов репликации ретровирусов человека с использованием библиотеки геномных нокаутов GeCKO. Написаны программы для обработки биоинформатических данных. Все это может служить методическим пособием по работе с нокаутными библиотеками CRISPR/Cas9 и его частного применения в ретровирусологии.

Выявленные нами в результате скрининга гены-хиты могут служить основой для дальнейших многочисленных исследований в области взаимодействия клеток хозяина с ретровирусом, а также потенциальной возможностью описать новые и интересные молекулярные мишени антиретровирусной терапии.



## **Методология и методы исследования**

Оценку межклеточной репликации ретровирусов человека, а также инфекции свободным вирусом проводили по оригинальной методике с использованием разработанных нами интрон-регулируемых векторов inLuc, inGFPt и inmCherry. Векторы сконструированы таким образом, что экспрессия полноценного белка-репортера не происходит в результате трансфекции, а возможна только после инфицирования клеток-мишеней. Это позволяет не отделять клетки-продуценты вирусных частиц от клеток-мишеней и измерять уровень инфекции в клеточной смеси. В зависимости от репортера, инфекцию оценивали по люминесценции или с помощью проточной цитометрии. Продукцию вирусных частиц оценивали в иммуноферментном анализе, результаты которого использовали для нормализации данных инфекции. Работа проводилась на нелимфоидной клеточной линии НЕК 293Т и на лимфоидных клетках человека СЕМ, Jurkat, Raji/CD4, MT2. Нокаутные культуры клеток получали с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9.

Для скрининга библиотеки нокаутов ее переносили на клеточную линию с помощью лентивирусной трансдукции. Качество приготовления клеточных библиотек, т.е. полнота переноса и разнообразие оценивали методом глубокого секвенирования. Использовалась библиотека нокаутов GeCKO в виде лентивирусного вектора, кодирующего эндонуклеазу Cas9, библиотеку гидовых РНК и ген устойчивости к пурамицину. Библиотека содержит 108 480 последовательностей гидовых РНК, специфичных к 18 080 активно транскрибируемым генам. Анализ данных глубокого секвенирования проводили с помощью программного обеспечения MAGeCK и нескольких самостоятельно написанных программ на языке программирования Python.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Усовершенствование интрон-содержащих репортерных векторов путем оптимизации сплайсинга и деградации несплайсированной РНК существенно увеличивает чувствительность измерения уровней межклеточной репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 и открывает возможности для более глубокого изучения механизмов межклеточной трансмиссии ретровирусов человека.
2. ВИЧ-1 использует механизмы межклеточной трансмиссии для эффективной репликации в условиях воздействия клеточных факторов рестрикции.
3. Фактор рестрикции BST2 обуславливает эффективную межклеточную трансмиссию ВИЧ-1 за счет кластеризации вирусных частиц на поверхности клеток.

4. Библиотека нокаутов GeCKO может использоваться для определения антигенной специфичности моноклональных антител.

5. Разработка алгоритма скрининга библиотеки нокаутов GeCKO в инфекционных тестах ВИЧ-1 и HTLV-1 и последующего анализа данных высокопроизводительного секвенирования ДНК позволяют выявить клеточные факторы, участвующие в репликации ретровирусов человека.

6. Нок-ин в целевой ген короткого эпитопного тага, экспрессирующегося на поверхности клетки, позволяет быстро отсортировать клетки с полным нокаутом по внутриклеточному или секретируемому белку.

#### **Личный вклад автора**

Основные результаты работы были получены автором или при его участии. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании текста диссертации. Имена соавторов обозначены в тексте работы и указаны в соответствующих публикациях.

#### **Степень достоверности**

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием различных современных методов молекулярной биологии и биохимии. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 7 тезисов. Используемые в работе методы исследования, проведенные расчеты и статистическая обработка данных являются общепризнанными и корректными, что позволяет говорить о достоверности представленных научных результатов.

#### **Апробация результатов и публикации**

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях: на международной конференции NIH – RFBR Collaborative Research Partnership: Meeting to Identify Scientific Priorities for U.S.-Russia Research Collaboration in the Prevention and Treatment of HIV/AIDS Co-Morbidities and Workshop for Early-Career Investigators, Санкт-Петербург, 13-15 апреля 2016; XV научная всероссийская конференция молодых ученых «Иммунология сегодня: традиции и инновации», Москва, 22 апреля 2016; международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 20-22 февраля 2017г., Москва; форуме молодых ученых 17th FEBS YSF 7-10 сентября 2017г и на международном конгрессе 42nd FEBS

Congress, 10-14 сентября, Иерусалим, Израиль; на международном конгрессе "CRISPR-2018", Новосибирск, 10-14 сентября 2018 года, конференции молодых учёных «Ломоносов» 8-12 апреля 2019 г.

**Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:**

1. **Shunaeva A**, Potashnikova D, Pichugin A, Mishina A, Filatov A, Nikolaitchik O, Hu WS, Mazurov D. Improvement of HIV-1 and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Replication-Dependent Vectors via Optimization of Reporter Gene Reconstitution and Modification with Intronic Short Hairpin RNA. // *J. Virol.* 2015. Т. 89. № 20. С. 10591–601. ИФ 4,16 (Q1).

2. **Zotova A**, Zotov I, Filatov A, Mazurov D. Determining antigen specificity of a monoclonal antibody using genome-scale CRISPR-Cas9 knockout library. // *J. Immunol. Methods.* 2016. Т. 439. С. 8–14. ИФ 1,91.

3. **Zotova A.**, Atemasova A., Pichugin A., Filatov A., Mazurov D. Distinct Requirements for HIV-1 Accessory Proteins during Cell Coculture and Cell-Free Infection. // *Viruses.* 2019. Т. 11. № 5. E390. ИФ 3,76 (Q1).

4. **Zotova A.**, Pichugin A., Atemasova A., Knyazhanskaya E., Lopatukhina E., Mitkin N., Holmuhamedov E., Gottikh M., Kuprash D., Filatov A., Mazurov D. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags. // *Sci. Rep.* 2019. Т. 9:3132. ИФ 4,122.(Q1).

5. **Зотова А.А.**, Атемасова А.А., Филатов А.В., Мазуров Д.В. Факторы рестрикции вируса иммунодефицита человека и их неоднозначная роль в инфекции. // *Молекулярная биология.* 2019. Т. 53. № 2. С. 240–255. ИФ 0,977.

**Тезисы конференций:**

1. **Шунаева А.** «Создание усовершенствованных векторов для оценки уровня межклеточной инфекции HIV-1 и HTLV-1 путем оптимизации сплайсинга репортерной РНК и модификации интрона shRNA». // Сборник конференции «Ломоносов 2015» (Москва, 13-17 апреля 2015).

2. **Шунаева А.**, Мазуров Д. «Репликация мутантного по аксессуарным генам ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии и инфекции свободным вирусом». // *Материалы докладов XV научной конференции молодых ученых «Иммунология сегодня: традиции и инновации»* (Москва, 22 апреля 2016). С. 18-19.

3. **Зотова А.**, Мазуров Д., Филатов А. “Определение специфичности моноклонального антитела с помощью библиотеки нокаутов CRISPR-CAS9”. // Сборник материалов международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 20-22 февраля 2017). Т.1. С. 256-257.

4. **Zotova A.**, Mazurov D. “GeCKO library screening for identification of cellular factors critical for HTLV-1 replication”. // The FEBS Journal. 2017. Т. 284 (S1). С. 82. ИФ 4,75.

5. **Зотова А.А.**, Атемасова А.А., Лопатухина Е.В., Взоров А.Н., Филатов А.В., Мазуров Д.В. «Поиск факторов репликации HIV-1 и HTLV -1 с помощью скрининга библиотеки нокаутов GeCKO» // Международный конгресс CRISPR-2018 (Новосибирск, 10-14 сентября 2018). «Гены и Клетки». 2018. Т. 13. № 2-2, С. 33. ИФ 0,645.

6. Атемасова А.А., **Зотова А.А.**, Лопатухина Е.В., Мазуров Д.В. «Поиск факторов репликации HTLV-1 с помощью скрининга библиотеки нокаутов GeCKO». // Сборник материалов X Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 23-25 мая 2018). С.75.

7. **Зотова А.** Атемасова А. «BST2 как фактор рестрикции ВИЧ-1 и его роль в межклеточной трансмиссии». // Сборник конференции «Ломоносов 2019» (Москва, 8-12 апреля 2019).

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Общая характеристика вируса ВИЧ-1

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) принадлежит к семейству Retroviridae, роду Lentivirus с длительным инкубационным периодом. ВИЧ включает следующие виды: ВИЧ-1, наиболее распространенный и патогенный, и ВИЧ-2, отличающийся от ВИЧ-1 по строению и патогенному действию. Различают четыре группы ВИЧ-1: М (major, основная), N (non-M, non-O – ни М, ни О), О (outlier, непохожий) и Р (putative, предполагаемый). В настоящее время считается, что ВИЧ-1 группы М произошел от вируса иммунодефицита (SIV) шимпанзе в начале XX века (Р.М. Sharp, В.Н. Hahn, 2011). Более 70 млн. человек инфицировано ВИЧ-1 группы М и для 30 млн. это заболевание уже привело к летальному исходу. ВИЧ-1 других групп (N, O, P) также произошел от SIV (шимпанзе в случае группы N и гориллы в случае групп O и P), но гораздо реже встречается у людей. ВИЧ-1 группы O найден примерно у 100 тыс. жителей Камеруна и близлежащих стран (Т. Mourez, F. Simon, J.-C. Plantier, 2013), вирус N и P групп обнаружен только у нескольких человек (J.C. Plantier и др., 2009; A. Vallari и др., 2011; A. Vallari и др., 2010).

Схема строения ВИЧ представлена на рис. 1. Вирсоны обладают сферической формой диаметром 100-120 нм. Вирус покрыт оболочкой, из которой выступают шипы грибовидной формы. Их наружная часть образована белком оболочки gp120, а прилегающие к мембране и трансмембранные части — белком gp41. Шипы – это тримеры молекул gp120 и gp41. Иммунный ответ носителя вируса направлен в основном против них. Глубже расположен слой матрикса, он выполняет роль каркаса. В центре вириона находится конусообразный капсид, в котором содержится геномная РНК (2 молекулы). Здесь же расположены и ферменты: обратная транскриптаза (p66/p51), интеграз (p31–32), протеаза (p10) и РНКаз (p15).

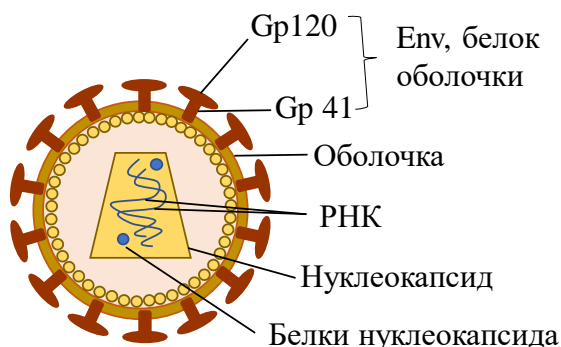
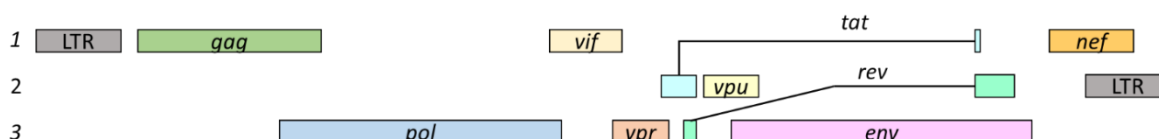


Рисунок 1. Схема строения ВИЧ-1

После расшифровки нуклеотидной последовательности ВИЧ-1 стало очевидно, что его геном устроен намного сложнее, чем многих ретровирусов животных. Две молекулы односпиральной РНК содержат 9 генов, кодирующих 15 белков ВИЧ (рис.2). Последовательности, кодирующие структуры вируса, ограничены с 5'- и 3'-концов длинными концевыми повторами (LTR, Long terminal repeats). Структурные и регуляторные гены частично перекрываются. Основных структурных гена 3 — *gag*, *pol* и *env*. Ген *gag* кодирует белки нуклеоида и матрикса. Ген *pol* кодирует ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу). Ген *env* кодирует белки оболочки.

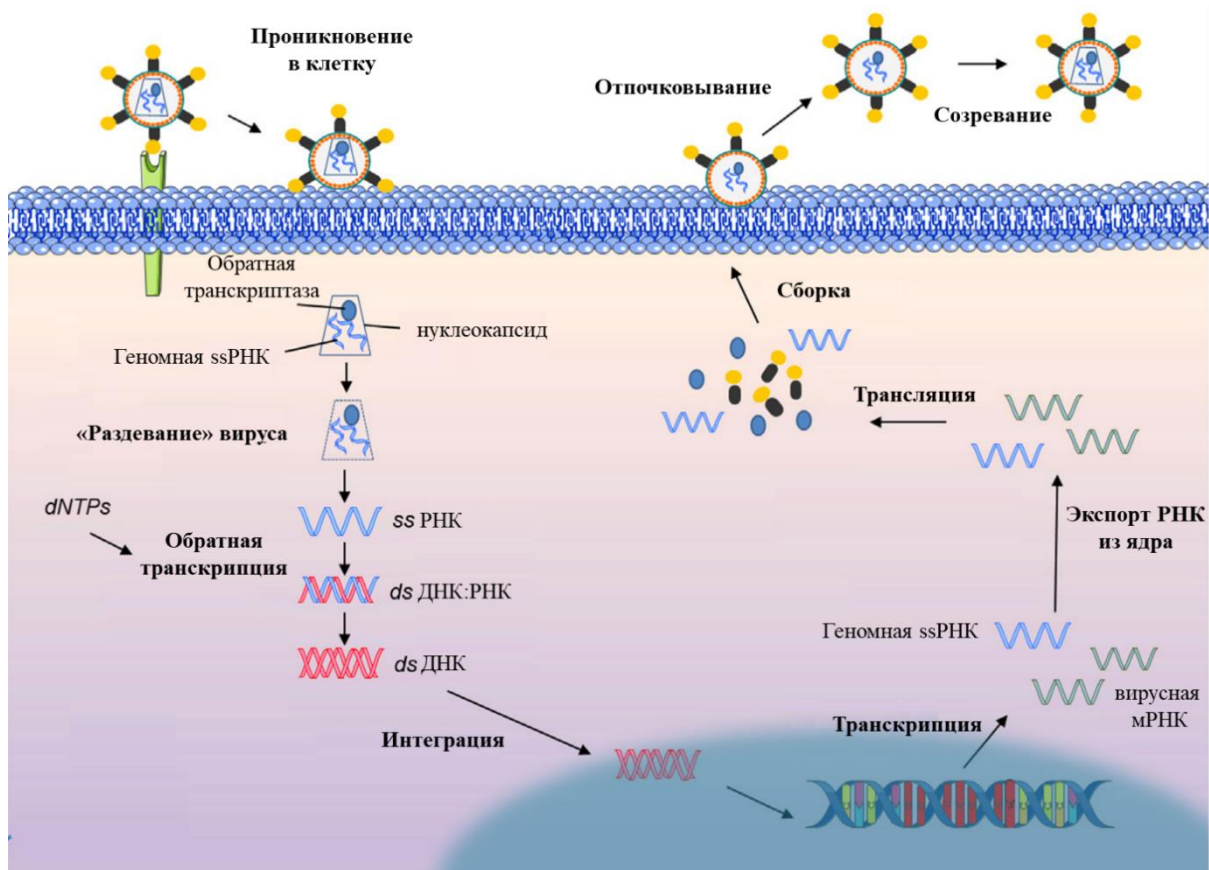


**Рисунок 2. Структура генома ВИЧ-1**

В 3'-области генома ВИЧ-1 обнаружены открытые рамки считывания, не характерные для других представителей семейства. Здесь закодированы регуляторные белки Tat и Rev и вспомогательные белки Vif, Vpr, Vpu и Nef (у вируса ВИЧ-2 к ним также относится Vpx). Tat и Rev необходимы ВИЧ-1 для репликации во всех клетках хозяина: они запускают транскрипцию генов с провирусной ДНК и обеспечивают транспорт РНК вируса из ядра в цитоплазму. Вспомогательные, или акцессорные, белки необходимы для репликации лишь в некоторых типах клеток, хотя их основной функцией принято считать противодействие клеточным механизмам противовирусной защиты.

### 1.1.2 Жизненный цикл ВИЧ-1

Жизненный цикл ретровирусов можно разделить на несколько этапов. Для проникновения ВИЧ-1 в клетку необходимо взаимодействие белка оболочки Env с рецепторами на поверхности клетки: gp120 связывается с рецептором CD4, после чего происходят конформационные изменения, в результате которых gp120 связывается с ко-рецептором CXCR4 или CCR5 (К.Т. Arrildt, S.B. Joseph, R. Swanstrom, 2012). Выбор ко-рецептора определяет тропность вируса: X4- или R5-тропный. После связывания с рецепторами происходит слияние мембраны вируса и клетки при участии молекулы gp41. Нуклеокапсид вируса оказывается в цитоплазме клетки (рис. 3).



**Рисунок 3. Жизненный цикл ВИЧ-1** (по N. Van Montfoort с соавт., 2014 с изменениями)

Далее, в ходе реакции обратной транскрипции синтезируется вирусная ДНК. Ключевой фермент этой реакции – обратная транскриптаза – привносится в цитоплазму в составе нуклеокапсида и обладает двумя активностями: ДНК-полимеразной и активностью рибонуклеазы H (А. Telesnitsky, S. Goff, 1997). В результате, на основании РНК-матрицы синтезируется ДНК при помощи праймеров и клеточного пула dNTP, после чего в РНК:ДНК дуплексе расщепляется РНК. ДНК мигрирует затем в ядро, где интегрируется в геном клетки в качестве провируса при участии вирусного белка интегразы.

Транскрипцию интегрированного провируса осуществляет клеточный фермент РНК-полимераза II в присутствии факторов транскрипции, в том числе NF-κB, и вирусного транс-активатора Tat (А. Roulston и др., 1995). Вирусные транскрипты разделяются на несколько типов: несплайсированная вирусная РНК, которая служит матричной РНК для трансляции продуктов генов *gag-pol*, а также геномной РНК, которая попадает в незрелые вирусные частицы; частично и полностью сплайсированная РНК, являющаяся матричной РНК для синтеза белка оболочки Env, регуляторных белков Tat и Rev, а также вспомогательных белков Vpr, Vrc, Vif и Nef. Сборка вирионов осуществляется в

специфических сайтах плазматической мембраны, в липидных рафтах, где вирус отпочковывается от клетки, забирая часть мембраны в качестве своей липидной оболочки (J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus, 1997).

### 1.1.3 Вспомогательные белки ВИЧ-1

Гены *vpr* (*vpx* у ВИЧ-2), *vpu*, *vif*, *nef* кодируют вспомогательные белки ВИЧ. В *in vitro* экспериментах наличие вспомогательных белков далеко не всегда является обязательным атрибутом успешной репликации вируса, однако *in vivo* данные белки позволяют ВИЧ обходить некоторые механизмы противовирусной защиты, маскируясь от иммунной системы хозяина. Многие клеточные факторы рестрикции ВИЧ были найдены при исследовании роли вспомогательных белков. Далее будут рассмотрены основные функции вспомогательных белков ВИЧ-1.

#### 1.1.3.1 Vpr

Vpr (viral protein R) представляет собой небольшой белок размером 14кДа, состоящий из 96 аминокислотных остатков (L.K. Felzien и др., 1998; B. Müller и др., 2000). Взаимодействие Vpr с доменом р6 структурного белка Gag приводит к тому, что Vpr попадает в вирионы ВИЧ-1 (F. Bachand и др., 1999; C. Lavallée и др., 1994). К основным функциям этого белка относят остановку клеточного цикла и регуляцию транскрипции вирусного генома (F. Chang и др., 2004; B.E. Sawaya и др., 2000). Остановка клеточного цикла в фазе G2 митоза обеспечивает вирусу наиболее высокий уровень транскрипции с ДНК провируса (W.C. Goh и др., 1998).

Также была показана роль Vpr в подавлении противовирусного иммунного ответа. Vpr влияет на продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов (K. Muthumani и др., 2002a). Этой же исследовательской группой была продемонстрирована индукция апоптоза посредством белка Vpr в Т-клеточных линиях и в первичных клетках человека (K. Muthumani и др., 2002b).

Кроме того, Vpr участвует в транспорте преинтеграционного комплекса ВИЧ-1 в ядро. В этом процессе задействованы также клеточные белки-импортины, обеспечивающие транспорт в ядро, с которыми связывается Vpr (P. Gallay и др., 1996; S. Porov и др., 1998; M.A. Vodicka и др., 1998).



### **1.1.3.2 Vpr**

Вспомогательный белок Vpr размером 16 кДа транслируется с бицистронной *vpr/env*-кодирующей мРНК на поздних этапах жизненного цикла ВИЧ-1 (S. Schwartz и др., 1990). Первоначально, Vpr был охарактеризован как белок, образующий катионные каналы в плазматической мембране, деполяризуя ее и создавая благоприятные условия для отпочковывания вирусных частиц (G.D. Ewart и др., 1996; K. Hsu и др., 2010).

На данный момент, основной функцией белка Vpr считается обеспечение деградации рецептора CD4 и белка BST2 с поверхности клетки (S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2008; R.L. Willey и др., 1992b). Снижение количества молекул CD4 на поверхности зараженной клетки препятствует непродуктивному связыванию CD4 и gp120 в процессе формирования вирусных частиц, позволяя тем самым белку оболочки беспрепятственно попадать в вирусные частицы. Деградация CD4 является консервативной функцией Vpr и наблюдается во всех группах ВИЧ-1, тогда как противодействие фактору рестрикции BST2 свойственно белку Vpr исключительно группы М ВИЧ-1 (D. Sauter и др., 2009)(см. раздел 1.2.8).

### **1.1.3.3 Vif**

Вспомогательный белок Vif (viral infectivity factor) найден у всех лентивирусов за исключением вируса инфекционной анемии лошадей. Главная функция белка Vif – противодействие факторам рестрикции группы APOBEC3, цитидиновым дезаминазам, вносящим множественные мутации в вирусный геном (R.S. Haggis и др., 2003; R.S. Laguer и др., 2010; A.M. Sheehy и др., 2002). Недавно было показано, что для деградации белков APOBEC3 Vif задействует клеточный убиквитин-лигазный комплекс и что для этого необходимо связывание Vif с транскрипционным кофактором CBF $\beta$  (S. Jäger и др., 2011).

В 2016 была найдена другая интересная активность белка Vif: данный белок сильно воздействует на фосфопротеом зараженной клетки, приводя к гиперфосфорилированию более 200 белков (E.J. Greenwood и др., 2016).

### **1.1.3.4 Nef**

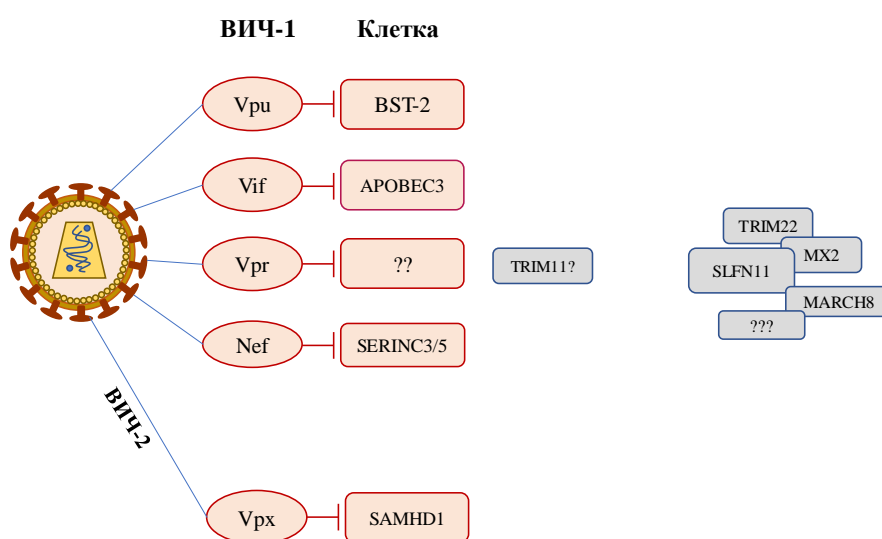
Nef (negative factor) представляет собой небольшой белок размером 27 кДа, который продуцируется на ранних этапах инфекции ВИЧ (J.S. Allan и др., 1985). Несмотря на то, что наличие Nef не является обязательным условием репликации ВИЧ-1 в перmissive клетках, *in vivo* заражение Nef-дефектным ВИЧ-1 приводит к снижению скорости развития СПИД, если приводит вообще (F. Kirchhoff и др., 1995).

Было показано, что Nef снижает экспрессию многих поверхностных белков на поверхности зараженной клетки, в том числе CD4, MHC I и других (J. V Garcia, A.D. Miller, 1991; O. Schwartz и др., 1996). Интересно, как и в случае Vpu, в отсутствие Nef экспрессия CD4 и связывание CD4 с белком оболочки вируса интерферирует с попаданием Env в вирусные частицы, делая их менее инфекционными. Экспрессия Nef, в свою очередь, приводит к уменьшению количества молекул CD4 на поверхности и, как следствие, к образованию более инфекционных вирусных частиц с большим количеством белка Env на поверхности (J. Lama, A. Mangasarian, D. Trono, 1999).

В 2015 году две группы выявили факторы рестрикции семейства SERINC (SERINC3 и SERINC5), которым противодействует Nef (A. Rosa и др., 2015; Y. Usami, Y. Wu, H.G. Göttlinger, 2015). На данный момент, снижение количества молекул SERINC3 и SERINC5 на поверхности клеток считается одним из основных механизмов поддержания инфекционной способности вирионов белком Nef.

## 1.2 Факторы рестрикции ВИЧ-1

Потребовалось время, чтобы найти мишени вспомогательных белков вируса иммунодефицита человека – факторы рестрикции (рис. 4). Литературы по рестрикторным факторам много (например, обзоры (M. Soliman, G. Srikrishna, A. Balagopal, 2017; Э.В. Карамов, Р.В. Петров, 2011а; Э.В. Карамов, Р.В. Петров, 2011b)), тем не менее, их список постоянно дополняется, а роль некоторых до сих пор не ясна и пересматривается.



**Рисунок 4. Противодействие вирусных вспомогательных белков клеточным факторам рестрикции (по Зотова с соавт. 2019).**

К наиболее известным факторам рестрикции относят АРОВЕС3 (K.N. Bishop и др., 2008; R.S. Harris и др., 2003; A.M. Sheehy и др., 2002), IFITM1-3 (A.L. Brass и др., 2009), TRIM5 $\alpha$  (D.M. Sayah и др., 2004; M. Stremlau и др., 2004; M. Stremlau и др., 2006), Schlaffen11 (M. Li и др., 2012), Mx2 (C. Goujon и др., 2013; M. Kane и др., 2013; Z. Liu и др., 2013), SAMHD1 (A. Berger и др., 2011; D.C. Goldstone и др., 2011; K. Hrecka и др., 2011) и BST-2 (также известный как Tetherin) (S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2008; D. Sauter, A. Specht, F. Kirchhoff, 2010).

### **1.2.1 TRIM**

Белки семейства TRIM являются E3-лигазами и участвуют в регуляции клеточного цикла, аутофагии и реакциях врожденного иммунитета. TRIM-белки задействованы в сигнальных путях NF- $\kappa$ B и IFN I типа и опосредованно влияют на ВИЧ-инфекцию. Однако известно, что несколько белков этого семейства способны напрямую ингибировать вирусную инфекцию на разных этапах репликации вируса (K. Ozato и др., 2008; R. Rajsbaum, A. García-Sastre, G.A. Versteeg, 2014; P.D. Uchil и др., 2008; P.D. Uchil и др., 2013; G.A. Versteeg и др., 2013; G.A. Versteeg и др., 2014).

Семейство TRIM впервые охарактеризовали еще в 2001 году – как группу белков с консервативным трехкомпонентным (TRIPartite Motif) N-концевым доменом RBCC (Really Interesting New Gene (RING) E3 ligase domain, B boxes and Coiled-Coil domains) (A. Reymond и др., 2001). RBCC-домен обеспечивает E3-лигазную функцию белка, а также олигомеризацию, что необходимо для его функциональной активности (D. Esposito, M.G. Koliopoulos, K. Rittinger, 2017; L.M. Napolitano, G. Meroni, 2012).

C-концевой домен, напротив, вариабельный и ответственен за взаимодействие TRIM с белками-партнерами. По типу C-концевого домена TRIM белки делят на 11 подсемейств. Мотив PRY/SPRY (SP1a and the RYanodine Receptor) встречается на C-конце более чем у 30 белков TRIM и ассоциируется с противовирусной активностью белков TRIM5, TRIM22, TRIM11 и TRIM15 (K. Han, D.I. Lou, S.L. Sawyer, 2011; M. Sardiello и др., 2008; P.D. Uchil и др., 2008).

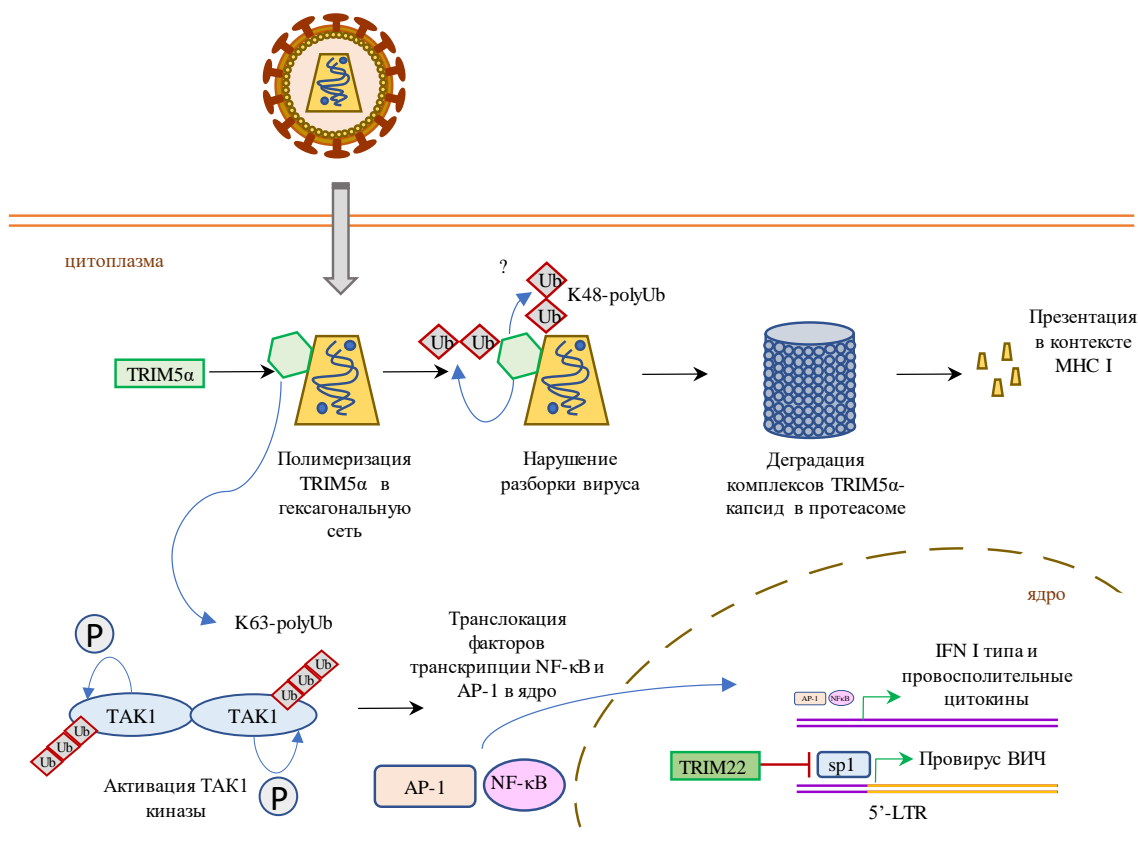
Белок TRIM5 $\alpha$  семейства TRIM считается ключевой молекулой, обеспечивающей устойчивость обезьян Старого Света (африканских зеленых мартышек, макаков-резусов и др.) к инфекции ВИЧ-1 (M. Stremlau и др., 2004), тогда как у обезьян Нового Света (например, у ночных обезьян) эту функцию выполняет TRIM5, слитый с циклофилином А (TRIM5 $\psi$ ) (S. Nisole и др., 2004; D.M. Sayah и др., 2004).

Предложено несколько моделей, описывающих механизм рестрикции ВИЧ-1 белком TRIM5 $\alpha$ , каждая из которых основана на взаимодействии SPRY-домена с капсидом

вируса, в результате чего нарушается процесс разборки вируса – происходит его преждевременное “раздевание”. Однако точный механизм вмешательства TRIM5 $\alpha$  в распаковку вириона до сих пор не выяснен. Известно, что для связывания с капсидом TRIM5 $\alpha$  должен образоваться димеры и тримеры в антипараллельной ориентации за счет суперспирализованных (coiled-coil) доменов. Затем TRIM5 $\alpha$  формирует гексагонподобную сеть, охватывающую капсид (R. Lamichhane и др., 2017; Y.-L. Li и др., 2016; T. Pertel и др., 2011; J. Sastri, E.M. Campbell, 2011). Интересно, что формирование гексагональной сети справедливо и для TRIMCyp, из чего можно предположить существование единого механизма рестрикции ВИЧ разными белками TRIM (J.M. Wagner и др., 2018).

Еще одно следствие формирования гексагональных структур молекулой TRIM5 $\alpha$  на капсиде вируса – запуск противовирусного клеточного ответа (Z. Yudina и др., 2015) (рис. 5). В результате димеризации RING-доменов TRIM5 $\alpha$  на поверхности капсида усиливается E3-лигазная активность TRIM5 $\alpha$  и активизируется синтез полиубиквитиновых цепей, связанных с боковой цепью Lys63. Эти цепи убиквитина активируют киназный комплекс TAK1 путем аутофосфорилирования, что, в свою очередь, приводит к транслокации факторов транскрипции AP-1 и NF- $\kappa$ B в ядро и последующей экспрессии IFN I типа (T. Pertel и др., 2011).

Еще одна успешная противовирусная стратегия реализуется TRIM-белками за счет направления вирусных компонентов на протеасомную деградацию. Но до сих пор остается открытым вопрос, выполняет ли эту функцию TRIM5 $\alpha$  в отношении капсида ВИЧ-1. На данный момент не обнаружено сайтов убиквитинирования на белке капсида ВИЧ-1 (S. van Tol и др., 2017), но известна способность TRIM5 $\alpha$  к самоубиквитинированию с последующей деградацией в протеасоме – куда он, вероятно, увлекает и вирусные компоненты (C.J. Rold, C. Aiken, 2008) (рис. 5). Кроме того, обнаружено, что компоненты нуклеокапсида вируса, в том числе интегразы, подвергаются эффективной деградации в протеасоме – и не без участия TRIM5 $\alpha$  (S.B. Kutluay, D. Perez-Caballero, P.D. Bieniasz, 2013).



**Рисунок 5. Роль белков TRIM в репликации ВИЧ.** Ub – убиквитин; K48-, K63-polyUb – цепочки убиквитина, связанные через Lys48 и Lys63 соответственно; P – фосфорилирование (по Зотова с соавт., 2019).

Интересно, что гомолог TRIM5α у человека не обладает выраженной противовирусной активностью. Однако единственная аминокислотная замена в домене PRY-SPRY в TRIM5α человека способна заметно реабилитировать его как фактор рестрикции ВИЧ-1 (M.W. Yap, S. Nisole, J.P. Stoye, 2005). Другой белок семейства – TRIM22 вовлечен в ингибирование репликации ВИЧ-1 посредством IFN I типа (S.D. Barr, J.R. Smiley, F.D. Bushman, 2008; R. Singh и др., 2011). Кроме того, TRIM22, независимо от присущей ему лигазной функции, ингибирует Tat- и NF-κB-независимую транскрипцию вирусных генов с LTR-промотора ВИЧ-1 путем прямого взаимодействия с фактором Sp1 (A. Kajaste-Rudnitski и др., 2011; F. Turrini и др., 2015). Эти наблюдения заслуживают внимания и клиницистов – обсуждается возможность контролировать транскрипцию вирусного генома в латентном периоде (S.G. Deeks и др., 2016).

Известно, что уровень экспрессии TRIM11 в клетке регулируется вспомогательным вирусным белком Vpr, причем его при низкой концентрации в клетке (T. Yuan и др., 2014); но этот регуляторный механизм тоже еще далек от понимания.

### 1.2.2 SAMHD1

Роль SAMHD1 (sterile alpha motif and histidine-aspartate domain containing protein 1) в рестрикции ВИЧ была независимо определена двумя группами исследователей в 2011 году. Белок идентифицировали как партнер вспомогательного белка Vpx вируса ВИЧ-2 (у ВИЧ-1 Vpx отсутствует) (К. Hrecka и др., 2011; N. Laguette и др., 2011). SAMHD1 экспрессируется на высоком уровне в миелоидных клетках и резидентных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах и является дезоксинуклеозидтрифосфатазой, ответственной за регуляцию пула dNTPs и ингибирование обратной транскрипции ВИЧ (В. Descours и др., 2012; D.C. Goldstone и др., 2011; К. Hrecka и др., 2011; N. Laguette и др., 2011).

Гистидин/аспаратный (HD) каталитический домен белка SAMHD1 гидролизует dNTP с образованием дезоксирибонуклеозида и трифосфата, удаляя тем самым строительные блоки для синтеза вирусной кДНК (D.C. Goldstone и др., 2011). Активность фермента определяется его тетрамеризацией и аллостерически контролируется GTP и всеми четырьмя dNTPs (S.M. Amie, R.A. Bambara, B. Kim, 2013; E.C. Hansen и др., 2014; X. Ji и др., 2013; X. Ji и др., 2014; J. Yan и др., 2013).

Недавно показано, что SAMHD1 обладает также металлзависимой 3'→5' экзонуклеазной активностью в отношении одноцепочечных ДНК и РНК *in vitro*, из чего можно предполагать существование еще одного присущего этому ферменту механизма рестрикции ВИЧ – связывание и деградация вирусной РНК (N. Beloglazova и др., 2013). Как dNTP-трифосфатгидролазная, так и за 3'→5' экзонуклеазная активность SAMHD1 выполняется HD-доменом. Руоо и др. (J. Руоо и др., 2014) на точечных мутантах SAMHD1 с заменами D137N или Q548A продемонстрировали способность SAMHD1 с отсутствием dNTP-трифосфатгидролазной активности и сохраненной 3'→5' экзонуклеазной ингибировать инфекцию ВИЧ-1. Однако ингибирующее влияние SAMHD1 не наблюдалось в противоположной ситуации. Так авторы пришли к выводу, что именно 3'→5' экзонуклеазная активность SAMHD1 вносит основной вклад в рестрикцию ВИЧ-1 (J. Руоо и др., 2014). Хотя эти результаты впоследствии не получили подтверждения (J.M. Antonucci и др., 2016; K.J. Seamon и др., 2015), Руоо и соавт. объяснили это различиями в постановке экспериментов (J. Руоо и др., 2016). На сегодня вопрос о значимости 3'→5' экзонуклеазной активности SAMHD1 в рестрикции ВИЧ по-прежнему остается открытым.

Вспомогательный белок ВИЧ-2 Vpx связывается с С-концом SAMHD1 и адаптерной молекулой DCAF1 и инициирует образование E3-убиквитинлигазного комплекса с последующей деградацией SAMHD1 в протеасоме (J. Ahn и др., 2012; К. Hrecka и др., 2011; N. Laguette и др., 2011; W. Wei и др., 2012). Механизм этого противостояния

ВИЧ-1 SAMHD1-рестрикции пока тоже до конца не изучен. Есть данные о том, что Vpr содержит тот же мотив, что и Vprx, необходимый для связывания с адаптером DCAF1 и ареста клеточного цикла в фазе G2 (W. Wei и др., 2012). Кроме того, недавно Куеи с соавт. (G.B. Kuеi и др., 2015) обнаружили способность ВИЧ-1 использовать регулятор клеточного цикла циклин L2 для нейтрализации SAMHD1 в макрофагах. Важная роль SAMHD1 в рестрикции ВИЧ-1 показана на примере макрофагов, выделенных от пациентов с синдромом Айкарди–Гутьерес, вызванным мутациями в SAMHD1. Макрофаги таких пациентов обладают значительно более высокой чувствительностью к заражению ВИЧ-1 в сравнении с макрофагами здоровых людей (A. Berger и др., 2011).

### 1.2.3 АРОВЕС3 (CEM15)

АРОВЕС3 (apolipoprotein B editing complex 3) – семейство цитидиновых дезаминаз, которое у приматов включает семь белков: АРОВЕС3А (А3А), А3С, А3Н с одним каталитическим доменом и А3В, А3D, А3F, А3G с двумя (R.S. Harris, S.K. Petersen-Mahrt, M.S. Neuberger, 2002; A. Jarmuz и др., 2002). Белки АРОВЕС3, в особенности А3G, экспрессируются на высоком уровне во многих типах клеток, включая CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги, (E.W. Refsland и др., 2010). Кроме того, экспрессия АРОВЕС3 стимулируется IFN I типа (E.W. Refsland и др., 2010). Первоначально А3G уделялось наибольшее внимание среди прочих белков семейства, но впоследствии стало ясно, что А3Н, А3F, А3D, А3В также активны в отношении ВИЧ, а вирусный белок Vif противодействует каждому из них (B.A. Desimmiе и др., 2014).

Противовирусная роль белков АРОВЕС3 проявляется после того, как они попадают в вирусные частицы, а значит, только в следующем цикле репликации вируса (B. Mangeat и др., 2003; R. Mariani и др., 2003). Рестрикция осуществляется путем индуцированного дезаминазами преобразования С→U в (-)-цепи ДНК ВИЧ. Урацил распознается полимеразой как тимин, что приводит к G→А мутации при синтезе (+)-цепи ДНК (B. Mangeat и др., 2003). Гипермутагенез при обратной транскрипции вирусной РНК в ДНК имеет два важных последствия: во-первых, аберрантные последовательности узнаются клеткой и уничтожаются; во-вторых, происходит интеграция мутированной ДНК провируса в геном клетки, но из-за большого количества образовавшихся преждевременных стоп-кодонов (например, после замены TGG→TAG) и прочих мутаций инфекционные вирусные частицы не продуцируются (K.N. Bishop и др., 2008; B. Mangeat и др., 2003). Замечено, что АРОВЕС3-зависимый мутагенез происходит с большей частотой на 3'-конце вирусной последовательности. Это объясняется тем, что в отличие от (-)-цепи вирусной ДНК, которая синтезируется с одного сайта (primary binding site) в области 5'-

LTR, синтез (+)-цепи ДНК инициируется с двух полипуриновых трактов – центрального (сРРТ) и на 3'-конце (3'-РРТ). Наличие двух сайтов инициации синтеза (+)-цепи ДНК и параллельного расщепления РНК-матрицы создает предпосылки для неравновесного и более длительного пребывания (-)-цепи ДНК в одноцепочечном состоянии (а это субстрат АРОВЕС3) в 3'-области генома ВИЧ (R. Suspène и др., 2006; Q. Yu и др., 2004).

Белки семейства АРОВЕС3 ингибируют лентивирусную инфекцию, используя альтернативный механизм – не связанный с дезаминазной активностью. Показано, что А3-дезаминазы нарушают обратную транскрипцию, препятствуя синтезу (-)-цепи, а также связыванию тРНК с вирусной мРНК. Однако в ряде работ (J.S. Albin, W.L. Brown, R.S. Harris, 2014; E.P. Browne, C. Allers, N.R. Landau, 2009) эта гипотеза не получила подтверждения, так как выявлена неспособность белков АРОВЕС3 к рестрикции ВИЧ при отсутствии каталитического дезаминазного домена.

В качестве инструмента противодействия АРОВЕС3-опосредованной рестрикции ВИЧ использует вспомогательный белок Vif, который индуцирует деградацию дезаминаз до того, как они успевают инкорпорироваться в вирусные частицы. Происходит связывание Vif с молекулой АРОВЕС3 в зараженной клетке и привлечение E3-убиквитинлигазного комплекса, в состав которого входят элогин В, элонгин С и RBX1, с последующей деградацией АРОВЕС3 (R. Mariani и др., 2003; A.M. Sheehy, N.C. Gaddis, M.H. Malim, 2003; X.X.-F. Yu и др., 2003). Однако Vif не способен полностью элиминировать АРОВЕС3 в клетке, продуцирующей вирус, что было продемонстрировано наличием множественных мутаций в провирусах клеток пациентов с острой и хронической ВИЧ-инфекцией, а также при вертикальной передаче ВИЧ новорожденным (B.A. Desimie и др., 2014; E.-Y. Kim и др., 2014). Возможно, при индукции IFN I типа баланс АРОВЕС3–Vif сдвигается в сторону факторов рестрикции, и они успевают попасть в вирусные частицы до связывания с Vif.

По-видимому, при неполном сдерживании АРОВЕС3-опосредованной рестрикции вирус получает даже дополнительные преимущества. Дезаминазы А3 могут не справиться с тем, чтобы полностью подавить репликацию вируса, но обеспечивают высокий уровень мутагенеза, а значит более высокий риск появления так называемых escape-мутантов с устойчивостью к антиретровирусным препаратам. Низкую эффективность антиретровирусной терапии у некоторых пациентов уже связывают с дефектным Vif (S. Fourati и др., 2010). Итак, АРОВЕС3 можно рассматривать как пример фактора рестрикции, действие которого вирусу удалось обратить в свою пользу.



#### **1.2.4 MxB**

Белки MxA и MxB (Mx1 и Mx2 у мышей) относятся к семейству GTPаз, экспрессия обоих белков индуцируется IFN I типа. Известно, что MxA обладает широкой противовирусной активностью в отношении как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, но не ретровирусов (M.D.J. Dicks и др., 2016; O. Haller, G. Kochs, 2011). Недавно три независимые исследовательские группы обнаружили, что MxB вовлечен в рестрикцию ВИЧ-1 – не влияя на обратную транскрипцию вирусной РНК, он дестабилизирует преинтеграционный комплекс и тем самым снижает интеграцию провирусной ДНК в геном клетки (C. Goujon и др., 2013; M. Kane и др., 2013; Z. Liu и др., 2013; K.A. Matreyek и др., 2014).

В отличие от MxA, у MxB, помимо GTPазного домена, есть удлиненный N-концевой домен, необходимый для рестрикции ВИЧ-1 (J.L. Fribourgh и др., 2014; M. Kane и др., 2013; K.A. Matreyek и др., 2014). Этот домен несет сигнал ядерной локализации (NLS) и может связываться с капсидом вируса после гомодимеризации (2 молекулы MxB связываются между собой в антипараллельном направлении). Показано, что Arg-богатый мотив этого домена напрямую связывается с капсидом ВИЧ-1 и определяет способность MxB к рестрикции вируса (C. Goujon и др., 2015). Предполагают, что, как и при TRIM5 $\alpha$ -рестрикции, это приводит к ингибированию “раздевания” вируса (T. Fricke и др., 2014).

Таким образом, MxB воздействует на репликацию ВИЧ-1 в двух клеточных компартментах и, соответственно, на следующих стадиях цикла репликации вируса: “раздевания” в цитоплазме, импорта преинтеграционного комплекса в ядро и интеграции провируса в геном клетки. Важно заметить, что у клинических изолятов ВИЧ-1, несущих мутации H87Q и G116A в белке капсида, снижена чувствительность к MxB-опосредованной рестрикции и повышена репликативная активность по сравнению с другими циркулирующими штаммами (E.E. Nakayama и др., 2018; W. Wei и др., 2016). Эти данные можно рассматривать как подтверждение гипотезы о давлении фактора MxB на отбор ВИЧ-1, причем в условиях *in vivo*.

#### **1.2.5 Schlafen11 (SLFN11)**

SLFN11 принадлежит к семейству Schlafen – ISG-белков, регулирующих пролиферацию клетки, иммунный ответ и репликацию вирусов (E. Mavrommatis, E.N. Fish, L.C. Plataniias, 2013). Не так давно обнаружено участие SLFN11 в рестрикции ВИЧ (M. Li и др., 2012).

SLFN11 воздействует на репликацию ВИЧ на стадии трансляции вирусных белков. Механизм подавления репликации связывают со способностью SLFN11 ограничивать

доступ тРНК к матричной РНК во время трансляции. Белок способен связываться со всеми тРНК в клетке. Однако в вирусном геноме чаще встречаются А/Т-богатые кодоны, и, по-видимому, соответствующие тРНК быстрее оказываются недоступными при трансляции. В результате снижается синтез вирусных белков в клетке. Интересно, что еще в 1994 году было замечено снижение уровня трансляции вирусных белков при стимуляции IFN I типа, однако не был определен механизм такой регуляции (E.M. Coccia, B. Krust, A.G. Novanessian, 1994). А недавно показано, что SLFN11 при стимуляции IFN I типа ингибирует трансляцию не только вирусных, но и других кодоннеоптимизированных транскриптов в клетке (A.C. Stabell и др., 2016) – так что этот белок, по-видимому, не стоит рассматривать как специфический фактор рестрикции ВИЧ. Скорее всего, SLFN11 вовлечен в общий противовирусный ответ клетки.

### **1.2.6 MARCH8 (с-MIR)**

Недавно была показана роль белка MARCH8 (membrane-associated RING-CH8) в рестрикции ВИЧ-1 (T. Tada и др., 2015). MARCH8 представляет собой E3-убиквитинлигазу с высокой экспрессией в дифференцированных миелодных клетках – макрофагах и дендритных клетках. К моменту открытия противовирусной функции белка было известно, что MARCH8 снижает экспрессию некоторых клеточных трансмембранных белков, в частности, MHC II класса и TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1) (B. van de Kooij и др., 2013; M. Ohmura-Hoshino и др., 2006). Предполагается, что MARCH8 узнает трехмерную структуру трансмембранных доменов белков, а не специфические мотивы, однако это требует еще дополнительного исследования.

Как показано Tada и соавт., эктопическая экспрессия MARCH8 в клетках-продуцентах вируса не влияет на уровень продукции вируса, однако снижает инфекционность вирусных частиц. При ВИЧ-инфекции MARCH8 способствует уменьшению количества молекул белка оболочки вируса на мембране клеток, не давая им попадать в вирусные частицы. В связи с этим часть вирионов, продуцированных клеткой, становятся неинфекционными. При этом количество вирусных частиц не уменьшается, снижается именно их способность инфицировать клетки. На данный момент стратегия борьбы вируса с MARCH8-опосредованной рестрикции неизвестна, но показано лишь, что вспомогательные белки Vpr, Vpr и Nef не противодействуют MARCH8 (T. Tada и др., 2015).

### **1.2.7 SERINC3 и SERINC5**

Долгое время не было понимания того, каким образом вирусный белок Nef повышает инфекционность вирусных частиц (B. van de Kooij и др., 2013; M. Ohmura-

Hoshino и др., 2006). Usami и соавт. (Y. Usami, Y. Wu, H.G. Göttlinger, 2015) предположили, что Nef противодействует некоторому фактору рестрикции, снижая его плотность на поверхности клетки и препятствуя инкорпорации в вирионы. В результате проведенного протеомного анализа вирионов Nef<sup>+</sup> ВИЧ-1 и Nef<sup>-</sup> ВИЧ-1 в последних обнаружены мембранные белки SERINC3 и SERINC5 (SERin INCorporator). Показано, что внедрение SERINC3 и SERINC5 в вирионы ВИЧ, действительно, снижает их способность инфицировать хозяйские клетки (Y. Usami, Y. Wu, H.G. Göttlinger, 2015).

Семейство SERINC состоит из пяти белков, характеризующихся наличием 10–11 трансмембранных доменов. Белки SERINC участвуют в биосинтезе сфинголипидов и фосфатидилсерина (M. Inuzuka, M. Hayakawa, T. Ingi, 2005). Однако только SERINC3 и SERINC5 считаются факторами рестрикции ВИЧ-1, причем SERINC5 обладает более выраженным противовирусным действием (A. Rosa и др., 2015; X.X. Zhang и др., 2017). Предполагаемый механизм действия SERINC5 заключается в формировании олигомеров на мембране вирусных частиц, что приводит к снижению эффективности слияния вирусной и клеточной мембран (C. Sood и др., 2017). Кроме того, попадание SERINC5 в вирусные частицы приводит к повышению их чувствительности к широконейтрализующим антителам, узнающим консервативный домен gp41 белка оболочки (S. Veitari и др., 2017; C. Sood и др., 2017).

Вспомогательный белок ВИЧ-1 Nef эффективно удаляет с поверхности клетки SERINC3 и SERINC5, препятствуя их попаданию в вирионы (N.J. Matheson и др., 2015; A. Rosa и др., 2015; Y. Usami, Y. Wu, H.G. Göttlinger, 2015). Механизм отрицательной регуляции SERINC3 и SERINC5 аналогичен снижению экспрессии CD4 на поверхности клетки: в каждом случае Nef использует клеточную транспортную систему для обеспечения деградации таргетных клеточных белков в эндолизосомах. Недавно показано, что чувствительность SERINC5 к Nef-опосредованной деградации определяется структурой его внутриклеточного домена ICL4 (intracellular loop 4). Так, при замене чувствительного к Nef варианта ICL4 на устойчивый белок SERINC5 становится резистентным к действию Nef, который уже не препятствует SERINC5-индуцируемой рестрикции ВИЧ (W. Dai и др., 2018).

### **1.2.8 BST-2 (CD317, Tetherin)**

Одной из причин, по которой ВИЧ-1, принадлежащий группе М, широко распространился среди людей и стал пандемичным, стало приобретение высокой резистентности к клеточному фактору BST-2 за счет эволюции и адаптации вирусного белка Vpr к BST-2-индуцируемой рестрикции (D. Sauter и др., 2009). Вспомогательный

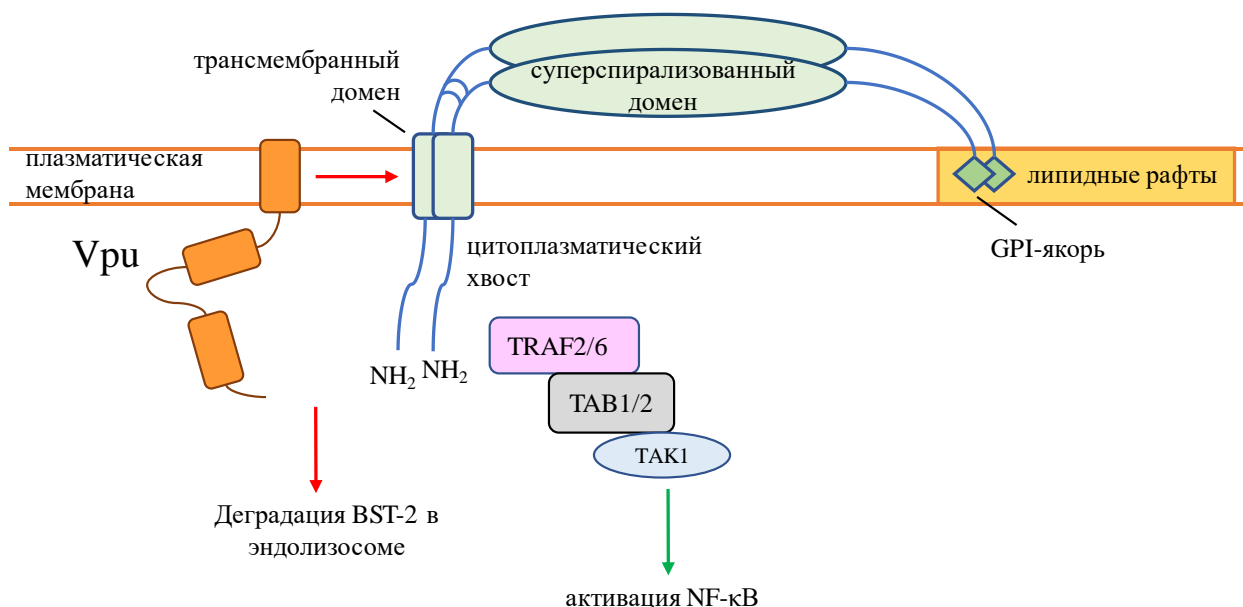
вирусный белок Vpu закодирован в геноме вируса ВИЧ-1, но отсутствует у вируса ВИЧ-2 и большинства штаммов SIV. Дефектный по гену *vpu* вирус, Δvpu-ВИЧ-1, обладает определенными характерными чертами, отличающими его от вируса дикого типа: меньше “шипов” на поверхности вириона и скопление “кластеров” вирусных частиц у поверхности клетки (Т. Klimkait и др., 1990; К. Strebel и др., 1989; E.F. Terwilliger и др., 1989). Ранее показано, что снижение содержания шипов на вирусной оболочке обусловлено взаимодействием молекулы CD4 с вирусным белком оболочки gp160 в аппарате Гольджи. Vpu связывается с CD4, освобождая тем самым белок оболочки, который беспрепятственно может транспортироваться к плазматической мембране клетки (R.L. Willey и др., 1992a).

Труднее было понять, чем вызвана кластеризация вирусных частиц Δvpu-ВИЧ-1 у поверхности клетки. С помощью технологии сайт-направленного мутагенеза в гене *vpu* показано, что в высвобождении gp160 и кластеризации вирионов у поверхности клетки задействованы разные домены Vpu. Так, скопление вирионов Δvpu-ВИЧ-1 наблюдалось только в определенных типах клеток и могло быть усилено действием IFN I типа (S.J.D. Neil и др., 2006; Н. Sakai и др., 1995). Vpu-дефектный вирус оказался также более чувствителен к подавлению репликации под действием IFN-α. Кроме того, такие вирусные частицы оказались зрелыми и могли быть удалены с поверхности зараженной клетки при обработке протеазой. Следовательно, есть клеточный белок, способный удерживать вирионы Δvpu-ВИЧ-1 на поверхности клетки и тем самым препятствующий их отпочковыванию. По данным электронной микроскопии, вирусные частицы Δvpu-ВИЧ-1 не только прикрепляются к поверхности зараженной клетки, но и “слипаются” друг к другу (S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2008). Значит, молекула, задействованная в этом процессе, может быть инкорпорирована в оболочку вируса и предотвращать распространение вируса путем удержания вирусных частиц на поверхности зараженной клетки. Все эти наблюдения дают основания считать, что белок Vpu появился и закрепился в ходе коэволюции ВИЧ-1 и человека как мера противодействия IFN-опосредованной защите клетки.

Neil с соавт. (S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2008) предложили название “tetherin” (от англ. tether – привязывать, ограничивать) для поверхностного белка клетки, ответственного за этот процесс. Для идентификации конкретной молекулы, выполняющей эту роль, с помощью микрочипов проанализировали транскриптом клеток до и после стимуляции IFN-α. Среди кандидатов оказался белок BST-2 (bone marrow stromal antigen 2) и три IFN-индуцируемых трансмембранных белка: IFITM1, IFITM2 и IFITM3. Способность BST-2 “привязывать” вирус к мембране подтвердили экспериментально. Важно, что BST-2

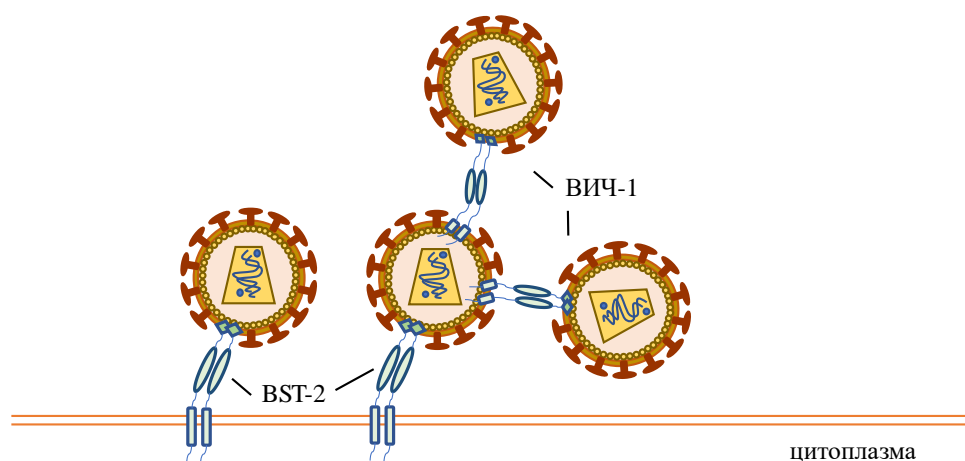
никак не влиял на экспрессию и процессинг вирусного белка Gag, ингибируя только высвобождение сформированных вирусных частиц из клетки.

BST-2 обладает уникальной структурой: N-конец с цитоплазматическим доменом переходит в трансмембранный домен, затем располагается внешний суперспирализованный домен и С-концевой гликозилфосфатидинозитольный якорь (GPI-якорь), часто называемый вторым трансмембранным доменом (S. Kupzig и др., 2003; D. Sauter, 2014) (рис. 6).



**Рисунок 6. Топология BST-2, взаимодействие с Vpu и активация пути NF-κB** (по Зотова с соавт. 2019).

BST-2 локализован в липидных рафтах плазматической мембраны, в транс-Гольджи сети и в эндосомах (T. Goto и др., 1994; S. Kupzig и др., 2003; N. Masuyama и др., 2009). Два ассоциированных с мембраной домена определяют способность белка удерживать вирусные частицы у мембраны и связывать их друг с другом: при почковании вирионов один из доменов остается на мембране, тогда как другой оказывается встроенным в липидную оболочку вируса (J. Hammonds, P. Spearman, 2009; D. Perez-Caballero и др., 2009; S. Venkatesh, P.D. Bieniasz, 2013) (рис. 7). Показано, что BST-2 функционирует в качестве гомодимеров и гомотетрамеров, ковалентно связанных через остатки цистеинов, расположенных в суперспирализованных внешних доменах BST-2 (A.J. Andrew и др., 2009; T. Goto и др., 1994; T. Ohtomo и др., 1999; D. Perez-Caballero и др., 2009).



**Рисунок 7. Схема BST-2-опосредованного удерживания вирионов ВИЧ-1 у поверхности зараженной клетки (по Зотова с соавт. 2019).**

Прикрепление вируса к мембране зараженной клетки снижает инфицирование “свободным” вирусом. Относительно недавно стало известно, что ВИЧ-1 более эффективно передается через межклеточные контакты, в особенности через вирусологический синапс, характеризующийся привлечением в область контакта клеток молекул адгезии, вирусных белков и клеточных рецепторов (С. Jolly и др., 2004; Q.J. Sattentau, 2011). Интересным и по-прежнему открытым остается вопрос о роли BST-2 в межклеточной передаче ВИЧ. На данный момент имеется несколько противоречащих друг другу данных. С одной стороны, показано ингибирующее влияние BST-2 на передачу инфекции от клетки к клетке (F.P. Blanchet и др., 2013; N. Casartelli и др., 2010; S. Giese, M. Marsh, 2014; B.D. Kuhl и др., 2010); с другой стороны, известно, что при межклеточной трансмиссии вируса BST-2 не только не работает как рестрикционный фактор ВИЧ, но, напротив, способствует более эффективному заражению соседних клеток за счет того, что удерживает в области контакта инфицированной/неинфицированной клеток вирусные частицы (С.М. Coleman, P. Spearman, L. Wu, 2011; С. Jolly, N.J. Booth, S.J.D. Neil, 2010; P. Zhong и др., 2013).

Цитоплазматический хвост BST-2 определяет участие белка во внутриклеточном сигналинге. Ранее BST-2 обнаружили среди белков, активирующих сигнальный путь NF-κB (А. Matsuda и др., 2003). Удержание вируса у поверхности и активация сигнального пути NF-κB – две самостоятельные функции белка, выполняемые разными доменами; при этом связывание вириона и димеризация BST-2 индуцируют запуск NF-κB-сигналинга (R.P. Galão и др., 2012; А. Tokarev и др., 2013). К предполагаемому сайту связывания TRAF на молекуле BST-2 привлекаются TRAF2 и TRAF6, что ведет к активации TAK1 и, соответственно, запуску канонического пути NF-κB-сигналинга с последующей экспрессией провоспалительных цитокинов IL-6, CXCL10 и IFN-β.

Вспомогательный белок Vpr вируса ВИЧ-1 связывается с трансмембранным доменом BST-2 (Т. Kobayashi и др., 2011) и привлекает SCF E3-убиквитинлигазу, что приводит к убиквитинированию и деградации BST-2 в эндолизосоме (J.L. Douglas и др., 2009; Т. Kobayashi и др., 2011). Интересно, что у обезьян белок Nef SIV эффективно противодействует BST-2 (В. Jia и др., 2009; D. Sauter и др., 2009), тогда как у человека Nef ВИЧ не считается фактором, интерферирующим с BST-2.

### **1.3 Факторы репликации ВИЧ-1**

Для того чтобы реплицироваться в клетках хозяина, вирус эксплуатирует внушительный набор клеточных белков. В геноме человека найдено около 9,5% генов, кодирующих белки, так или иначе участвующие в репликации ВИЧ-1 (F.D. Bushman и др., 2009). Среди них есть как факторы рестрикции, так и факторы репликации вируса. Последние представляют собой необходимое условие успешной репликации вируса: без них репликация ВИЧ-1 в клетке или невозможна, или малоэффективна (A.L. Brass и др., 2008; R.J. Park и др., 2017).

На разных этапах жизненного цикла ВИЧ-1 задействует различные клеточные белки. Это, в первую очередь, рецептор ВИЧ-1 – CD4, необходимый для проникновения вирусной частицы внутрь клетки (A.G. Dalglish и др., 1984). Кроме того, импорт преинтеграционного комплекса в ядро также зависит от ряда факторов, например, от RANBP2 (R. Zhang, R. Mehla, A. Chauhan, 2010) и белков-импортинов (в том числе, KPNA1) (S. Porov и др., 1998). Белки-импортины находятся в области ядерных пор, и их функция состоит в узнавании последовательности ядерной локализации белков. Вирусный белок Vpr связывается с KPNA и регулирует транспорт преинтеграционного комплекса ВИЧ-1 в ядро (S. Porov и др., 1998; M.A. Vodicka и др., 1998).

На этапе транскрипции вирусного генома ВИЧ-1 нуждается в некоторых кофакторах – клеточных белках регуляции транскрипции. Так, было показано, что активация промоторного участка LTR происходит в результате привлечения белкового комплекса, состоящего из вирусного белка Tat и клеточного белка Cyclin T1 (P.D. Bieniasz и др., 1999; P. Wei и др., 1998).

На более поздних этапах репликации ВИЧ-1 показана значимость ГТФазы Rab9, обеспечивающей транспорт везикул в сети транс-Гольджи. В отсутствии Rab9 уровень репликации ВИЧ-1 снижается из-за нарушения транспорта вирусных белков и последующей сборки вирусных частиц у плазматической мембраны (J.L. Murray и др.,

2005). На процесс отпочковывания вирусных частиц влияет взаимодействие клеточного белка TSG101 (вовлечен в эндосомальную сортировку белков) с доменом р6 Gag. Интересно, что TSG101 обеспечивает также выход вируса Эболы из зараженной клетки, являясь таким образом общим фактором репликации не родственных друг другу вирусов (J.E. Garrus и др., 2001; J. Martin-Serrano, T. Zang, P.D. Bieniasz, 2001).

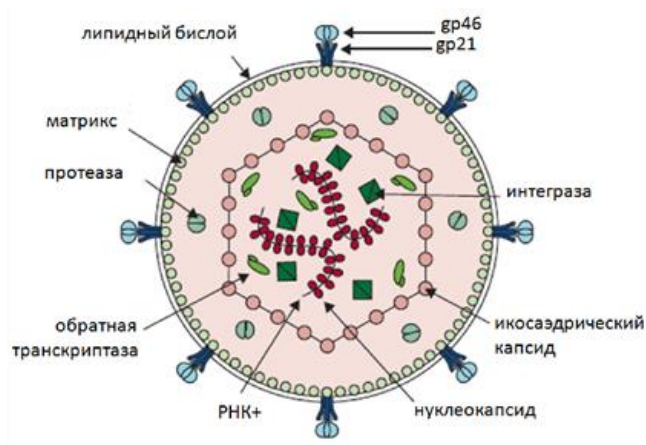
Факторы репликации являются перспективным направлением в области борьбы с ВИЧ-1, поскольку могут быть терапевтической мишенью в разработке препаратов.

#### **1.4 Общая характеристика Т-лимфотропного вируса человека первого типа (HTLV-1)**

Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1) был изолирован в 1979 году от пациента с Т-клеточной опухолью (B.J. Poiesz и др., 1980). Это открытие стало первым формальным доказательством того, что существуют ретровирусы, заражающие человека и провоцирующие развитие опухолей (R.C. Gallo, 2005). По предварительным оценкам, от 10 до 20 миллионов людей по всему миру заражены вирусом HTLV-1, и, хотя у большинства из них инфекция проходит бессимптомно, вирус может вызывать серьезные заболевания, такие как Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых (adult T-cell leukaemia/lymphoma, ATL) и нейродегенеративное заболевание под названием HTLV-1-ассоциированная миелопатия или тропический спастический парапарез (tropical spastic paraparesis, TSP) (A. Gessain и др., 1985; K. Takatsuki, 2005).

HTLV-1 относится к роду дельтавирусов семейства ретровирусов. Вирионы имеют шаровидную форму диаметром около 100 нм (рис. 8) (Y. Ohtsuki и др., 1982). Вирус оболочечный и окружен протеолипидным бислоем мембраны, куда встроены вирусные трансмембранные и поверхностные белки. Внутренняя оболочка вируса содержит матриксный белок, который способствует организации вирусных компонентов на внутреннем слое клеточной мембраны. Икосаэдрический капсид защищает вирусную РНК и ферменты (протеазу, обратную транскриптазу, интегразу), которые организованы в единый рибонуклеопротеидный комплекс нуклеокапсида.





**Рисунок 8. Схема строения HTLV-1** (по Verdonck с соавт., 2007 с изменениями)

В дополнение к стандартному набору белков, характерному для ретровирусов (Gag, Pol, Pro и Env), 3'-область генома HTLV-1 (область pX) кодирует ряд регуляторных и вспомогательных генов: tax, rex, p12, p21, p13, p30 и hbz (HTLV-1 basic leucine zipper factor), из которых HBZ является единственным транскриптом вирусного генома, кодируемым антисмысловой цепью (G. Gaudray и др., 2002).

Основной мишенью вируса HTLV-1 являются CD4+ Т-лимфоциты, реже CD8+ лимфоциты. Жизненный цикл вируса схож с типичным жизненным циклом других ретровирусов. Присоединение вируса к цитоплазматической мембране происходит за счёт взаимодействия вирусного белка SU (поверхностный гликопротеин) и рецептора, например, клеточного белка GLUT-1 (транспортер глюкозы). Затем происходит слияние вирусной и клеточной мембран, и вирусный кор, несущий в себе РНК, попадает в цитоплазму клетки. Здесь происходит «раздевание» вируса и обратная транскрипция с помощью фермента ревертазы. Сначала происходит синтез цепи ДНК- на матрице РНК+, затем РНК удаляется из ДНК-РНК-гибрида, после чего достраивается вторая цепь ДНК. Уже двуцепочечная цепь вирусной ДНК попадает в ядро клетки и интегрируется в геном случайным образом. С этого момента вирусная ДНК обозначается как провирус. Для HTLV-1 характерна инфекция с невысоким темпом размножения вируса (K. Verdonck и др., 2007).

#### *1.4.1 Tax*

Патогенность HTLV-1 обусловлена белком Tax, который при интеграции вирусной ДНК в определённые места в геноме может вызвать трансформацию Т-клеток. На ранних этапах инфекции клетки Tax провоцирует образование двуспиральных разрывов в геномной ДНК, вмешиваясь в процесс репликации и индуцируя образование активных

форм кислорода (Т. Kinjo и др., 2010). Это влечет за собой активацию клеточного ответа на повреждения ДНК (привлечение p53, CHK2, ATM и пр. факторов), клетка не проходит соответствующий чек-поинт в процессе деления, что ведет к остановке клеточного цикла, клеточному старению или апоптозу (А. Naoudi и др., 2003). Считается, в некоторых зараженных клетках множественные мутации в геноме приводят к адаптации к чек-поинтам (избежание клеточного ответа на повреждения ДНК), что позволяет клеткам с повреждениями ДНК делиться и становиться опухолевыми (М. Vohus, L. Willems, 2012).

Белок Tax влияет также на передачу вируса при межклеточных контактах, изменяя экспрессию молекул адгезии и участвуя в перестройке цитоскелета во время формирования вирусологического синапса (М. Vohus и др., 2008; А.К. Kress, R. Grassmann, В. Fleckenstein, 2011).

### **1.5 Факторы рестрикции и репликации HTLV-1**

Клеточные факторы, вовлеченные в процесс репликации HTLV-1, изучены не так подробно, как в случае ВИЧ-1. Тем не менее, в литературе можно встретить немало данных об участии клеточных белков и в качестве факторов рестрикции, и как факторов репликации. Поскольку вирус передается практически исключительно через межклеточные контакты, в основном через вирусологический синапс (Т. Igakura и др., 2003) и вирусные био пленки (А.-М. Pais-Correia и др., 2010), то ключевыми факторами репликации HTLV-1 – это рецепторы вируса и белки, обеспечивающие формирование межклеточных контактов. Рецепторами HTLV-1 на поверхности клетки являются Glut-1 (транспортер глюкозы 1) (N. Manel и др., 2003), NRP-1 (neuropilin-1), HSPGs (гепарин-сульфатные протеогликаны), SDC-1/-2 (Syndecan-1/-2) (K.S. Jones и др., 2011; K.S. Jones и др., 2005; S. Lambert и др., 2009). Благодаря экспрессии данных белков на разных типах клеток, вирус HTLV-1 способен проникать в широкий спектр клеток.

Вирусные био пленки представляют собой кокон-подобные структуры, включающие скопления вирионов у поверхности клеток. На поверхности инфицированных Т-лимфоцитов пациентов с тропическим спастическим парапарезом, а также на клеточных линиях MT2 и C91/PL, хронически экспрессирующих HTLV-1, были обнаружены комплексы внеклеточного матрикса, в которых локализовались вирусные частицы. Найдены поверхностные белки клетки, участвующие в формировании вирусных био пленок: это молекулы CD43, CD45 (D. Mazurov и др., 2012), Collagen, Galectin-3, BST2 (А.-М. Pais-Correia и др., 2010), участвующий также и в удерживании вирусных частиц у

поверхности зараженных клеток. В вирусных биопленках был также обнаружен белок CD82. Известно, что матриксный белок HTLV-1 связывается с белком CD82 (D. Mazurov, G. Heidecker, D. Derse, 2007). Однако роль экспрессии CD82 на клетках-мишенях на данный момент неизвестна. Вирусный синапс, в свою очередь, формируют молекулы адгезии ICAM1, LFA1, актин-связывающий белок Talin (Т. Igakura и др., 2003).

Вирус HTLV-1 не обладает такой чувствительностью к факторам рестрикции семейства APOBEC3, как ВИЧ-1. Есть свидетельства того, дезаминазная активность белка APOBEC3G приводит к гипермутациям в геноме HTLV-1 *in vivo* (J. Fan и др., 2010; M. Ooms и др., 2012), однако наблюдаемый эффект считается несущественным, во многом из-за того, что HTLV-1 реплицируется во многом благодаря делению инфицированных клеток, а не исключительно путем обратной транскрипции. Также, недавно была показана способность HTLV-1 препятствовать попаданию APOBEC3G в почкующиеся вирионы путем взаимодействия С-концевого домена белка Gag с APOBEC3G (D. Derse и др., 2007).

Недавно были обнаружены клеточные факторы, воздействующие на транскрипцию вируса. Белки TCF1 и LEF1 связываются с вирусным белком Tax, мешая ему активировать транскрипцию вирусных белков в Т-клетках. В результате, в присутствии данных белков репликация HTLV-1 подавлена. Однако активация Т-клеток приводит к снижению экспрессии TCF1 и LEF1, что делает Tax вновь функциональным активатором транскрипции вирусных белков (G. Ma и др., 2015).

## **1.6 Способы выявления новых факторов рестрикции и репликации ВИЧ-1 и HTLV-1**

Большинство известных (IFITM, BST-2, APOBEC3) на сегодняшний день факторов рестрикции ВИЧ были найдены среди ISGs. В инфицированной клетке, благодаря вирусным сенсорам (TLR, RLR и т.п.), запускаются сигнальные пути IFN и NF-κB, что приводит к экспрессии белков клеточной защиты от вирусной инфекции. Вполне логично, что среди них обнаружили факторы рестрикции ВИЧ.

Еще одна эффективная стратегия исследования факторов рестрикции заключается в поиске белков-партнеров вспомогательных белков вируса. ВИЧ способен инфицировать клетки без экспрессии Vif, Vpr, Vpu и Nef (Vpx у ВИЧ-2), однако их присутствие в геноме вируса неслучайно. Главной функцией вспомогательных белков считается

противодействие клеточной защите. Идентификация факторов рестрикции SAMHD1 и SERINC3/5 как мишеней соответственно Vpx и Nef подтверждает это предположение.

С развитием технологий высокопроизводительного секвенирования появились новые возможности для поиска факторов рестрикции. Уже сегодня накоплены огромные массивы данных, полученные в результате siРНК-, shРНК- и CRISPR/Cas9-скринингов по поиску факторов рестрикции (L. Liu и др., 2011) и факторов репликации ВИЧ-1 (A.L. Brass и др., 2008; R. König и др., 2008; D.G. Nguyen и др., 2007; R.J. Park и др., 2017; H. Zhou и др., 2008). Эти массивы данных еще “ждут своего часа”: систематизации (J.-F. Gélinas, D.R. Gill, S.C. Hyde, 2018) и интерпретации в соответствии с результатами экспериментальных исследований, – но уже сейчас их использование стимулирует поиск и позволяет быстрее находить новые, интересные с клинической точки зрения, клеточные белки, вовлеченные в процесс ретровирусной инфекции.

### ***1.6.1 Библиотека нокаутов GeCKO***

Одним из наиболее современных и эффективных методов поиска клеточных факторов, вовлеченных в тот или иной процесс, является скрининг библиотеки нокаутов GeCKO (genome-scale CRISPR knockout). Библиотека GeCKO была создана на основе системы редактирования генома CRISPR-Cas9 (N.E. Sanjana, O. Shalem, F. Zhang, 2014; O. Shalem и др., 2014). Система CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) отвечает за бактериальный иммунитет против фагов (P. Horvath, R. Barrangou, 2010). При заражении вирусом происходит транскрипция CRISPR-кассеты и разрезание полученного транскрипта на малые фрагменты (crRNA), содержащие спейсер и участки повторов по концам. Далее происходит спаривание crRNA с нуклеиновой кислотой вируса, заразившего бактериальную клетку, и разрезание ДНК фага с помощью комплекса белков Cas (Cascade комплекс). Среди белков семейства Cas, эндонуклеаза Cas9, относящаяся ко второму типу CRISPR/Cas, представлена в виде одного белка. Именно Cas9 была впервые адаптирована для получения двухспиральных разрывов ДНК у млекопитающих (P. Mali и др., 2013). РНК, направляющую Cas9 к месту разрезания, назвали гидовой РНК (guide-RNA), которая является аналогом crRNA, слитой с tracrRNA (trans-activating crRNA). Она содержит константный участок, связывающийся с Cas9, и специфический район из 20 нуклеотидов, который гибридизуется с комплементарным ему участком в геноме. Первоначально в лабораторной практике использовали только дикий тип белка Cas9, делающий разрывы в обеих цепях ДНК. Но в этом случае наблюдали высокий процент офф-таргет (off-target) эффектов. Путем использования никазного мутанта Cas9 (Cas9D10A) и двух gRNA, связывающихся с противоположными цепями ДНК гена-мишени вблизи друг

от друга, удалось минимизировать количество нежелательных офф-таргет эффектов (F.A. Ran и др., 2013).

Библиотека нокаутов GeCKO, созданная на основе системы CRISPR-Cas9, содержит 108480 специфических последовательностей гидовых РНК для нокаутирования 18080 генов (N.E. Sanjana, O. Shalem, F. Zhang, 2014; O. Shalem и др., 2014), что фактически покрывает весь экзом человека. С её помощью были проведены исследования по идентификации генов, вовлеченных в процесс пролиферации клеток опухоли и плюрипотентных стволовых клеток. Также с помощью этого метода были успешно выявлены гены, ответственные за устойчивость клеток меланомы к цитостатику vemurafenib (O. Shalem и др., 2014).

### **1.7 Межклеточная инфекция ретровирусами**

Патогенные ретровирусы человека могут заражать клетки как свободными вирионами, так и путем межклеточной трансмиссии, когда вирусные частицы передаются от инфицированной клетки к здоровой при их непосредственном контакте. Несколько типов клеточных контактов могут способствовать передаче вирусов от зараженной клетки к клетке-мишени. К ним относятся: вирусологический синапс (T. Igakura и др., 2003; C. Jolly и др., 2004), филлоподии (N. Van Prooyen и др., 2010; N.M. Sherer и др., 2007), вирусные биопленки (A.-M. Pais-Correia и др., 2010), а также полисинапсы (D. Rudnicka и др., 2009), которые были описаны в качестве характерных клеточных контактов при заражении различными ретровирусами.

Клетки, зараженные HTLV-1, практически не производят вирус, способный инфицировать другие клетки свободными частицами. В 2003 году Igakura с соавторами показали, что HTLV-1 использует физиологическую особенность Т-клеток к образованию межклеточных контактов (иммунологический синапс) с целью инфицирования (T. Igakura и др., 2003). Описание вирусологического синапса, способствующего передаче ВИЧ, было предложено группой Jolly с соавт. в 2004 году (C. Jolly и др., 2004). Была показана локализация вирусных белков Env и Gag со стороны инфицированной клетки и молекул CD4, LFA-1 и CXCR4 на клетке-мишени в области контакта. Такой клеточный контакт, организующийся в надмолекулярную структуру наподобие той, которая наблюдается при образовании иммунологического синапса, был по аналогии с ним назван вирусологическим, или по-другому, инфекционным синапсом.

Иммунологический синапс формируется в том случае, когда Т-клетка с помощью Т-клеточного рецептора (TCR) узнает пептид в контексте главного комплекса гистосовместимости (рМНС) на поверхности антиген-презентирующей клетки (V. Piguet, Q. Sattentau, 2004). Такое взаимодействие приводит к активации Т-клеток и реализации их эффекторных функций. В отличие от иммунологического, вирусологический синапс формируется в результате связывания вирусных белков, экспрессированных на мембране зараженной клетки, и рецепторов на поверхности клетки-мишени. В случае ВИЧ, gp120 (на зараженной клетке) связывается с молекулой CD4, экспрессирующейся на поверхности Т-клетки-мишени (P. Chen и др., 2007; G. Vasiliver-Shamis и др., 2008).

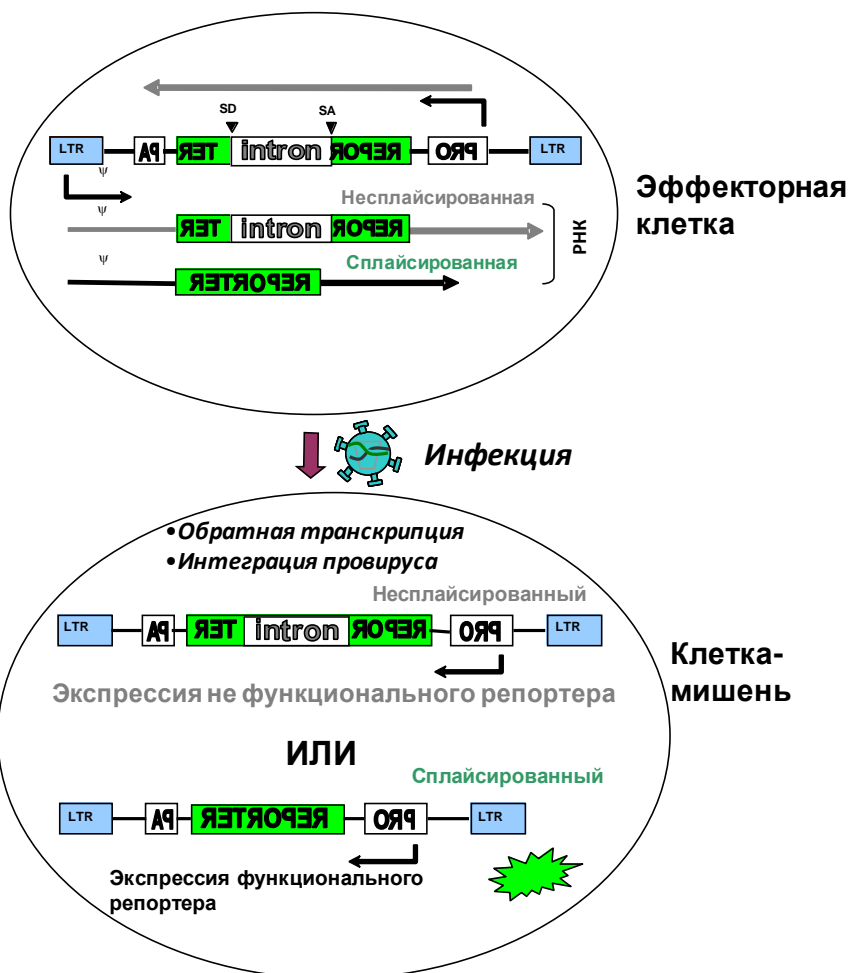
Ещё до того, как была предложена концепция вирусологического синапса для ВИЧ-1, Dimitrov с соавт. стали оценивать эффективность инфицирования Т-клеток с помощью свободного вируса или при добавлении макрофагов и Т-клеток, зараженных ВИЧ (D.S. Dimitrov и др., 1993). Их оценка показала, что заражение вирусом, ассоциированным с клетками, в 100-1000 раз эффективней, чем инфекция выделенными вирусными частицами. Одним из доказательств того, что инфицированные клетки могут активно участвовать в распространении вируса, было продемонстрировано Phillips с соавт., показавшим массовое скопление вирионов в области контакта между инфицированной клеткой и клеткой-мишенью (R. Pearce-Pratt, D. Malamud, D.M. Phillips, 1994).

### ***1.7.1 Количественный анализ межклеточной инфекции***

Количественный анализ межклеточной инфекции представляет собой непростую задачу, прежде всего, из-за того, что клетки-продуценты вирусных частиц и инфицированные клетки-мишени трудно различить при совместном культивировании. Первоначально, данные о межклеточной трансмиссии ретровирусов были получены методом флуоресцентной микроскопии: экспрессия вирусных белков в области межклеточных контактов; а также методом электронной микроскопии: скопление вирусных частиц в области контакта зараженной клетки и клетки-мишени (P. Chen и др., 2007; T. Igakura и др., 2003; C. Jolly и др., 2004; R. Pearce-Pratt, D. Malamud, D.M. Phillips, 1994). В качестве оценки уровня репликации вируса в условиях межклеточной передачи пользовались измерением количества продуктов обратной транскрипции в инфицированных клетках. Кроме того, измеряли экспрессию вирусных белков в инфицированных клетках методом проточной цитофлуориметрии в окрашенных клетках (C.J. Burrell, P. Li, A.J. Davis, 1997; C. Jolly, I. Mitar, Q.J. Sattentau, 2007; H. Sato и др., 1992; N. Sol-Foulon и др., 2007; M. Sourisseau и др., 2007).

Ретровирусные векторы со встроенной репортерной конструкцией хорошо подходят для измерения инфекции свободным вирусом. Однако, когда дело касается межклеточной инфекции, экспрессия репортера в клетках-продуцентах вирусных частиц мешает при анализе количества вновь зараженных клеток-мишеней, поскольку и те, и другие клетки культивируются вместе. Для решения этой проблемы были разработаны векторы с репортером, который не экспрессируется в трансфицированных клетках (продуцентах вируса), но при попадании в клетки-мишени и интеграции в геном репортер становится функционально активным (D. Mazurov и др., 2010).

Разработанные конструкции содержат также последовательность « $\psi$ », которая позволяет репортерной РНК инкорпорироваться в вирусные частицы ( $\psi$ -сигнал). Экспрессионная кассета таких векторов включает промотор CMV (конститутивный промотор цитомегаловируса человека) и ген репортера (ген люциферазы светлячков (Luc) или ген желтого флуоресцентного белка (YFP)). Кассета вставлена в обратном направлении относительно вирусной геномной РНК, поэтому ген репортера не может быть экспрессирован в трансфицированных клетках (рис. 9).



**Рисунок. 9.** Схема экспрессии вектора, содержащего репортерный ген, в клетках-продуцентах вирусных частиц (сверху) и в клетках-мишенях (снизу). SD, SA - донор и акцептор сплайсинга, соответственно, PRO – промотор CMV.

Кроме того, последовательность, кодирующая репортерный белок, разорвана интроном, взятым из гена гамма-глобина человека. Интрон расположен в векторе в прямой ориентации и может быть удалён в процессе сплайсинга РНК, синтезирующейся с вирусного LTR-промотора, но не с CMV промотора. Когда вирус, содержащий в качестве генома сплайсированную РНК репортера, инфицирует клетку-мишень, формируется провирус с функциональным геном-репортером, который экспрессируется в зараженной клетке с промотора CMV. Подобные векторы называют зависимыми от репликации, поскольку для активации экспрессии репортера необходима репликация вируса. Данные векторы позволяют количественно оценивать уровень инфекции вирусами ВИЧ-1 и HTLV-1 в клеточных культурах (D. Mazurov и др., 2010).

Существенным недостатком такого подхода к анализу межклеточной инфекции является то, что наличие интрона не оказывает влияния на попадание РНК репортера в



вирусные частицы, а также на способность вируса инфицировать клетки-мишени. Репортерная РНК, содержащая интрон, способна эффективно упаковываться в вирусные частицы и попадать в зараженные клетки, которые в таком случае не экспрессируют ген репортера. Подобные события инфицирования снижают уровень экспрессии репортерного белка при количественном анализе межклеточной инфекции.

### **1.8. РНК-интерференция. Использование микро-РНК (miRNA) и коротких РНК, образующих шпильки (shRNA), в генотерапии.**

РНК-интерференция представляет собой механизм специфической регуляции экспрессии генов за счет малых двуспиральных молекул РНК (D.M. Dykxhoorn, J. Lieberman, 2005). РНК-интерференция индуцируется либо эндогенными, либо введенными извне короткими двуцепочечными РНК двух типов: микро-РНК (miRNA) и малыми интерферирующими РНК (siRNA). В обоих случаях последовательность двуспиральной РНК длиной 21-23 нуклеотида связывается в цитоплазме клетки с белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex) (S. Subramanya и др., 2010). В случае siRNA одна из двух цепей РНК деградирует. Вторая цепь называется направляющей, она способствует сиквенс-специфической деградации матричной РНК, содержащей комплементарную последовательность. Микро-РНК, в свою очередь, связывается с 3'-некодирующей областью мРНК, вызывая подавление трансляции или удаление поли(А)-хвоста (N.C. Lau и др., 2001; M.T. McManus и др., 2002).

Микро-РНК были идентифицированы в огромном количестве организмов, включая *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* и *Homo sapiens* (D. Boden и др., 2004). Размер miRNA составляет около 22 нуклеотидов, образуются микро-РНК из двуцепочечного и более длинного предшественника (pri-miRNA), который процессируется сначала ядерным ферментом Drosha в 70-нуклеотидную последовательность, напоминающую по вторичной структуре стебелек-петлю (pre-miRNA), а затем после экспорта из ядра из pre-miRNA при участии фермента рибонуклеазы Dicer образуется зрелая miRNA (R.F. Ketting и др., 2001; Y. Lee и др., 2003).

Одним из представителей микро-РНК является miR-30, обнаруженная и исследованная на линии клеток HeLa (M. Lagos-Quintana и др., 2001). В 2002 году было показано, что miR30 может быть использована в качестве каркаса для вставки последовательностей, кодирующих shRNA (short hairpin RNA), которые в таком контексте

эффективно подавляют трансляцию эндогенных матричных РНК в клетке (Y. Zeng, E.J. Wagner, B.R. Cullen, 2002). Кроме того, два года спустя было исследовано влияние подобных конструкций на репликацию ВИЧ-1. Оказалось, что tat-специфичные shRNA на 80% более эффективно подавляют репликацию вируса, будучи процессированными с pre-miRNA предшественника, нежели доставленные с помощью обычного вектора shRNA (D. Boden и др., 2004).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Клеточные культуры

Эксперименты проводились на клеточной линии НЕК 293Т (клетки эмбриональной почки человека), НЕК 293Т/CD4/X4 (получение трансгенной клеточной линии описано в разделе 3.2.2), CD4+ Т-клеточной линии CCRF-CEM (далее указано как CEM), CD4+ Т-клеточной линии Jurkat, В-клеточной линии человека Raji/CD4, экспрессирующей трансгенный CD4 (рецептор ВИЧ), а также клеточной линии MT2, инфицированной HTLV-1. Суспензионные клеточные линии выращивались в среде RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% FCS (Sigma), 2 мМ глутамина (ПанЭко) и 40 мкг/мл гентамицина (ПанЭко). Клетки НЕК 293Т выращивались в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma) с добавлением 10% FCS, 2 мМ глутамина и 40 мкг/мл гентамицина.

#### 2.1.2 Бактериальные культуры

В работе использовались бактериальные культуры клеток E.Coli штаммов Stb12 и Lucigen для наработки плазмидной ДНК.

#### 2.1.3 Растворы

- ТАЕ-буфер для ДНК-электрофореза: 40мМ Трис (рН 7.6), 20 мМ СНЗСООН, 1мМ Na-ЭДТА;
- Буфер нанесения: 10 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 0,03% бромфенол синий, 60% глицерол, 60мМ ЭДТА;
- ТЕ-буфер: 10мМ Трис, рН 7.8, 1мМ ЭДТА
- Лизирующий буфер: 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1% Тритон X-100, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1% PMSF, 0.5% NaVO<sub>4</sub>, 2% NaF, рН=8.2;
- Буфер образца для SDS-электрофореза: 62.5 мМ Трис-НСl рН=6.8; 10% глицерин; 2% SDS; 5% 2-меркаптоэтанол; 0.05% бромфеноловый синий
- Буфер для концентрирующего геля SDS-PAGE: 1,5 М Tris-НСl рН 8.8;
- Буфер для разделяющего геля SDS-PAGE: 0,5 М Tris-НСl рН 6.8;
- Буфер для электрофореза: 25 мМ Tris, 192 мМ глицина, 10 мМ SDS;
- Буфер для электропереноса: 25 мМ Tris, 192 мМ глицина, рН 8.3; 20% этанол;
- Среда OptiMem (Invitrogen) для трансфекции с помощью липофектамина 2000 (Lipofectamine 2000, Invitrogen);

- 3'-азидо-3'-дезокситимидин (AZT) (Sigma)
- форболмиристатацетат (PMA) (Sigma)
- Opti-mem (Invitrogen)
- Lipofectamin 2000 (Invitrogen)

#### **2.1.4 Антитела**

Моноклональные антитела  $\alpha$ -BF4 ( $\alpha$ -CD82),  $\alpha$ -Tubulin,  $\alpha$ -CD4 были получены в лаборатории иммунохимии «ГНЦ Института иммунологии ФМБА России». Антитела  $\alpha$ -CXCR4 (клон 12G5, Santa Cruz),  $\alpha$ -BST2 (Biolegend, США),  $\alpha$ -VpR,  $\alpha$ -VpU,  $\alpha$ -ViF,  $\alpha$ -Nef (НИИ AIDS Reagent Program, США), p17-FITC, p19, вторичные антитела  $\alpha$ -mouse-Alexa488,  $\alpha$ -mouse-PE (Invitrogen, США),  $\alpha$ -mouse-HRP,  $\alpha$ -rabbit-HRP (Cell Signaling, США).

#### **2.1.5 Праймеры и олигонуклеотиды**

Таргетные последовательности геновых РНК для клонирования в вектор pKS gRNA BB:

5'-gR-BST2-1: CACCGTCTGCTGGGGATAGGAATTC

3'-gR-BST2-1: AAACGAATTCCTATCCCCAGCAGAC

5'-gR-BST2-2: CACCGCGCTTATCCCCGTCTTCCA

3'-gR-BST2-2: AAAC TGGAAGACGGGGATAAGCGC

5'-gR-KPNA1ex4: CACCGACAAACCTGGCCACTACTCC

3'-gR-hKPNA1ex4: AAACGGAGTAGTGGCCAGGTTTGTGTC

5'-gR-KPNA1ex8: CACCGTCATCGATGCGGGAGTATGT

3'-gR-hKPNA1ex8: AAACACATACTCCCGCATCGATGAC

Для получения нок-ина (knock-in) конструкции 5HA2 в ген KPNA1 донорские конструкции были амплифицированы с вектора pUCHR-mClover-smAID-P2A-CD5HA2-

bgIрА методом ПЦР с использованием праймеров, содержащих плечи гомологии, соответствующие гену КРНА1 в области экзона 4 или 8 (см. раздел 2.3.3 Метод SORTS).

Праймеры для ПЦР-амплификации гена CXCR4 с геномной ДНК для последующего клонирования в вектор рUCHR IRES zeo:

5'-CXCR4-exon2: gATATACACTTCAGATAACTACACCG

5'-EcoRI-CXCR4: cGAATTCgccaccATGGAGGGGATCAGTATATACAC

3'-XmaI-CXCR4:gCCCGGGCTAGCTGGAGTGAAAАCTTGAAG  
(СТТСАAGТТТТCACTCCAGCTAGCCCGGGc)

Плазмида рUCHR CXCR4 IRES zeo была получена следующим образом: у гена CXCR4 имеются два экзона и 3 изоформы белка. Мажорная изоформа (CXCR4\_b) получается путем сплайсинга 1го экзона (15 нуклеотидов) и части 2го экзона (без первых 24 нуклеотидов). Сперва с геномной ДНК клеток Jurkat амплифицировали участок кДНК CXCR4 со второго экзона (использовали праймеры 5'-CXCR4-exon2 и 3'-XmaI-CXCR4), клонировали его в вектор рJet и секвенировали. Затем с плазмиды рJet амплифицировали секвенированный участок кДНК с другим 5' праймером (5'-EcoRI-CXCR4), где есть сайт EcoRI и недостающие 15 нуклеотидов из 1го экзона, и прежним 3' праймером. Верифицированная последовательность кДНК гена CXCR4 затем была переклонирована в вектор рUCHR IRES zeo по сайтам EcoRI и XmaI.

Праймеры для ПЦР-амплификации гена CD4 с ДНК-матрицы вектора рCMV-CD4-FLAG (Addgene) для последующего клонирования в вектор рUCHR IRES puro:

5'-EcoRI-CD4: cGAATTCgccaccATGAACCGGGGAGTCCCTTTTAG

3'-XmaI-CD4: gCCCGGGTCAAATGGGGCTACATGTCTTC

(GAAGACATGTAGCCCCATTTGACCCGGGc)

Для получения вектора pCMV-BST2-pA в вектор pCMV-pA был клонирован ген BST2 после амплификации с праймерами:

5'-XbaI-BST2: cTCTAGAgccaccATGGCATCTACTTCGTATGACTA

3'-XmaI-BST2:gCCCGGGtcaCTGCAGCAGAGCGCT  
(AGCGCTCTGCTGCAGtgaCCCGGGc)

### ***2.1.6 Прочие реагенты и материалы, используемые в работе***

*Детергенты:* Тритон X-100 (Ferak), додецилсульфатнатрия (SDS) (AppliChem), Tween20 (MPBiomedicals);

*Ингибиторы протеаз и фосфатаз:* Фенилметилсульфонилфторид (PMSF), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaF;

*Органические растворители:* n-бутанол (Химреактив, Россия);

*Белки:* сухое обезжиренное молоко; щелочная фосфатаза из кишечника теленка (CIP) (СибЭнзим);

*Прочие реагенты:* агароза; акриламид (BioRad); аммония персульфат (APS) (BioRad); тетраэтилэтилендиамид (TEMED) (BioRad); β-меркаптоэтанол; деионизированная вода; фосфатно-солевой буфер (PBS) в таблетках (ICNBiomedicals); 10x dNTP (дезоксирибонуклеотиды) (Fermentas);

*Антибиотики:* ампициллин, пурамицин; зеоцин;

*Лигаза:* ДНК лигаза T4 (СибЭнзим);

*Полимераза:* Pfu-полимераза, Taq-полимераза, соответствующие буферы (СибЭнзим);

*Эндонуклеазы рестрикции:* EcoRI, XbaI, XmaI, MluI, NheI, XhoI, BbsI рестриктазы (СибЭнзим), соответствующие буферы к данным ферментам (СибЭнзим);

*Плазмиды:*

- pJet1.2 (Fermentas, США)
- pCRU5-inYFP (D. Mazurov и др., 2010)
- pUCHR-inYFP (D. Mazurov и др., 2010)
- pUCHR IRES puro (D. Mazurov и др., 2013)
- pCMV pA (Addgene)
- pcDNA hygro (Addgene)

- pCMV Δ8.2R (Addgene 12263)
- pCMV VSVG (Addgene 8454)
- pIII NL4-3env (T. Murakami, E.O. Freed, 2000)
- pCMV HT1-M (D. Derse, 2001)
- pGIPZ (D. Mazurov и др., 2012)
- pKS gRNA BB (Tarasevich и др., 2015)
- pcDNA 3.3 hCas9 (Addgene 41815)
- pUCHR-mClover-smAID-P2A-CD5HA2-bglpA (A. Zotova и др., 2019)

## **2.2 Молекулярно-биохимические методы**

### **2.2.1 Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК**

Рестрикцию плазмидной ДНК проводили в количестве 1-5 мкг в течение 1-2 часов при температуре и в буфере согласно рекомендации производителя. По истечении времени инкубации, смесь наносили на агарозный гель, проводили электрофорез, вырезали необходимую полосу и проводили очистку с помощью набора для выделения ДНК GeneJet DNA extraction kit (Thermo Scientific, США) согласно рекомендациям производителя.

Для лигирования использовали T4 ДНК-лигазу и буфер для T4 ДНК-лигазы фирмы Сибэнзим. Лигирование вели в объеме 10 мкл, при молярном соотношении вектора и вставки 2:5, в течение 2 часов при температуре 16°C.

### **2.2.2 Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель, приготовленный на однократном ТАЕ (ТАЕ (50x): 242 г/л Трис, 57.1 мл уксусной кислоты, 100 мл 500 мМ EDTA, рН 8.0) с бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл. Пробы смешивали с шестикратным буфером нанесения. Электрофорез вели в буфере ТАЕ в форезной камере при силе тока в 110 мА. По окончании электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе.

### **2.2.3 Приготовление компетентных клеток *E. Coli***

Клетки *E. coli* штаммов Stb12 и Lucigen инкубировали в 2мл LB (Luria-Bertani: 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl) без антибиотика при 37°C в течение 16-18 часов. На следующий день ночную культуру разводили в 100 раз средой из

набора для приготовления компетентных бактерий (Zymo Research, США) без антибиотика и инкубировали несколько часов до достижения оптической плотности 0.4-0.6 при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали центрифугированием на холоду в течение 10 минут при 3000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 2 мл отмывочного буфера (Zymo Research), центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин, ресуспендировали в компетентном буфере (Zymo Research), аликвотировали и замораживали при -70°C.

#### **2.2.4 Трансформация**

К размороженной на льду аликвоте (200 мкл) компетентных клеток добавляли раствор ДНК и инкубировали в течение 15 минут на льду. Затем пробирки с клетками прогревали при температуре 42°C в течение 40-50 секунд и инкубировали на льду в течение 2 минут. Суспензию клеток переносили в 200 мкл среды LB без антибиотика, инкубировали в термостате при 37°C 1 час для репарации клеточной стенки и начала экспрессии генов устойчивости к селективному антибиотику (ампициллин). После этого суспензию клеток высевали на чашку Петри с LB-агаром и селективным антибиотиком. Чашку Петри помещали в воздушный термостат на 37°C на 14-16 часов.

#### **2.2.5 Анализ последовательностей ДНК и РНК**

Для работы и анализа с последовательностями ДНК и белка использовали программное обеспечение SnapGene® и пакет программ Lasergene 6 (dnastar): программа SeqBuilder служила для анализа сайтов рестрикции в последовательности ДНК, сборки векторов и их картирования; SeqMan позволяла анализировать данные, полученные по секвенированию образцов ДНК. Анализ РНК проводили путем загрузки последовательности ДНК в онлайн программу mfold. Образование вторичных структур РНК рассчитывали при температуре 37°C.

#### **2.2.6 Амплификация фрагментов ДНК методом ПЦР**

##### *Амплификация ДНК генов CD4, CXCR4, BST2 с геномной или плазмидной ДНК*

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) в объеме 50 мкл.

В инкубационную смесь добавляли:

- 5 мкл десятикратного буфера для Pfu-полимеразы (Сибэнзим, Россия);
- 0.4-0.8 мкМ каждого праймера;
- 5 мкл dNTPs (Сибэнзим, Россия);



- 5 ед. Pfu -полимеразы (Сибэнзим);
- 50-100 нг ДНК-матрицы;
- Деионизированная вода до 50мкл
- Минеральное масло (3 капли) для предотвращения испарения ПЦР-смеси

Аmplификацию проводили по следующей схеме:

Предварительная денатурация 95°C, 2 мин

1) 32 цикла:

Денатурация 95°C, 30 сек

Отжиг праймеров AA°C, 30 сек

Элонгация 72°C, BB мин

2) Элонгация 72°C, 5 мин

Расчет температуры отжига праймера (AA) производили по формуле:  $AA = 2^{\circ}\text{C} \times n(\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n(\text{G}+\text{C}) - 5^{\circ}\text{C}$ .

где n - число соответствующих нуклеотидов.

Расчёт оптимального времени элонгации (BB) проводили из расчёта скорости работы Pfu-полимеразы 1 т.п.о./мин.

*Аmplификация донорской ДНК для получения нок-ина (knock-in) в ген KPNA1:*

Полимеразную цепную реакцию проводили в объёме 100 мкл.

В инкубационную смесь добавляли:

- 10 мкл 10×Taq буфер (Сибэнзим, Россия);
- 50 нг ДНК-матрицы (pUCHR-Clover-smAID-P2A-CD5HA2-bglpA);
- 10 мкл 5'-праймер (С=40 мМ);
- 10 мкл 3'-праймер (С=40 мМ);
- 10 мкл dNTPs (Сибэнзим, Россия);
- 2 мкл Taq-полимераза(Сибэнзим, Россия);
- H<sub>2</sub>O деионизированная до 100 мкл

Аmplификацию проводили по следующей схеме:

1. Предварительная денатурация 95°C, 2 мин
2. 15 циклов:
  - Денатурация 95°C, 20 сек
  - Отжиг праймеров 54°C, 20 сек
  - Элонгация 72°C, 25 сек
3. 65 циклов:
  - Денатурация 95°C, 20 сек
  - Элонгация 72°C, 25 сек
4. Элонгация 5 мин

### ***2.2.7 Анализ эффективности сплайсинга репортерной РНК методом количественной ПЦР.***

Клетки НЕК 293Т в количестве  $1,5 \times 10^6$  в 5 мл культуральной среды сажали на 6-см чашку Петри и ко-трансфицировали двумя плазмидами: 2 мкг упаковочной плазмиды ВИЧ-1 без Env (pCMV Δ8.2R) или упаковочной плазмиды, экспрессирующей геном HTLV-1 без Env (pCMV HT1-M-ΔXho) (D. Derse и др., 2001), и 3 мкг соответствующего репортерного вектора. На следующее утро среду меняли. Через 48 часов после трансфекции супернатант собирали и центрифугировали в течение 15 минут при 3000xg для удаления клеточного дебриса. Далее супернатант фильтровали через фильтровальную насадку с диаметром пор 0,45 мкм. Супернатант, содержащий вирусные частицы, аликвотировали по 1,5 мл в эппендорфы и центрифугировали при 17 000 x g в течение 2,5 часов. Супернатант удаляли, а из осадка вирусных частиц выделяли РНК с помощью набора GeneJet RNA Purification Kit (Fermentas). РНК переводили в кДНК с помощью реакции обратной транскрипции в присутствии 6-нуклеотидных случайных праймеров, dNTPs, обратной транскриптазы (Reverse transcriptase, RT), RT буфера (Сибэнзим), которую проводили при 37°C в течение 2 часов.

Для проведения количественной ПЦР были подобраны сплайс-специфические праймеры для каждого репортерного гена и одна пара праймеров для детекции несплайсированной РНК. Все праймеры были проверены в онлайн-программе nucleotide BLAST на специфичность против Human Ref RNA и DNA. Последовательности праймеров для количественной ПЦР указаны в таблице 1.

**Таблица 1**

Название	5'-праймер	3'-праймер
Интрон (не сплайсированный)	TGGTGGCCAAACA TACATTGC	TGTTCCCTCACCCCTGG ACAT
inGFpT (сплайсированный)	TGAAGCTGCCATC CAGATCGT	CGACTTCAAGGTGAT GGGCA
inLuc (сплайсированный)	ATTAACGCCCAGC GTTTTCC	ACACCCGAGGGGGAT GATAA
inmCherry (сплайсированный)	CTCGGGGAAGGAC AGTTTCAA	AAGCTGAAGGTGACC AAGGG
inRFpT-2 (сплайсированный)	AGTTCACCCCGTT GATCTTG	ACACCCGAGGGGGAT GATAA

Количественную ПЦР проводили в триплетах для каждого образца, используя готовую смесь реагентов, содержащую интеркалирующий краситель SYBR Green I (Syntol, Россия), в которую добавляли по 0,4 мкМ каждого из праймеров и 50-100 нг кДНК, полученной в ходе реакции обратной транскрипции. Амплификацию проводили на приборе iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) при следующих параметрах: один цикл денатурации при 95°C в течение 2 минут, затем 45 циклов амплификации (95°C 15с, 58°C 15с и 72°C 15с). По окончании реакции получали кривые плавления для каждого ПЦР продукта. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения iCycler software. Уровень сплайсированной и несплайсированной репортерной РНК в вирусных частицах измеряли для каждого образца. Эффективность сплайсинга РНК репортера определяли как отношение сплайсированной РНК к сумме сплайсированной и несплайсированной РНК в образце по формуле:  $1/(1+2^{A-B}) * 100$ , где А – это пороговый цикл для ПЦР продукта, соответствующего сплайсированной РНК, а В – тот же показатель для несплайсированной РНК.

## ***2.2.8 Конструирование плазмид***

### ***2.2.8.1 Конструирование интрон-содержащих репортерных плазмид***

Все модификации репортерных генов были проведены на основе ранее разработанных векторов, содержащих репортерные конструкции inYFP и inLuc и предназначенных для измерения ВИЧ-1 и HTLV-1 инфекции (D. Mazurov и др., 2010). Для конструирования новых векторов, экспрессирующих флуоресцентные белки, мы использовали гены *gfp-turbo*, *rfp-turbo* (компания Евроген, Россия), а также ген *mCherry* (Clontech, США). Все сайты в генах репортеров, содержащие последовательность A(C)AG/N, были проанализированы с помощью интернет-ресурса *Mfold RNA folding web tool*. Подходящие для вставки интрона сайты A(C)AG/N с минимальным количеством спаренных нуклеотидов в областях, примыкающих к сплайс-донор и сплайс-акцептор сайтам, были отобраны для дальнейшего анализа вторичной структуры РНК репортера, уже в сборке с последовательностью интрона. В итоге, если вставка интрона не увеличивала количество спаренных нуклеотидов в последовательности гена-репортера, примыкающей к интрону, то такой сайт выбирали для дальнейшей сборки интрона и репортера.

Последовательность интрона из гена гамма-глобина человека, а также 5'- и 3'-фрагменты репортерных генов, фланкирующие интрон, были амплифицированы и слиты с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, имеющими соответствующие области перекрытия, и затем клонированы в плазмиду pJet1.2 (Fermentas, США). Полученные последовательности ПЦР продуктов верифицировали методом ДНК секвенирования.

Репортерные гены, содержащие интрон, были клонированы первоначально в плазмиду pCRU5-inYFP (D. Mazurov и др., 2010) с использованием рестрикционных сайтов Mlu I и Bgl II, а затем в плазмиду pUCHR-inYFP с использованием рестрикционных сайтов Mlu I и Nhe I.

### ***2.2.8.2 Создание конструкций с miR30-shRNA***

Таргетные последовательности для shRNA на основе miR-30, специфичные к интрону гамма-глобина человека, были определены с использованием интернет-ресурсов *Invitrogen Block-it<sup>TM</sup> RNAi Designer tool* и *Ambion siRNA selection tool*. Далее, среди полученных таргетных последовательностей shRNA были отобраны те последовательности, которые отвечали областям минимального спаривания нуклеотидов при сборке вторичной структуры РНК интрона с помощью программы *mfold*. Две последовательности shRNA, нацеленные на интрон начиная с позиции 79 и 330 и

отвечающие наилучшим образом всем требованиям, перечисленным выше, были клонированы в вектор pGIPZ (Openbiosystems, США). Это лентивирусный вектор, который предназначен для экспрессии shRNA в контексте последовательности miR-30. Для селекции клеток, трансдуцированных shRNA, вектор кодирует ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) и ген устойчивости к пурамицину (puro). В качестве контрольного использовали ранее созданный вектор pGIPZ (D. Mazurov и др., 2012), кодирующий shRNA против фосфопротеина-1 (P1) респираторного синцитиального вируса (RSV). Последовательности MiR30-shRNA указаны в таблице 2. Большими буквами и подчеркиванием выделены таргетные последовательности, специфичные для фосфопротеина-1 RSV и интрона гамма-глобина человека.

**Таблица 2**

shRN	Последовательность ДНК:
A:	
miR30 -shP1	ctcgagAAGGTATATGCTGTTGACAGTGAGCGCCGATAATATAA <u>CTGCAAGATTtagtgaagccacagatgtaAATCTTGCAGTTATATTATCGTTGCC</u> TACTGCCTCggatcc
miR30 -sh79	ctcgagAAGGTATATGCTGTTGACAGTGAGCGCGCAGGGTGTGA <u>GCTGTTTGAAtagtgaagccacagatgtaTTCAAACAGCTCACACCCTGCTTGCC</u> TACTGCCTCggatcc
miR30 -sh330	ctcgagAAGGTATATGCTGTTGACAGTGAGCGAAGGACAAGTAT <u>GGTCATTAAtagtgaagccacagatgtaTTTAATGACCATACTTGTCTGTGCC</u> TACTGCCTCggatcc

Далее последовательности ДНК из плазмиды pGIPZ, содержащие области 5'-miR30, shRNA и 3'-miR30, были амплифицированы методом ПЦР в присутствии пары праймеров, имеющих по концам сайт рестрикции XbaI:

5'-CGTCTAGATGTTTGAATGAGGCTTCAGTAC-3'

5'- CGTCTAGAAGTGATTTAATTTATACCATTTTAATTC-3',

ПЦР продукты были клонированы в плазмиду pJet, верифицированы методом секвенирования ДНК и далее клонированы в вирусные векторы в область интрона по сайту

рестрикции XbaI. Данный сайт является уникальным для ВИЧ-1 или HTLV-1 репортерных конструкций и находится в удаленном положении от сплайс-элементов интрона, а также последовательностей shRNA, таргетирующих интрон.

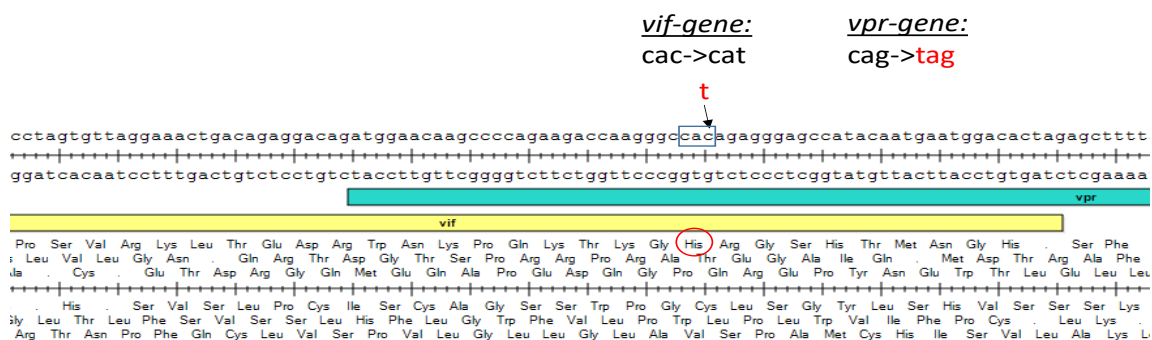
### 2.2.8.3 Создание конструкций с делециями вспомогательных генов ВИЧ-1 на основе упаковочной плазмиды pCMV Δ8.2R

а) Nef. Плазмиду разрезали по уникальному сайту рестрикции XhoI, находящемуся в 5'-области Nef, концы ДНК затупляли фрагментом Кленова и сшивали, что приводило к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона.

б) Vpr и Vif. Плазмиду pCMV Δ8.2R обрабатывали эндонуклеазой рестрикции Afl II, фланкирующим данные гены. Концы затупляли фрагментом Кленова. Полученный в результате рестрикции фрагмент ДНК 892bp клонировали в плазмиду pKS Bluescript, предварительно обработанную эндонуклеазой Sma I. После лигирования сайт Afl II восстанавливался. Затем на переклонированном фрагменте проводили мутагенез методом QuickChange PCR Mutagenesis.

в) Vpr. Плазмиду pCMV Δ8.2R обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Bam HI/Sal I и фрагмент ДНК 1389bp, содержащий ген Vpr, временно переклонировали в плазмиду pKS Bluescript, обработанную теми же рестриктазами. На полученной плазмиде ставили QuickChange PCR Mutagenesis.

Мутированные нуклеотиды в последовательности праймеров показаны строчными буквами. Так как 5'-область Vpr перекрывается с 3'-концом Vif, для мутации Vpr мы выбрали последний нуклеотид в триплете кодировки Vif, замена которого не меняла аминокислотную кодировку Vif, но формировала стоп-кодон в рамке считывания Vpr (см. рис. 10). Временное переклонирование фрагментов генома ВИЧ в малый вектор pKS Bluescript проводили из-за того, что QuickChange PCR проходит более эффективно на коротких плаزمидках. Полученные клоны после мутагенеза верифицировали секвенированием и фрагменты ДНК с заданной мутацией переклонировали обратно в вирусный вектор.



**Рисунок 10. Участок карты плазмиды pCMV Δ8.2R ΔVpR, отражающей принцип внедрения стоп-кодона в ген *vpr* без изменения аминокислотной кодировки гена *vif*.**

### 2.2.9 Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA)

Определение уровня продукции вирусных частиц определяли по количеству вирусного белка Gag в лизированных клеточных суспензиях (тотальный Gag) или в супернатантах после центрифугирования и фильтрации надосадка инфицированных клеток. Измерение Gag ВИЧ-1 проводилось с помощью наборов Вектор-Бест (Россия) согласно прилагаемой инструкции, измерение Gag HTLV-1 проводилось с помощью наборов Zepmetrics (США). На стрипы с лунками с иммобилизованными антителами наносились образцы в лизирующем буфере и инкубировались при 37°C в течение 1 часа. В дополнение к опытным образцам наносились также стандарты с известной концентрацией и в двукратных разведениях для построения калибровочных кривых. Далее проводили отмывку 6 раз путем нанесения в лунки 400 мкл раствора PBS-Tween 20. После этого, в лунки наносились первичные антитела и инкубировались 30 минут, после отмывки наносились вторичные антитела и инкубировались 1 час. Далее опять проводили отмывку PBS-Tween. После этого в лунки добавляли 100 мкл субстрата (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ТМВ), инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Затем добавляли по 100 мкл стоп-раствора (серная кислота) для остановки реакции. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioRad iMark при длине волны 415 нм при референсной длине волны равной 655 нм.

### 2.2.10 Вестерн-блоттинг

#### Приготовление клеточного лизата

Лизат клеток готовили путем отмывки в PBS и последующего ресуспендирования клеточного осадка (1 млн клеток) в 100 мкл лизирующего буфера, содержащего 1% Triton X-100 (Sigma, США), 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5) и ингибиторы протеаз (Complete Mini; Roche Applied Science, Базель, Швейцария). После 30-45 минут инкубации на льду,

крупные клеточные остатки удаляли центрифугированием при 20000 g в течение 15 мин при 4°C. Затем собирали супернатант, содержащий белок.

### *Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле по Лэммли и Вестерн-блот*

Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лэммли в SDS-полиакриламидном геле в ячейке Mini-PROTEAN-3 (Bio-Rad). Процентность разделяющего геля составляла 15%. В качестве маркеров молекулярной массы использовали предокрашенные стандарты (The Thermo Scientific Pierce Prestained Protein Molecular Weight Marker), в лунки загружали полученные по описанной выше методике образцы (иммунопреципитаты или лизаты). Образцы разгоняли 15 минут при 75V, затем 1 час 15 минут при 200V. По окончании электрофореза белки из геля переносили на PVDF мембрану с порами величиной пор 0.22 нм с помощью оборудования Trans-blotSD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad) при 10V 25 минут. Мембрану блокировали в PBS-Tween, содержащим 5% обезжиренного молока в течение 1 часа, после чего инкубировали с первичными антителами. Затем блот отмывали 3 раза по 10 минут PBS-Tween и красили анти-кроличьими антителами, меченными пероксидазой хрена (Cell Signaling). Затем снова трижды отмывали блот с PBS-Tween и анализировали хемилюминесценцию образцов на приборе ChemiDoc (Bio-Rad) после добавления субстрата для пероксидазы (Pierce).

## **2.3. Методы работы с эукариотическими клетками**

### **2.3.1 Трансфекция и инфекция**

Клетки линии НЕК 293Т были трансфицированы с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно прилагаемой инструкции. Клетки линии Jurkat ( $2 \times 10^6$  в 100 мкл буфера R фирмы Invitrogen) были трансфицированы с помощью капиллярного электропоратора Neon фирмы Invitrogen. Режим электропорации включал три импульса шириной 10 мс и напряжением 1,350 В.

Метод трансфекции/инфекции в один этап на клетках НЕК 293Т и НЕК 293Т/CD4/X4 проводили следующим образом: 200 тыс. клеток на лунку в объеме 1 мл полной культуральной среды DMEM рассевали на 12-луночный планшет. На следующий день клетки ко-трансфицировали тремя плазмидами:

1. Упаковочная плазида ВИЧ-1: pCMV  $\Delta$ 8.2R (Addgene 12263) **0,6 мкг**
2. Плазида, экспрессирующая белок G вируса везикулярного стоматита (VSV): pCMV VSV-G (Addgene 8454) или плазида, экспрессирующая белок оболочки Env ВИЧ-1 штамма NL4-3 (Т. Murakami, E.O. Freed, 2000) **0,15 мкг**



3. Одна из ВИЧ-1 репортерных плазмид **0,9 мкг** (pUCHR inLuc/inGFP/inmCherry и т.п.)

Для оценки инфекции HTLV-1 клетки ко-трансфицировали двумя плазмидами:

1. Плазида, экспрессирующая полный геном HTLV-1: pCMV HT1-M (D. Derse и др., 2001; M.S. Mitchell и др., 2007) **0,6 мкг**
2. Одна из HTLV-1 репортерных плазмид **0,9 мкг** (pCRU5 inLuc/inGFP/inmCherry и т.п.)

Через 6 часов после трансфекции в лунках меняли среду на свежую полную культуральную среду DMEM. Трансфицированные клетки продуцировали псевдовirusy, в которые упаковывалась РНК репортера. За счет поверхностного белка VSV-G, вирусные частицы инфицировали окружающие клетки НЕК 293Т, что детектировалось по трансдукции гена репортера в виде флуоресценции или люминесценции. В зависимости от эксперимента, результаты экспрессии репортера оценивали через 2-5 суток после трансфекции.

При использовании репортерных конструкций с генами флуоресцирующих белков образцы анализировали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSAria SORP (Becton Dickinson, США) под руководством Поташниковой Д. на базе кафедры цитологии и гистологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова (подробнее см. ниже). Если в качестве гена-репортера использовалась люцифераза светлячков, клетки подвергали лизису с помощью лизирующего буфера (Promega, США), лизат смешивали с люциферазным реагентом Glo (Promega), и активность люциферазы измеряли на приборе GloMax®-Multi Jr Single-Tube Multimode Reader (Promega).

Для тестов межклеточной инфекции на клетках НЕК 293Т/CD4/X4 перед измерением люминесценции небольшое количество клеточной суспензии (вместе со средой) сохраняли для измерения тотального уровня Gag методом ИФА и последующей нормализации результатов инфекционных тестов.

Для инициации ВИЧ-1 межклеточной инфекции в суспензии лимфоидных клеток, клетки Jurkat в количестве  $10^6$  электропорировали следующими плазмидами:

1. Репортерный вектор pUCHR-inGFPt и/или pUCHR-inmCherry **3 мкг**
2. Упаковочная плазида: pCMV Δ8.2R **2 мкг**

3. Плазида, экспрессирующая белок оболочки Env ВИЧ-1 штамма NL4-3 (Т. Murakami, E.O. Freed, 2000) **0,8 мкг**. В контроле «по env» эта плазида отсутствует.

Через 5-6 часов после трансфекции клетки были однократно отмыты натрий-фосфатным буфером (PBS) и смешаны с клетками культуры Raji/CD4 в количестве  $5 \times 10^5$  в объеме 5 мл культуральной среды. На этом этапе к некоторым образцам добавляли AZT в конечной концентрации 20 мкМ. За 16 часов до анализа клетки стимулировали PMA в концентрации 20 нМ. Пробы анализировали методом проточной цитофлуориметрии через 72 часа после электропорации.

Для постановки теста инфекции свободными вирусными частицами на клетках НЕК 293Т/CD4/X4 супернатант от трансфицированных клеток собирали, фильтровали и добавляли к посеянным за 24 часа до этого клеткам в 12л планшете (200 тыс. в 1 мл). На этом этапе часть супернатанта сохраняли для последующего ИФА и нормализации инфекции. Спустя 2 суток люминесценцию клеток анализировали на приборе GloMax®-Multi Jr Single-Tube Multimode Reader (Promega).

Для постановки теста инфекции свободными вирусными частицами на лимфоидных клетках клетки Jurkat в 10см чашках Петри трансфицировали 6  $\mu\text{g}$  pUCHR-inLuc-mR, 4  $\mu\text{g}$  pCMV  $\Delta$ 8.2R без мутаций (wt) или с мутациями, а также 1.6  $\mu\text{g}$  pIII<sub>NL4env</sub>. Через сутки меняли среду, через 72 часа собирали супернатант, фильтровали через фильтры с порами 0.45 $\mu\text{m}$  и концентрировали центрифугированием в течение 2.5 часов 30000g и ресуспендировали в 1мл. Небольшие аликвоты сконцентрированного вируса сохраняли для анализа в ИФА и нормализации данных инфекции. Концентрированный вирус добавляли к  $10^6$  Raji/CD4 на ночь. Далее, переносили клетки в лунки 6л планшета и инкубировали 72 часа. Через 3 дня измеряли инфекцию по сигналу люциферазы.

#### 2.3.1.1. Статистическая обработка данных

Для сравнения двух независимых выборок и определения степени достоверности использовали t-критерий Стьюдента.

#### **2.3.2 Проточная цитометрия и клеточный сортинг**

Уровень инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1 оценивали по экспрессии генов-репортеров методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Для анализа уровня инфекции методом проточной цитометрии клетки НЕК 293Т обрабатывали трипсином в течение 5 минут, ресуспендировали в среде, содержащей 10% эмбриональную

телячью сыворотку, однократно отмывали раствором PBS и ресуспендировали в PBS. Для анализа клеток в проточной цитометрии использовался прибор Cytoflex S, сортировку проводили на приборе FACS Aria II и FACS Aria III (Becton Dickinson, США). Параметры лазеров и фильтров возбуждения/эмиссия/ширина пропускания были следующими: для детекции флуоресцентных белков GFP-turbo и YFP (488 нм/515 нм/20 нм), для RFP-turbo (561 нм/585 нм/15 нм), для mCherry (592 нм/615 нм/24 нм). Полученные результаты обрабатывались с использованием программного обеспечения FlowJo.

### **2.3.3. Флуоресцентная микроскопия**

Данные по флуоресцентной микроскопии получены на приборе Olympus IX-71, инвертированном флуоресцентном микроскопе, оборудованном следующими фильтрами возбуждения/эмиссии: для GFP-turbo и eYFP (470-495 нм/510-550 нм), для RFP-turbo (540-550 нм/575-625 нм). Полученные изображения анализировались с помощью программного обеспечения Olympus cellSens.

### **2.3.4. Метод SORTS**

Нокаутирование клеточных линий по гену *KPNA1* проводили новым методом SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection), разработанным в нашей лаборатории. Метод позволяет с помощью клеточного сортера проводить быструю селекцию пула клеток, в которых произошел нокаут по генам, кодирующим внутриклеточные или секретируемые белки. Основой метода служит нок-ин (knock-in) донорской конструкции, в состав которой входят плечи гомологии гена интереса, а также последовательность эпитопного тага HA в составе GPI-белка CD52. GPI-белки (Glycosylphosphatidylinositol) процессируются в эндоплазматическом ретикулуме, где лидерный пептид и GPI-сигнал отщепляются, а срединная часть экспортируется на плазматическую мембрану в липидные рафты, к которым она заякоревается с помощью GPI-хвоста. В составе конструкции с 5'-конца была внедрена последовательность P2A, вызывающая прыжок рибосомы и трансляцию двух отдельных белков с одной РНК. Трансляция при этом происходит с эндогенного старт-кодона.

Для получения нок-ина в ген *KPNA1* были подобраны две гидовых РНК, нацеленные на 4 и 8 экзоны гена:

5'-gR-KPNA1ex4: CACCGACAAACCTGGCCACTACTCC

3'-gR-hKPNA1ex4: AAACGGAGTAGTGGCCAGGTTTGTC

5'-gR-KPNA1ex8: CACCGTCATCGATGCGGGAGTATGT

3'-gR-hKPNA1ex8: AAACACATACTCCCGCATCGATGAC

Для ПЦР-амплификации донорской конструкции (содержит плечи гомологии к 5'- и 3'-областям относительно разрыва в гене KPNA-1, P2A последовательность, а также HA в составе GPI-белка CD52) были подобраны праймеры:

5'-KP1ex4-2A-bglpA-in:

GCTGTAAAGTTCTTGCATTGAAATCAAAGGATTTTTTTTTTTCTTTTATTTTATGGGGA  
AACAGAACСТААСССТССТАТТГАТГААГТТАТСАГСГГАТССГГСГСААСАААС

3'-KP1ex4-pA-in:

САААТАААААТТТТСААААГГААТТААГТТАТГАГГСААТАААТАААААТ  
ТАТТСГСАСТСГСАГТГАСААТТСТТТТСГТТТГАГГААСТССАСАСАААААААС  
СААСАСАС

5'-KP1ex8-2A-bglpA-in:

ССТГГТТГСТГТТТГТСАГТГАСАСТГАТГТАСТГГСТГАТГССТГСТГГГС  
ССТСТСАТАТСТАТСАГАТГГАСССААТГАТАААААТТСААГСГГГАТССГГСГСААС  
АААС

3'-KP1ex8-pA-in:

САТТААТАТТТААГТАТТАГСАГСТАГААААСТАГТАССААГГГАГАГААА  
ГТГГАСАСАСТТТСТААААГАТАТСТТАСАТСАГСАГТТССАСААГТССАСАСАААА  
ААССААСАСАС

Для получения донорской ДНК в качестве матрицы использовался вектор pUCHR-Clover-smAID-P2A-CD5HA2-bglpA (рис. 11).



**Рисунок 11.** Схема ПЦР-амплификации донорской ДНК для нок-ин-аута (КИО) гена KPNA1 с использованием вектора pUCHR-Clover-smAID-P2A-CD5HA2-bglpA в качестве матрицы. CD52 обозначен голубым цветом, HA – оранжевым, P2A – красным, polyA сигнал гена β-глобина – розовым.

Далее, клетки НЕК 293Т трансфицировали Cas9wt 3мкг, pKS-gRNA-KPNA1(ex4/ex8) 1 мкг и донорской конструкцией 1мкг. После трансфекции клетки растили в течение 3 дней, сортировали (2-3 раза) по экспрессии НА на поверхности до получения популяции с чистотой экспрессии НА более 95%. Сортированные клетки проверяли на наличие нокаута по гену *KPNA1* методом Вестерн-блота.

## 2.4 Подготовка образцов на глубокого секвенирования и анализ данных

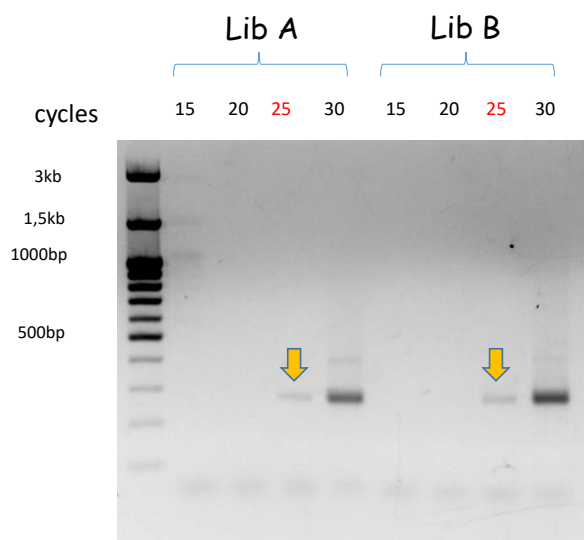
Процесс приготовления образцов включал в себя следующие этапы:

а) Для приготовления образцов 1 и 2 методом ПЦР была амплифицирована gRNA-кодирующая часть лентивирусных векторов библиотеки нокаутов GeCKO (пул векторов LentiCRISPR v2 библиотеки, разделенной на части А и В, обозначенные далее v2 libA (v2a), v2 libB (v2b)) v2 libA и libB (общий объем ДНК ~14pg, или  $10^6$  копий), соответственно. Задействованные для этого праймеры:

5'-GeCKO: AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCG

3'-GeCKO: TCTACTATTCTTTCCCTGCACTGTgtgggcatgtgcgctctg

Смесь для ПЦР была приготовлена с Pfu-полимеразой, а сама реакция проведена при следующих параметрах: 95C 5 min, (95C 30s, 64C 30s, 72C 30s)x25, 72C 5 min. Количество циклов было подобрано исходя из предварительных экспериментов (см. рис.12)



**Рисунок 12. Подбор условий для подготовки образцов для NGS.**

б) Для приготовления образцов 3-6, из библиотечных клеток выделяли геномную ДНК, после чего аналогичным образом (как в пункте а) с 5 мкг амплифицировали gRNA-

кодирующую часть интегрированного лентивирусного вектора с помощью праймеров GeCKO (см. пункт а).

в) Далее мы бар-кодировали полученные образцы. Для этого проводили ПЦР с уникальными для каждого образца Illumina праймерами. Условия реакции (95C 5 min, (95C 30s, 64C 30s, 72C 30s)x17, 72C 5 min) были подобраны экспериментально.

Получившиеся образцы смешивали и отдавали на HiSeq секвенирование (Евроген).

Полученные сырые FASTQ файлы обрабатывали с помощью программного обеспечения MAGeCK. Данное ПО было разработано Wei Li и Han Xu в лаборатории Школы медицины Гарвардского университета (<https://sourceforge.net/p/mageck/wiki/Home/>) и применялось уже в ряде исследований (Hart et al. Cell 2015, Zhang et al. Nature 2016, Michlits et al. Nature Methods 2017, Bester et al. Cell 2018). Программное обеспечение MAGeCK в сравнении с другими ПО имеет ряд преимуществ, таких как возможность обработать сырые данные, не выгружая их на онлайн платформу, возможность оценить качество FASTQ файлов, а также способность программы проводить сравнительный анализ контрольного и опытного экспериментов, ранжируя гены по частоте встречаемости их нокаутов.

Далее приведен алгоритм анализа данных глубокого секвенирования с помощью ПО MAGeCK:

- Первоначально, сырые FASTQ файлы были подвергнуты предварительной подготовке: каждая последовательность была выравнена по константному участку гидовой РНК, предшествующему таргетной последовательности, все нуклеотиды до константного участка были отброшены (тримминг файлов). Код данной программы был написан на языке программирования Python и представлен на ресурсе Github: <https://github.com/tridcatov/bioinfo/blob/master/mageck/trim.py>.

- Далее на базе операционной системы Linux была установлена программа MAGeCK и для каждого FASTQ файла была построена таблица с количеством прочтений для каждой гидовой РНК библиотеки (read count table). Для этого в программе запускалась команда count с параметрами: `mageck count -l [reference library] -n [file name] --sample-label [control sample name],[test sample name] --fastq [control sample] [test sample] --norm-method total`.

- После этого был проведен сравнительный анализ прочтений для каждой гидовой РНК в таблице в контрольной библиотеке с нокаутами до и после инфекционного теста с HTLV-1. Для этого в программе запускалась команда test с параметрами: `mageck`

test -k [count table] -t [test sample name] -c [control sample name] --norm-method total --sort-criteria pos -n [file name] --pdf-report. Результатом выполнения такой программы является список генов, ранжированный по степени обогащения количества прочтений соответствующих генов РНК после инфекционного теста.

- В полученных файлах с ранжированными списками генов были проанализированы результаты с  $p \text{ value} \leq 0.05$  и найдены гены, встречающиеся во всех трех независимых скринингах. Для этого была написана программа на языке программирования Python, представленная на ресурсе Github (<https://github.com/tridcatov/bioinfo/blob/master/mageck/crosscheck/summary.py>).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Усовершенствование интрон-содержащих векторов для оценки уровня межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1

Разработанные ранее в лаборатории репортерные векторы на основе желтого флуоресцентного белка eYFP и люциферазы светлячка (inYFP и inLuc, соответственно, где in – интрон) (D. Mazurov и др., 2010) позволяют количественно измерять межклеточную инфекцию вирусов ВИЧ-1 и HTLV-1. Если тест на основе люциферазы имел достаточную чувствительность для измерения инфекции, то детекция инфицированных клеток по экспрессии eYFP была практически невозможна в силу низкого уровня трансдукции inYFP. В связи с этим, была поставлена задача оптимизировать метод детекции инфицированных клеток по флуоресценции путем создания новых репортерных векторов с улучшенными характеристиками.

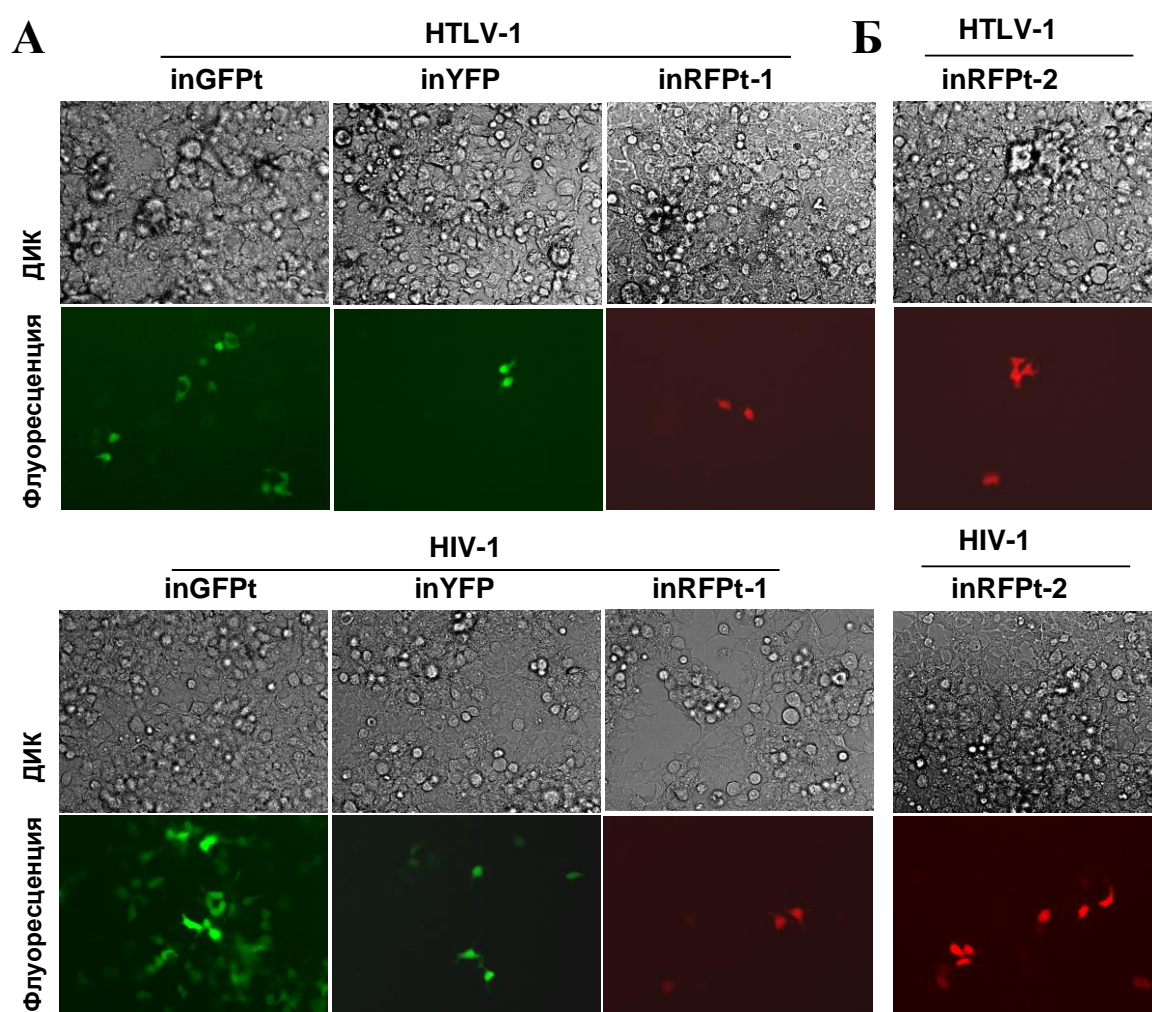
#### 3.1.1 Разработка репортерных векторов на основе флуоресцентных белков GFP-turbo и RFP-turbo

На первом этапе были сконструированы вирусные векторы на основе двух флуоресцентных белков – зеленого (GFP-turbo) и красного (RFP-turbo). Для этого в соответствующих генах *gfp-turbo* и *rfp-turbo* проводили поиск потенциальных сайтов сплайсинга для вставки интрона из гена гамма-глобина человека. Подходящие сайты должны были содержать последовательность нуклеотидов A(или C)AG/N, где N – это любой нуклеотид, а наклонная черта – предполагаемое место вставки интрона. Опираясь только на соответствие вышеуказанному мотиву, на основе ранее разработанных векторов HTLV-1 inLuc (inYFP) и ВИЧ-1 inLuc (inYFP) (D. Mazurov и др., 2010) были сконструированы первые векторы inGFpT и inRFpT-1.

Полученные конструкции были проверены методом одноэтапной трансфекции/инфекции на клетках HEK 293T. Для этого HEK 293T клетки трансфицировали одним из репортерных векторов и вспомогательными конструкциями, необходимыми для сборки вируса. Благодаря наличию psi-сигнала репортерная РНК упаковывается в вирусные частицы и после заражения клеток-мишеней способна экспрессировать полноценный белок-репортер не ранее, чем через 36-48 часов после трансфекции. Клетки HEK 293T анализировали на флуоресцентном микроскопе через 48-72 часа после трансфекции. Полученные данные показали, что уровень экспрессии inGFpT



был значительно выше, чем экспрессии inRFpT-1 или экспрессии ранее созданного вектора inYFP. Эта разница сохранялась как для ВИЧ-1, так и для HTLV-1 векторов (рисунок 13А).



**Рисунок 13. Флуоресцентная микроскопия НЕК 293Т клеток после ко-трансфекции одним из репортерных векторов (HIV-1- или HTLV-1- inGFPt, inRFpT-1, inYFP (А), inRFpT-2 (Б)) и вспомогательными плазмидами для сборки вируса. Микроскопия по методу дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) показывает плотность клеток и соответствует области фиксации флуоресценции.**

Таким образом, уровень экспрессии репортерных белков варьирует в зависимости от используемой генетической конструкции репортера. Возможным объяснением этого является то, что положение интрона в гене репортера влияет на эффективность сплайсинга и удаление интрона в эффекторной клетке.

### 3.1.2 Оптимизация сайта для вставки интрона в последовательность генов-репортеров

Сравнение вторичной структуры РНК репортерных конструкций, имевшихся к тому моменту (экспрессирующих GFPt, RFPt-1, а также Luc и YFP, разработанные ранее), с помощью интернет-ресурса *Mfold RNA-folding web tool* показало, что во вторичной структуре РНК репортеров inGFP и inLuc имелось больше неспаренных нуклеотидов в областях сплайс-донора (SD) и сплайс-акцептора (SA) по сравнению с РНК inYFP и inRFPt-1, что соответствовало более высокому уровню экспрессии репортеров inGFP и inLuc, чем inYFP и inRFPt-1 (рисунок 14). Иными словами, сайты SD и SA в векторах inYFP и inRFPt-1 попадают в область образования спаренных нуклеотидов во вторичной структуре РНК, что снижает её доступность для сплайсосомы и ухудшает сплайсинг репортерной РНК.

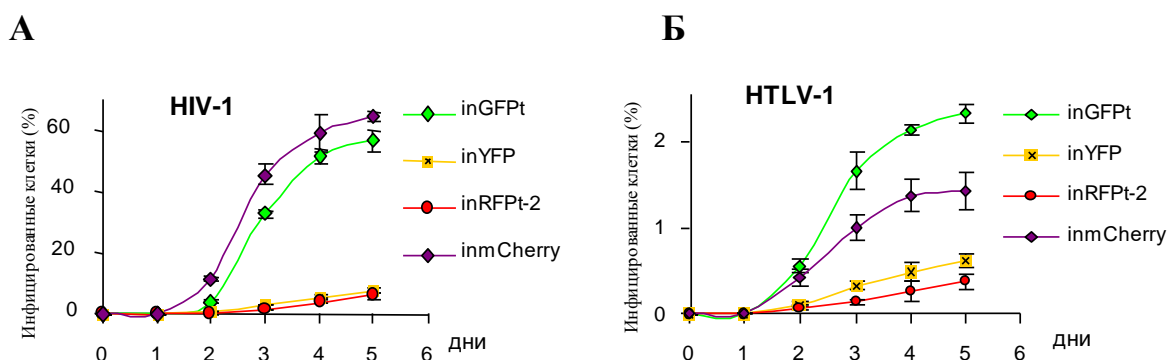
Репортер:	SD	SA	Экспрессия репортера:	
inLuc*	3'-Luc...CAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	C...Luc-5'	+++
inYFP*	3'-YFP...CAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	C...YFP-5'	+
inGFPt	3'-GFP...CAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	A...GFP-5'	++++
inRFPt 1 <sup>st</sup> gen.	3'-RFP...CAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	C...RFP-5'	+
inRFPt 2 <sup>nd</sup> gen.	3'-RFP...AAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	T...RFP-5'	++
inmCherry	3'-Cherry..CAG	GUGAGU.....intron.....ACAG	T...Cherry-5'	++++

**Рисунок 14. Схематическое изображение последовательности интрона, внедренного в различные репортерные векторы.** Ранее разработанные векторы обозначены знаком «\*». Неспаренные нуклеотиды выделены красным цветом. Относительный уровень экспрессии репортерных белков указан справа знаками «+».

Основываясь на выявленной закономерности, мы осуществили поиск наиболее оптимального сайта в гене RFPt для вставки интрона. Самым подходящим оказался сайт, в котором имелось пять неспаренных нуклеотидов в области сплайс-донора, однако ни одного неспаренного нуклеотида – в области сплайс-акцептора (рисунок 14). Полученная конструкция с интроном была проверена в тесте одноэтапной трансфекции/инфекции на клетках НЕК 293Т. Как показано на рисунке 13Б, конструкция inRFPt-2 лишь немного превосходила вектор inRFPt-1 по способности экспрессировать полноценный белок-репортер.

В связи с отсутствием оптимального сайта в последовательности гена *rfp-turbo* для разрыва интроном, мы проанализировали последовательность другого гена *mcherry*, который также кодирует красный флуоресцентный белок. В результате анализа вторичной структуры РНК данного репортера мы обнаружили сайт, в котором имелось четыре неспаренных нуклеотида в области сплайс-донора и два неспаренных нуклеотида – в области сплайс-акцептора (рисунок 14). В этот сайт был клонирован интрон и созданы векторы *inmCherry* для ВИЧ-1 и HTLV-1. Новые конструкции *inGFPt* и *inmCherry* тестировали в инфекционном тесте на клетках НЕК 293Т, как указано выше, и уровень экспрессии данных репортеров сравнивали с эффективностью трансдукции векторов *inYFP* и *inRFpT-2*.

Уровень экспрессии флуоресцентных репортерных белков измеряли методом проточной цитометрии. Инфекцию оценивали в динамике через 2-5 дней от момента трансфекции клеток НЕК 293Т. Результаты трех независимых экспериментов для ВИЧ-1 и HTLV-1 показаны на рисунках 15А и 15Б, соответственно.

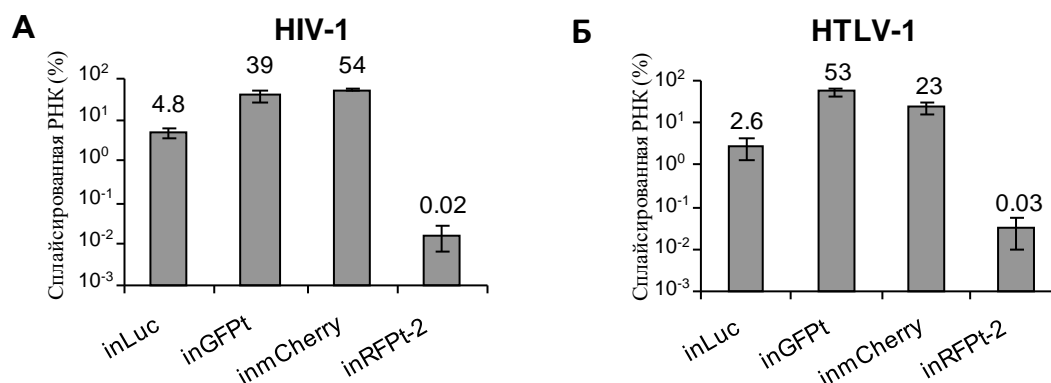


**Рисунок 15. Кинетические кривые экспрессии репортерных конструкций в клетках НЕК 293Т после инфекции псевдовирусами ВИЧ-1 (А) и HTLV-1 (Б) в тесте одноэтапной трансфекции/инфекции.** Количественная оценка уровня инфекции проведена методом проточной цитометрии. Указаны средние значения и стандартные отклонения по трем независимым экспериментам.

Из рисунка 15А можно видеть, что векторы *inGFPt* и *inmCherry* демонстрируют более высокий уровень трансдукции в инфекционном тесте по сравнению с векторами *inYFP* и *inRFpT-2*: уже через трое суток флуоресцирующих клеток наблюдалось на порядок больше.

Для того чтобы убедиться, что увеличение экспрессии репортерного гена произошло действительно благодаря более эффективному сплайсингу репортерной РНК, мы оценили уровень сплайсированной и несплайсированной РНК в вирусных частицах методом количественной ПЦР. Каждый образец кДНК, полученной в ходе реакции

обратной транскрипции, был амплифицирован с праймерами, специфичными для несплайсированной или сплайсированной РНК. Расчет процента сплайсированной РНК репортера в вирусных частицах осуществляли по формуле, приведенной в разделе «Методы». Уровень сплайсированной РНК в вирусных частицах для каждого из векторов, содержащих гены флуоресцентных белков для измерения ВИЧ-1 и HTLV-1 инфекции, представлен на рисунках 16А и 16Б, соответственно.



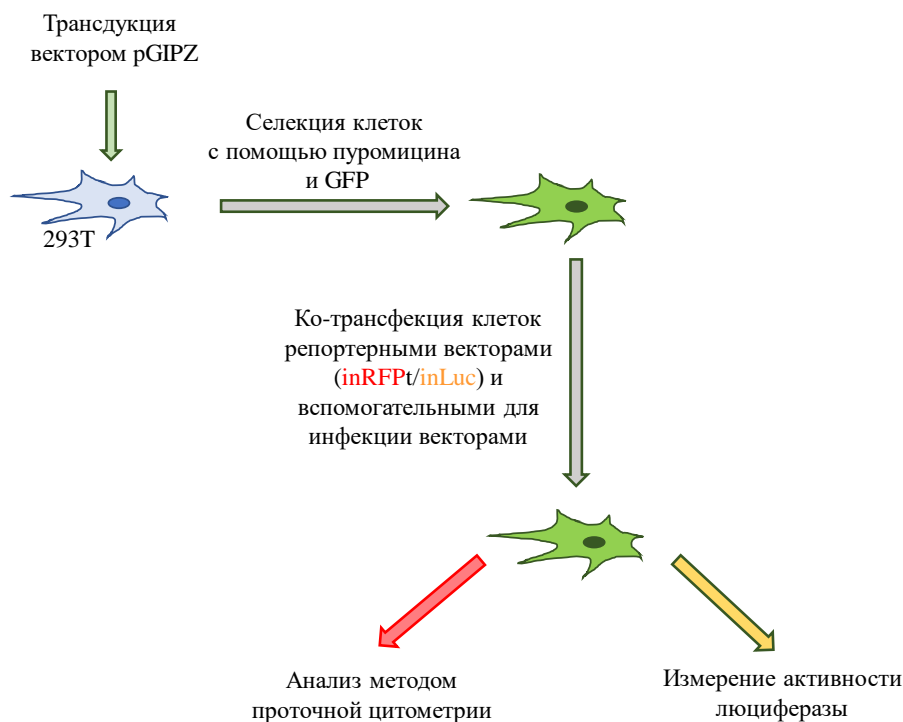
**Рисунок 16. Измерение уровня сплайсированной РНК репортера относительно общей (сплайсированной и несплайсированной) РНК в вирусоподобных частицах ВИЧ-1 (А) и HTLV-1 (Б) методом количественной ПЦР. Показаны суммарные результаты по трем независимым экспериментам. Цифрами обозначены проценты сплайсированной РНК для каждого из репортерных векторов.**

Как видно на рисунке 16, уровень сплайсинга сильно варьирует для каждой из репортерной РНК. Наиболее высокий сплайсинг наблюдается для РНК inGFpT и inmCherry как в вирусных частицах ВИЧ-1, так и HTLV-1: процент сплайсированной РНК составляет 39% и 54% для ВИЧ-1 и 53% и 23% для HTLV-1, соответственно. В то же время для вектора, содержащего ген люциферазы в качестве репортера, эффективность сплайсинга составила 5% для ВИЧ-1 и 3% для HTLV-1. Наиболее низкий уровень сплайсинга наблюдался для векторов inRFpT-2 (0,02% и 0,03% для ВИЧ-1 и HTLV-1, соответственно). Данные по уровню сплайсированной РНК репортерных генов в вирусных частицах соответствуют результатам проточной цитофлуориметрии: векторы с высоким уровнем экспрессии (inGFpT и inmCherry) показывают высокий уровень сплайсинга. Вместе, эти данные демонстрируют, что эффективность удаления интрона в процессе сплайсинга репортерного гена определяет способность зараженных клеток экспрессировать маркерный белок.

### **3.1.3 Снижение уровня интрон-содержащей РНК в вирусных частицах при экспрессии интрон-специфичных shRNA**

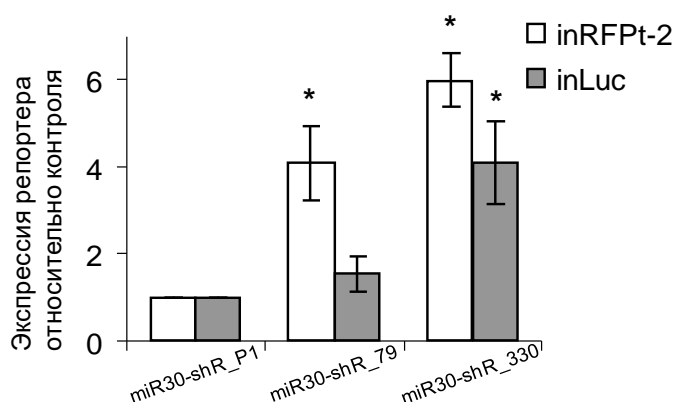
#### 3.1.3.1 Влияние интрон-специфичных miR30-shRNA, экспрессированных in trans, на уровень экспрессии и сплайсинга репортерных конструкций

Мы предположили, что уровень интрон-содержащей РНК в вирусных частицах может быть снижен за счет механизма РНК-интерференции при экспрессии интрон-специфичных shRNA. Для проверки данного предположения были разработаны интрон-специфичные shRNA (см. таблицу 2), а соответствующие последовательности клонированы в miR30-кодирующий вектор pGIPZ, который также экспрессирует GFP и IRES-puro кассету (где puro – ген устойчивости к пурамицину). Для экспрессии созданных конструкций miR30-shRNA *in trans* клетки HEK 293T стабильно трансдуцировали лентивирусным вектором pGIPZ. Селекцию трансдуцированных клеток проводили в присутствии пурамицина и контролировали по флуоресценции GFP. Затем клетки, трансдуцированные shRNA, трансфицировали репортерными векторами inRFPt-2 или inLuc, а также вспомогательной плазмидой, экспрессирующей вирусные белки ВИЧ-1, кроме Env, и плазмидой pCMV VSV-G, экспрессирующей поверхностный белок G вируса везикулярного стоматита (VSV). Спустя трое суток экспрессия красного флуоресцентного белка и люциферазы детектировалась с помощью проточного цитометра и люминометра, соответственно (рис. 17).



**Рисунок 17. Схема эксперимента для исследования влияния интрон-специфичных shRNA, экспрессированных *in trans*, на работу репортерных векторов.**

В качестве интрон-специфичных shRNA были получены конструкции, которые таргетируют интрон начиная с позиций 79 и 330 (подбор последовательностей см. подробнее в разделе «Методы»). В качестве контрольной shRNA клетки 293T были трансдуцированы вектором pGIPZ, экспрессирующим shRNA против P1 белка респираторного синцитиального вируса, RSV.



**Рисунок 18. Влияние интрон-специфичных shRNA, экспрессированных *in trans*, на уровень экспрессии репортера после трансфекции векторами с inRFPT-2 и inLuc и вспомогательными плазмидами ВИЧ-1. Уровень экспрессии указан относительно контроля, где клетки были трансдуцированы shRNA-P1. Знаком «\*» обозначены статистически различающиеся с контролем результаты ( $p < 0.05$ ).**

Как показано на рис. 18, экспрессия shRNA, специфичной к области интрона в позиции 330 (miR-sh330), приводит к увеличению экспрессии репортерных белков по сравнению с контролем: RFP (в 6 раз) и люциферазы (в 4 раза). Экспрессия shRNA, специфичной к области интрона в позиции 79 (miR-sh79), давала статистически значимый эффект при детекции люциферазы (в 4 раза выше по сравнению с контролем), чего нельзя отметить в случае RFP (различие с контролем статистически не значимое). Эти результаты показывают, что интрон-специфичные shRNA, экспрессированные *in trans*, могут значительно увеличивать экспрессию репортерных белков в клетках НЕК 293Т, трансфицированных интрон-содержащими репортерными векторами. Это свидетельствует о том, что интрон-специфичные shRNA способствуют деградации несплайсированной РНК в эффекторных клетках.

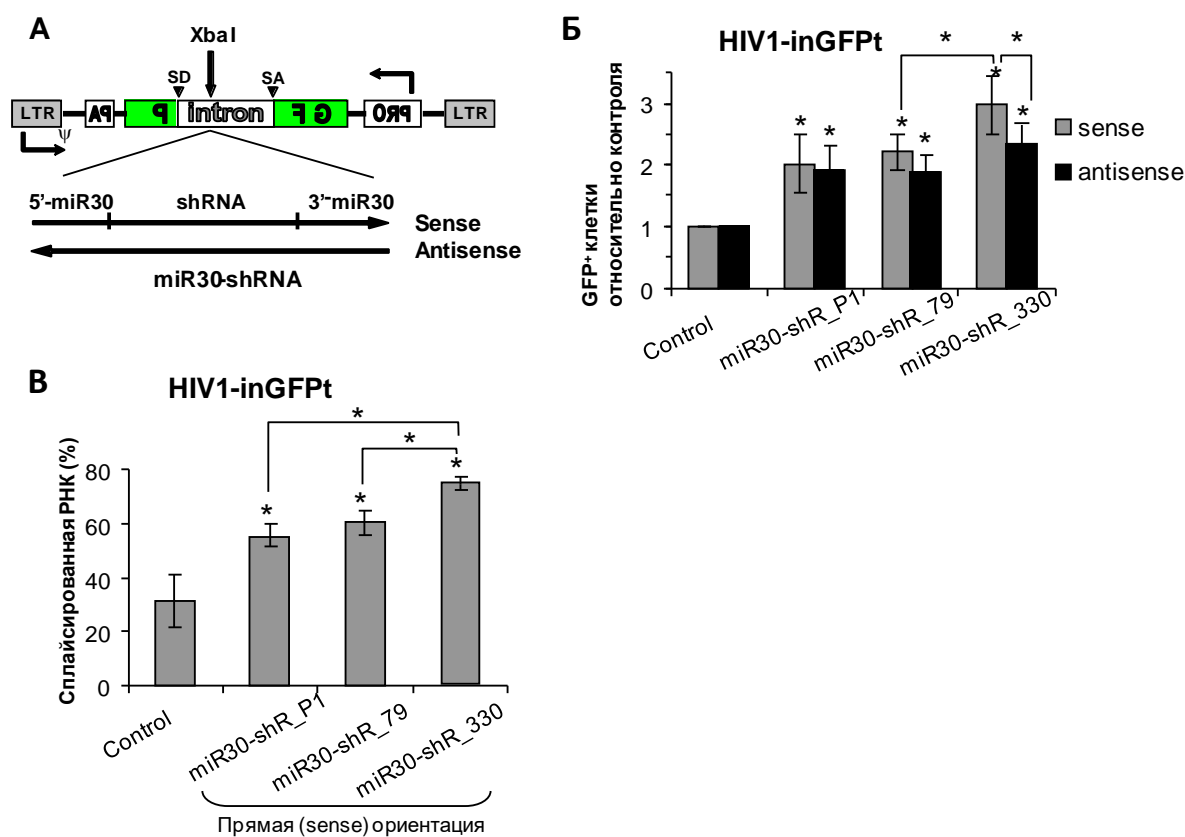
### 3.1.3.2 Интрон-специфичные miR30-shRNA, экспрессированные in cis, увеличивают уровень сплайсинга и экспрессии репортера ВИЧ-1 inGFpT.

Тестирование miR30-shRNA конструкций, экспрессированных *in trans*, требует проведения эксперимента в две стадии, поскольку клетки должны быть сначала трансдуцированы вектором pGIPZ, содержащим miR30-shRNA, отобраны при помощи антибиотика и/или по экспрессии GFP, и только после этого возможна постановка инфекционных тестов. Было решено внедрить последовательность miR30-shRNA в репортерный вектор для оценки эффективности интрон-специфичных конструкций при экспрессии *in cis*. Мы клонировали miR30-shRNA (интрон-специфичные, а также контрольную – к белку P1 вируса RSV) в репортерный вектор ВИЧ-1 inGFpT, используя рестрикционный сайт Xba I в области интрона (рисунок 19А). Было получено две группы векторов: первая содержала miR30-shRNA в прямой (sense) ориентации, вторая – в противоположной (antisense). Мы тестировали и ту, и другую группу, поскольку интрон-содержащий район может быть экспрессирован как с вирусного промотора LTR (sense), так и с CMV промотора (PRO) (antisense). Эксперимент проводился на НЕК 293Т клетках методом одноэтапной трансфекции/инфекции. В качестве контроля использовали немодифицированный вектор ВИЧ-1 inGFpT, с которым и сравнивали эффекты shRNA модификаций. Результаты анализировали методом проточной цитофлуориметрии через двое суток после трансфекции.

Как показано на рисунке 19Б, модификация интрона последовательностями miR-shR\_P1, miR-shR\_79 и miR-shR\_330, клонированными в прямой ориентации, дает увеличение экспрессии GFP в 2, 2,2 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Кроме того, наличие miR-shR\_330 в интроне в прямой ориентации приводит к значимо более высокой трансдукции репортерного вектора, чем miR-shR\_330 в обратной ориентации или miR-shR\_79 в прямой ориентации. Это означает, что ориентация вставки miR-shRNA в интрон, а также последовательность, к которой специфична shRNA в интроне, оказывает влияние на степень деградации несплайсированной репортерной РНК.

Интересно, что модификация интрона последовательностью miR-shR\_P1, не специфичной к интрону, также приводила к увеличению экспрессии GFP по сравнению с немодифицированным вектором. Это может быть связано с тем, что наличие miR30 контекста само по себе снижает количество несплайсированной РНК репортера за счет процессинга ядерным ферментом Drosha и деградации интрон-содержащей РНК.



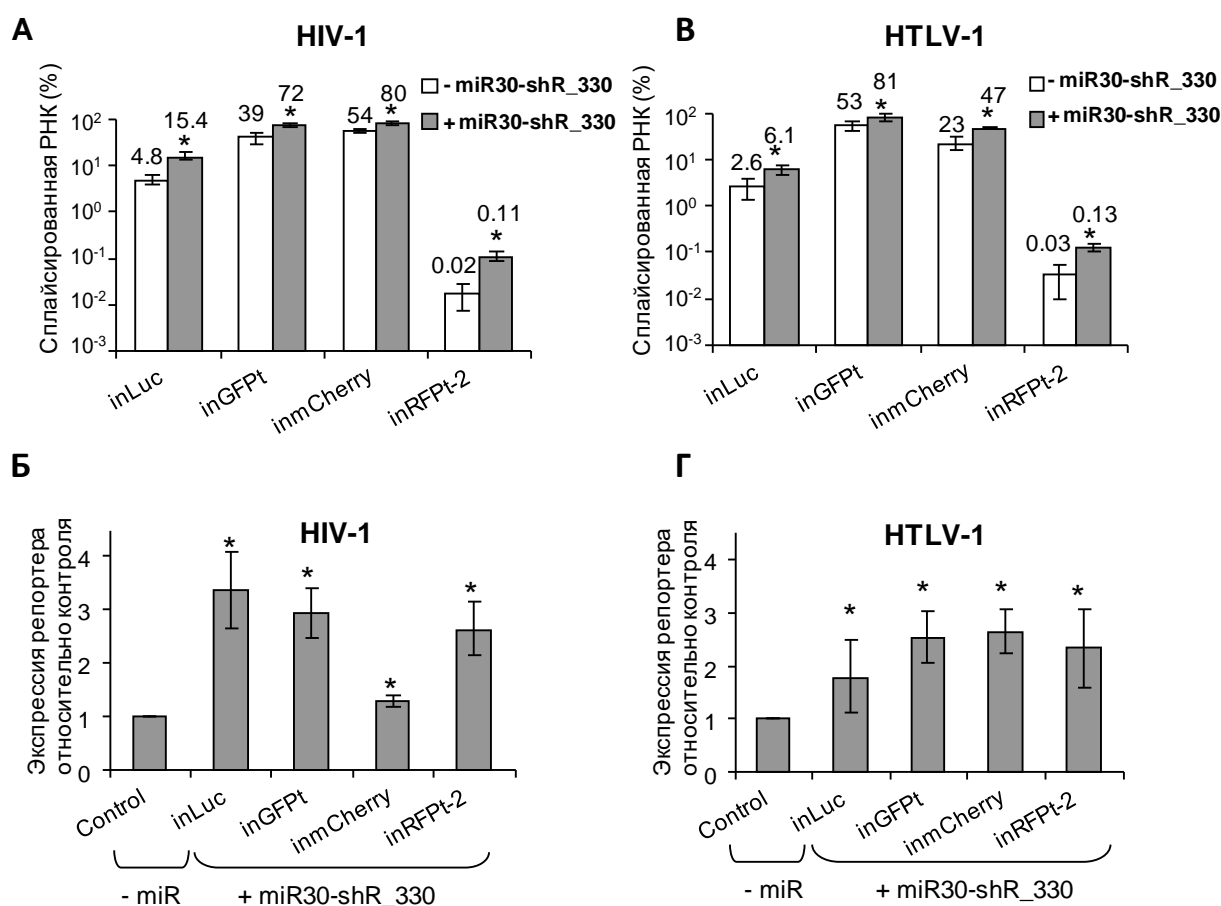
**Рисунок 19. Влияние вставки последовательности miR30-shRNA в интрон на уровень сплайсированной РНК в вирусных частицах и экспрессию репортера в клетках-мишенях. А.** Схема вектора HIV-1 inGFPt со вставкой miR30-shRNA. **Б.** Количество GFP<sup>+</sup> клеток после трансдукции модифицированных векторов, нормированное на контроль (трансдукция немодифицированным вектором). **В.** Влияние модификации miR30-shRNA на уровень сплайсированной РНК репортера в вирусных частицах. Результаты представлены по трем независимым экспериментам, знаком «\*» обозначены значимо отличающиеся от контроля значения (p<0.05), если нет дополнительных соединительных линий.



Мы предположили, что эффект модификации достигается за счет того, что miR30-shRNA способствует деградации интрон-содержащей векторной РНК, обогащая таким образом количество сплайсированной РНК в вирусных частицах и увеличивая трансдукцию вектора с интактным геном репортера *gfp* в клетках-мишенях. Для того чтобы подтвердить это, мы провели измерение уровней сплайсированной и несплайсированной РНК в псевдовирусных частицах методом количественной ПЦР. Как показано на рисунке 19В, уровень сплайсированной РНК репортерного вектора HIV-1 inGFpT с конструкциями miR-shR\_P1, miR-shR\_79 и miR-shR\_330 в прямой ориентации составлял 56%, 60% и 75%, соответственно. Все три значения статистически значимо превышали уровень сплайсированной РНК, соответствующий немодифицированному вектору (31%). Кроме того, вектор, модифицированный последовательностью miR-shR\_330, давал большее количество сплайсированной РНК в вирусных частицах, чем векторы с модификациями miR-shR\_P1 и miR-shR\_79. Данные результаты соотносятся с количеством GFP<sup>+</sup> клеток, измеренном в инфекционном тесте на клетках НЕК 293Т, трансфицированных соответствующими векторами (рисунок 19Б). Таким образом, miR-shR\_330, специфичная к интрону в положении 330 и экспрессированная *in cis*, наиболее эффективно снижает количество несплайсированной репортерной РНК в вирусных частицах, обогащая тем самым количество GFP<sup>+</sup> клеток-мишеней при трансдукции вектором HIV-1 inGFpT.

### ***3.1.4 Модификация интрона последовательностью miR-shR\_330 улучшает сплайсинг и экспрессию репортерных векторов.***

Мы решили проверить, будет ли модификация интрона последовательностью miR-shR\_330 так же эффективно работать в других репортерных векторах, как в случае с HIV-1 inGFpT. Для этого указанная последовательность была переклонирована в векторы inLuc, inmCherry и inRFpT-2 по сайту рестрикции XbaI. Были сконструированы модификации как для ВИЧ-1, так и для HTLV-1. Полученные конструкции вместе с интрон-модифицированной конструкцией inGFpT были протестированы в инфекционном тесте на клетках НЕК 293Т для определения уровня экспрессии репортерного белка, а также в тесте по измерению уровня сплайсинга репортерной РНК в вирусных частицах, как описано выше. Все измерения проводились также и с контрольными векторами, не содержащими модификацию интрона последовательностью miR-shRNA.



**Рисунок 20. Влияние модификации интрона последовательностью miR30-shRNA330 на уровень сплайсированной РНК, инкорпорированной в вирусные частицы, и на экспрессию различных репортеров в клетках-мишенях.** Уровень сплайсинга репортерных РНК в HIV-1 (А) и HTLV-1 (В) вирусных частицах. Б, Г – уровни экспрессии генов репортеров после трансдукции репортерных (для HIV-1 и HTLV-1, соответственно) векторов, содержащих модификацию miR30-shRNA330, относительно соответствующего контрольного вектора (без модификации), взятого за единицу. Показаны результаты для трех независимых экспериментов, знак «\*» отражает статистически достоверное различие с контролем ( $p < 0.05$ ).

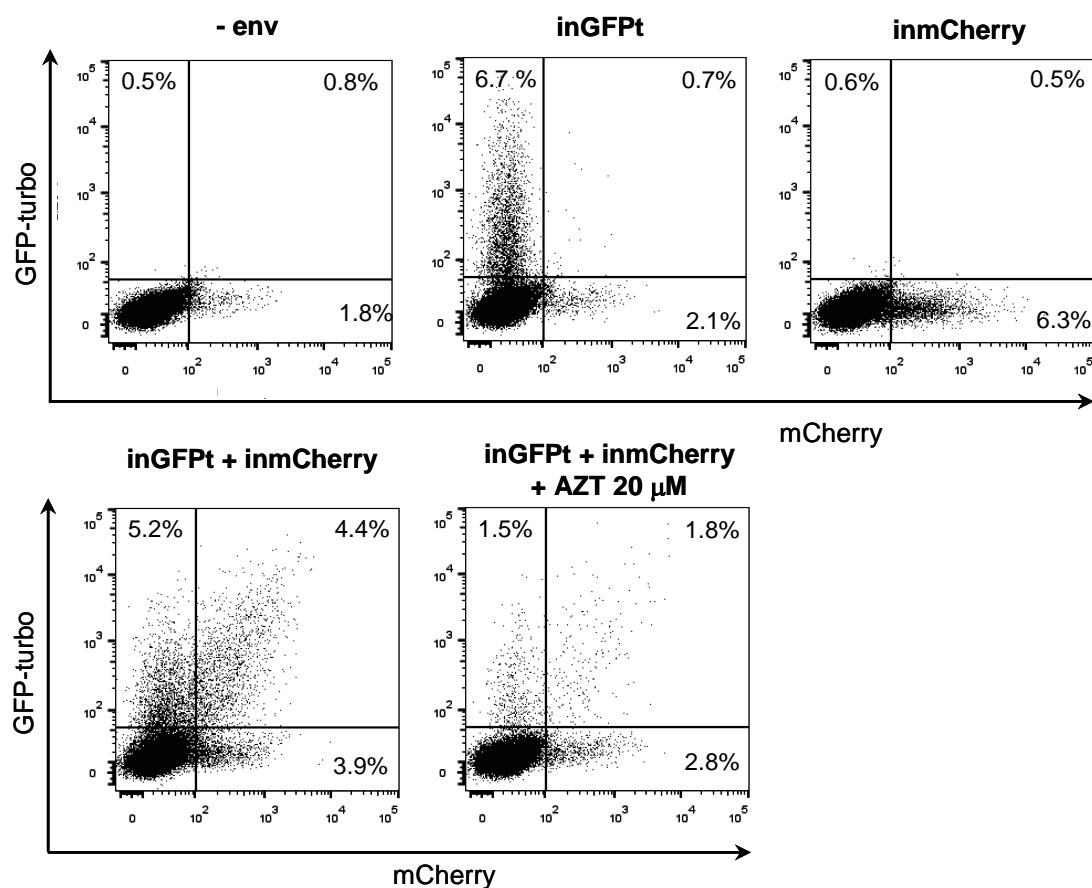
Как показано на рисунках 20Б и 20Г, наличие miR30-shRNA330 последовательности повышает количество детектируемых клеток, экспрессирующих репортерный белок. Все HIV-1 и HTLV-1 векторы с данной модификацией продемонстрировали статистически значимо более высокий уровень экспрессии репортера в клетках-мишенях по сравнению с соответствующими контролями без модификации. Однако различие с контролем варьировало среди различных репортерных векторов. В целом, улучшение детекции событий трансдукции репортерного вектора (за счет увеличения числа клеток, экспрессирующих репортерный белок) коррелировало с увеличением количества сплайсированной РНК в псевдовирусных частицах. Так, при трансфекции клеток вектором HIV-1-inmCherry уровень сплайсированной РНК в псевдовирусных частицах составлял 54% (рисунок 20А). Модификация этого вектора

последовательностью miR30-shRNA330 даёт увеличение в 1,5 раза уровня сплайсированной РНК в вирионах (80%), что отражается в повышении в 1,3 раза количества клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mCherry после трансдукции (рисунок 20Б). Если клетки трансфицировали модифицированным вектором HIV-1-inLuc, наблюдалось повышение уровня сплайсированной РНК в вирусных частицах в 3,2 раза по сравнению с контролем (15,4% против 5%, рисунок 20А), а также увеличение в 3,4 раза количества клеток, экспрессирующих люциферазу (рисунок 20Б). Аналогичные результаты были получены при сравнении модифицированных HTLV-1 репортерных векторов с контрольными (рисунок 20В и 20Г).

В итоге, путем модификации интрона последовательностью miR30-shRNA330 были получены векторы, которые давали высокий уровень сплайсированной РНК в вирионах (от 47% до 81% для наиболее удачных вариантов с GFP и mCherry) и повышение количества клеток-мишеней, экспрессирующих репортерные белки.

### ***3.1.5 Анализ количества клеток, инфицированных двумя или несколькими частицами ВИЧ-1, с использованием новых векторов***

Полученные нами векторы на основе GFPt и mCherry позволяют использовать их для оценки количества инфицированных клеток методом проточной цитометрии. Совместное использование данных векторов может дать оценку, какова доля клеток, инфицированных одним или двумя и более вирусами, в условиях межклеточной трансмиссии вируса. Известно, что вероятность инфицирования одной клетки несколькими вирусами возрастает при межклеточном пути переноса вируса. Чтобы проверить эффективность работы новых векторов на лимфоидных клетках человека, мы трансфицировали CD4<sup>+</sup> Т клетки (СЕМ) усовершенствованными векторами HIV-1 inGFPt и HIV-1 inmCherry отдельно или совместно, а также вспомогательными вирусными плазмидами. Далее, клетки СЕМ смешивали с клетками-мишенями линии Raji/CD4 и культивировали в течение трех суток, после чего анализировали пробы методом проточной цитофлуориметрии. Параллельно было поставлено два контрольных эксперимента. В первом контроле клетки СЕМ не трансфицировали плазмидой, экспрессирующей белок оболочки вируса, что должно было стать препятствием при формировании инфекционных псевдовиральных частиц. Во втором контроле к клеткам добавляли ингибитор репликации вируса (AZT). Результаты всех экспериментов, включая контрольные, отображены на рисунке 21.



**Рисунок 21. Количественный анализ клеток, инфицированных HIV-1 с использованием векторов HIV-1 inGFpT и inmCherry.** Трансфицированные клетки СЕМ (продуценты HIV-1) сокультивировали с линией Raji, экспрессирующей на поверхности рецептор CD4. Результаты трех независимых экспериментов указаны в процентах, отражая относительное количество одиночных (GFP<sup>+</sup> или mCherry<sup>+</sup> клетки) или двойных (GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> клетки) событий инфекции.

Когда клетки СЕМ ко-трансфицировали плазмидами inGFpT и/или inmCherry, а также вспомогательными плазмидами, экспрессирующими *gag-pol* и *env*, значительный процент клеток в смешанной культуре экспрессировали флуоресцентные белки: 5,2% GFP<sup>+</sup> клеток, 3,9% mCherry<sup>+</sup> клеток и 4,4% GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> клеток (нижняя левая панель). Однако если клетки СЕМ были трансфицированы тем же набором плазмид, за исключением плазмиды, экспрессирующей белок оболочки вируса, наблюдалась лишь фоновая флуоресценция в смешанной культуре клеток: 0,5% GFP<sup>+</sup> клеток, 1,8% mCherry<sup>+</sup> клеток и 0,8% GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> клеток (верхняя левая панель).

В отсутствии белка оболочки вируса репортерные векторы, зависимые от репликации, не способны «активировать» гены, кодирующие флуоресцентные белки, подтверждая тем самым, что репликация вируса необходима для того, чтобы детектировать инфекционные события.

При подавлении репликации вируса с помощью AZT (нижняя правая панель) наблюдается значительное снижение количества клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки, по сравнению с экспериментом без добавления ингибитора репликации: 1,5% GFP<sup>+</sup> клеток, 2,8% mCherry<sup>+</sup> клеток и 1,8% GFP<sup>+</sup>mCherry<sup>+</sup> клеток.

Таким образом, модифицированные репортерные векторы дают возможность оценки количества клеток-мишеней, инфицированных одним или двумя вирусами, методом проточной цитометрии на лимфоидных клетках человека.

### **3.2. Репликация дефектного по вспомогательным белкам ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии и при инфекции свободными вирусными частицами**

Основной функцией вспомогательных (или, по-другому, аксессуарных) белков ВИЧ-1 принято считать противодействие клеточным механизмам противовирусной защиты – факторам рестрикции. Одним из способов оценить вклад факторов рестрикции в процесс инфекции является сравнение репликации дефектного по вспомогательным белкам вируса и вируса без мутаций. Мутировав каждый из вспомогательных генов ВИЧ-1, мы можем вычленить факторы рестрикции клетки, которые становятся активными и подавляют репликацию дефектного вируса.

#### ***3.2.1 Получение упаковочных плазмид с мутациями во вспомогательных генах***

Упаковочная плазида представляет собой вектор, кодирующий белки ВИЧ-1, необходимые для формирования вириона и для доставки и интеграции репортера в клетку-мишень. Из соображений безопасности такой вектор не содержит сигнал инкорпорации в вирусную частицу ( $\Psi$ -сигнал) и не может сам быть упакован в вирион в качестве вирусной РНК.

##### ***3.2.1.1 Введение мутаций во вспомогательные гены ВИЧ-1.***

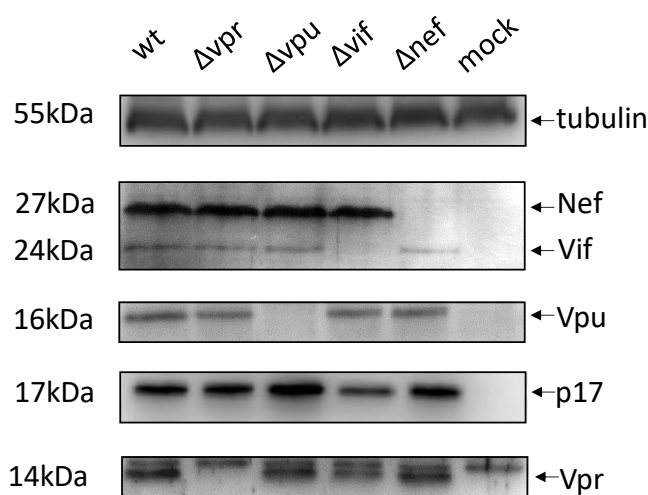
Упаковочная плазида pCMV  $\Delta$ 8.2R кодирует геном ВИЧ-1 штамма NL4-3 за исключением полноразмерного белка оболочки Env. Мы вводили мутации во вспомогательные гены *vif*, *vpr*, *vri* и *nef* с образованием стоп-кодона. Для каждого гена применялась следующая стратегия (подробнее см. Методы 2.2.8.3):

- для получения мутации в гене *nef* конструкцию обрабатывали рестриктазой XhoI с сайтом узнавания в области *nef*, образовавшиеся липкие концы

«затупляли» при помощи фрагмента Клёнова и лигировали, что приводило к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона;

- для получения мутаций в генах *vpr*, *vpu* и *vif* фрагмент плазмиды, кодирующий соответствующие гены, переклонировали в вектор меньшего размера и проводили мутагенез методом QuickChange PCR Mutagenesis. Наличие мутации в ПЦР-продукте верифицировалось секвенированием по Сэнгеру, после этого фрагмент плазмиды с мутацией переклонировали обратно в упаковочный вектор pCMV Δ8.2R.

Чтобы подтвердить эффективность мутагенеза, а именно, отсутствие экспрессии одного из вспомогательных белков ВИЧ-1 в конструкциях, клетки НЕК 293Т были трансфицированы полученными плаزمидами. Экспрессия вспомогательных белков была оценена методом Вестерн-блота с сыворотками, специфичными к каждому из белков (рис. 22).



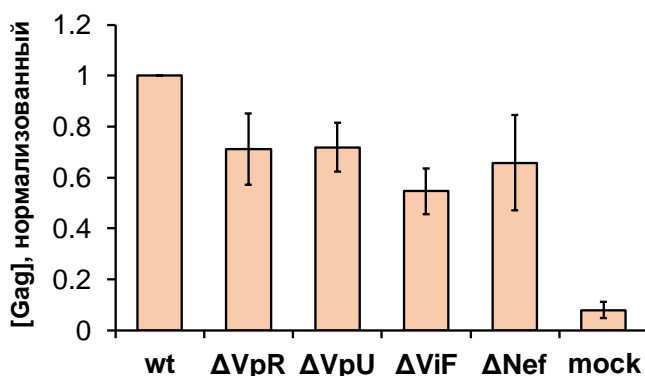
**Рисунок 22.** Данные Вестерн-блота по экспрессии вспомогательных белков в НЕК 293Т клетках, трансфицированных вектором с мутацией в одном из генов *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*.

Как видно из рисунка 22, мутация каждого из генов *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef* приводила к потере экспрессии соответствующего белка и не влияла на экспрессию других вспомогательных белков ВИЧ-1, что подтверждает выбор корректной стратегии мутагенеза.

### 3.2.1.2 Оценка уровня продукции дефектных вирусных частиц

Мы оценили продукцию вируса клетками НЕК 293Т, трансфицированными упаковочным вектором без мутаций и с мутациями по каждому вспомогательному белку, а

также контрольной (mock) плазмидой pCDNA-hygro. Супернатанты от трансфицированных клеток собирали, фильтровали через фильтры с порами 0.45µm и измеряли продукцию частиц по количеству структурного белка Gag методом иммуноферментного анализа (ИФА). Из рисунка 23 можно сделать вывод о том, что вирус с мутациями экспрессируется, хотя и на более низком уровне по сравнению с положительным контролем (дикий тип, wt).



**Рисунок 23. Данные ИФА по экспрессии вирусного белка Gag в супернатантах от трансфицированных НЕК 293Т клеток вирусным вектором pCMV Δ8.2R с мутациями и без.** В качестве отрицательного контроля были взяты клетки, трансфицированные «mock» (pCDNA-hygro) плазмидой. Данные представлены в виде средних значений ±SD по результатам трех независимых экспериментов.

В связи с тем, что наблюдалось небольшое снижение в продукции вирусных частиц с мутациями по сравнению с вирусными частицами дикого типа, в последующих экспериментах для корректной оценки инфекции репликацию дефектного вируса, измеренную в единицах RLU (relative light units, относительные световые единицы), всегда нормализовали на уровень продукции вирусных частиц.

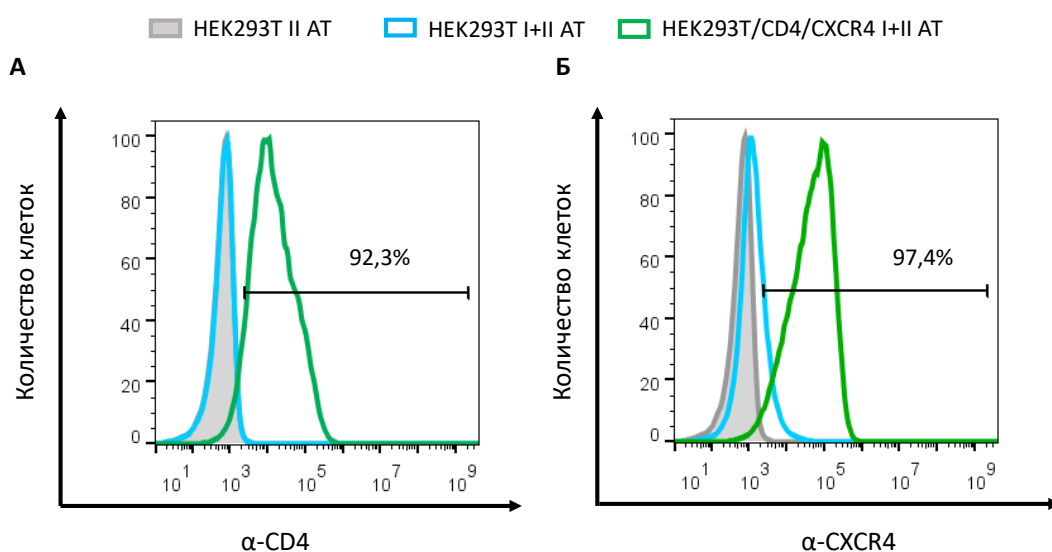
### **3.2.2. Оценка репликации дефектного ВИЧ-1 в нелимфоидных клетках линии НЕК 293Т/CD4/X4**

Мы поставили перед собой цель измерить репликацию вируса с мутациями по генам вспомогательных белков в разных условиях: при инфекции свободными вирусными частицами и при со-культивировании клеток-продуцентов и клеток-мишеней. Кроме того, интересно было сравнить инфекцию на разных типах клеток – на нелимфоидной линии НЕК 293Т и на лимфоидных линиях Jurkat и Raji/CD4.

Чтобы оценить влияние делеции одного из вспомогательных белков ВИЧ-1 на уровень межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, первоначально мы использовали нелимфоидную клеточную линию НЕК 293Т. В клетках этой линии не экспрессируются рецептор ВИЧ-1 – молекула CD4, и на низком уровне (18%)

экспрессируются ко-рецептор X4-тропного ВИЧ-1 – молекула CXCR4 (рис. 24). Отсутствие экспрессии рецепторов ВИЧ-1 на НЕК 293Т не позволяло проводить инфекционные тесты с белком оболочки Env вируса иммунодефицита человека, что сделало бы дальнейшее сравнение уровня инфекции на данных клетках с инфекцией на лимфоидных клетках некорректным. В связи с этим, были получены клетки НЕК 293Т/CD4/X4 со стабильной экспрессией рецепторов CD4 и CXCR4.

Для получения трансдуцированной клеточной линии НЕК 293Т/CD4/X4 гены *CD4* и *CXCR4* были амплифицированы методом ПЦР, секвенированы и клонированы в лентивирусный вектор pUHR\_IR\_riго (ген *CD4*) и pUHR\_IR\_zeo (ген *CXCR4*). Далее, получали лентивирус и заражали клетки НЕК 293Т, проводили селекцию антибиотиками (пурамицин и зеонин), после чего проверяли экспрессию рецепторов CD4 и CXCR4 и при необходимости клетки сортировали на клеточном сортере для получения чистой популяции. В результате, удалось получить клетки с экспрессией CD4 на уровне 92,3% и экспрессией CXCR4 на уровне 97,4%. На рисунке 24 представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток НЕК 293Т/CD4/X4 и клеток НЕК 293Т дикого типа антителами против CD4 и CXCR4 рецепторов.

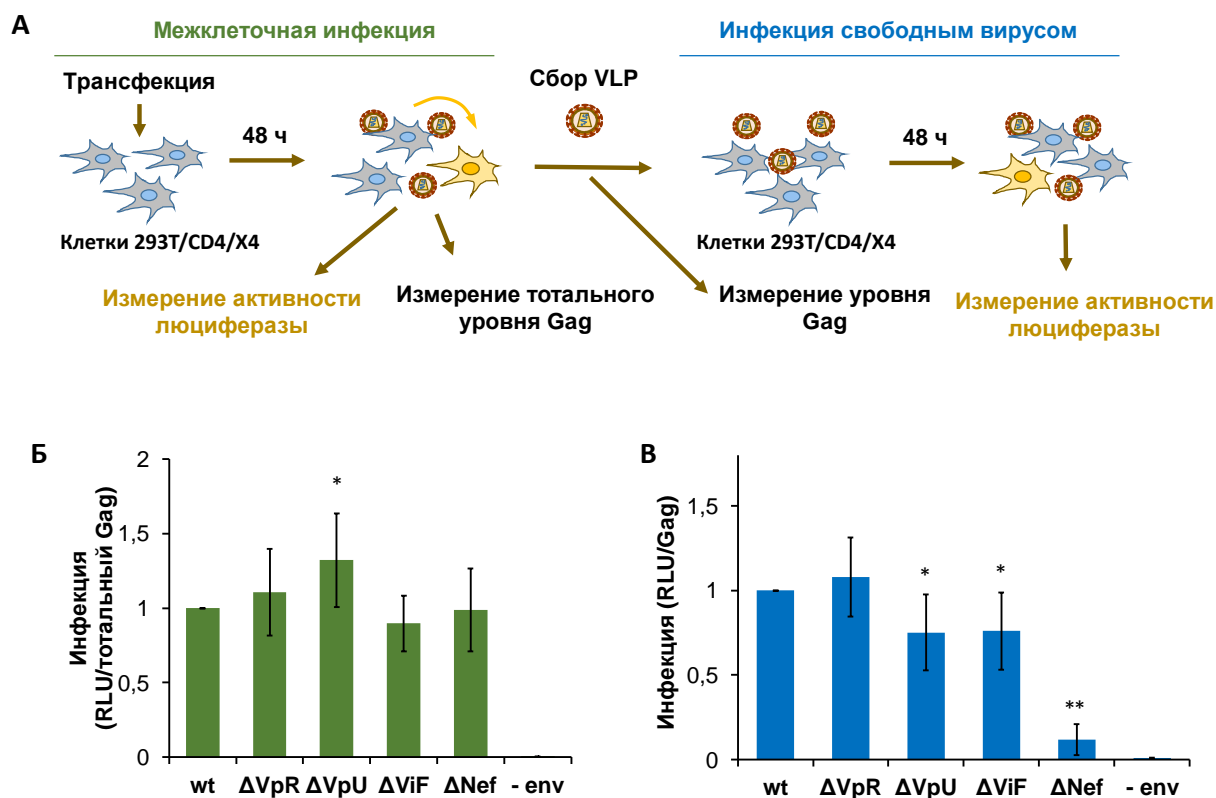


**Рисунок 24. Проточная цитофлуориметрия окрашенных клеток НЕК 293Т (серый и синий цвета) и клеток НЕК 293Т/CD4/X4 (зеленый цвет), представленная в виде одномерных гистограмм: А – окрашивание на CD4, Б – окрашивание на CXCR4. I – первичные, II – вторичные антитела (АТ).**

Для измерения инфекции на полученной клеточной линии НЕК 293Т/CD4/X4 использовали интрон-регулируемые репортерные векторы последней модификации на основе люциферазы (pUHR inLuc-miR-shR\_330). Клетки трансфицировали упаковочной плазмидой ВИЧ-1 без мутаций (обозначена как “wt”) или с мутацией по одному из генов



вспомогательных белков; плазмидой, экспрессирующей белок оболочки Env штамма NL4-3, и репортерным вектором на основе люциферазы. Такие клетки производили вирусоподобные частицы (VLPs), способные к одному циклу репликации в клетках-мишенях, что детектировалось по уровню активности люциферазы (RLU). Для измерения межклеточной инфекции НЕК 293Т/CD4/Х4 клетки трансфицировали указанными выше плазмидами и оставляли на 48 часов (тест одноэтапной трансфекции/инфекции) (рис 25А). Уровень инфекции нормализовался на количество вирусных частиц в образцах (тотальный уровень белка Gag, измеренный методом ИФА). Для постановки инфекции свободным вирусом вирусоподобные частицы собирали спустя 48 часов после трансфекции клеток и добавляли к клеткам-мишеням. Последние через 48 ч. лизировали для измерения активности люциферазы (рис 25А).



**Рисунок 25. Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в аксессуарных генах ВИЧ-1 на клетках НЕК 293Т/CD4/Х4: А – схема эксперимента по постановке межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, Б – межклеточная инфекция, В – инфекция свободным вирусом. \* и \*\*, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.05$  и  $p < 0.01$ , соответственно.**

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что вспомогательный белок VpR не влияет на инфекцию ВИЧ-1, тогда как отсутствие белка ViF приводит к незначительному снижению инфекции вне зависимости от способа передачи вируса. Интересно, что Vpu-дефектный вирус при межклеточной передаче инфицировал клетки в 1.3 раза более эффективно, чем в контроле, при этом в инфекции свободными вирусными частицами, напротив, наблюдалось снижение репликации Vpu-дефектного вируса. Известно, что вирусному белку Vpu в клетке противодействует фактор рестрикции BST2. В отсутствие Vpu BST2 способен удерживать вирусные частицы у поверхности клетки. В литературе имеется несколько противоречащих друг другу исследований о влиянии BST2 на межклеточную инфекцию: на данный момент, точно не известно, способствует ли такое удерживание вирионов у поверхности зараженной клетки передаче вируса при контакте с клеткой-мишенью. Мы предположили, что наблюдаемое нами увеличение уровня межклеточной инфекции Vpu-дефектного вируса связано именно с действием BST2 (см. ниже). Экспрессия BST2 на клетках HEK293T была нами подтверждена с помощью проточной иммунофлуориметрии клеток до и после стимуляции клеток интерфероном  $\alpha$  (рис. 27).

Интересно, что репликация Nef-дефектного вируса оказалась также зависима от способа передачи инфекции: при межклеточной передаче делеция Nef не влияла на инфекцию, тогда как при заражении свободными частицами репликация Nef-дефектного вируса снижалась в 9-10 раз по отношению к репликации вируса без мутаций. Известно, что Nef снижает количество CD4 на поверхности зараженных клеток, а также препятствует попаданию факторов рестрикции Serinc3 и Serinc5 в вирусные частицы. По-видимому, межклеточная инфекция позволяет вирусу преодолеть клеточную защиту до некоторой степени, и мы не видим снижения репликации в этом случае по сравнению с Nef-дефектным вирусом в инфекции свободным вирусом.

За исключением Nef-дефектного вируса, мутация в генах вспомогательных белков ВИЧ-1 не приводила к сильному снижению уровня репликации вируса. Это можно объяснить тем, что многие из известных факторов рестрикции ВИЧ-1 экспрессируются в клеточной линии HEK 293T на более низком уровне, чем в лимфоидных клеточных линиях. В таблице 3 представлены данные базы TranscriptoNET (Kinexus Bioinformatics Corporation) по относительной экспрессии известных факторов рестрикции в клеточной линии HEK 293T и лимфоидных клеточных линиях Jurkat, CEM и Raji.

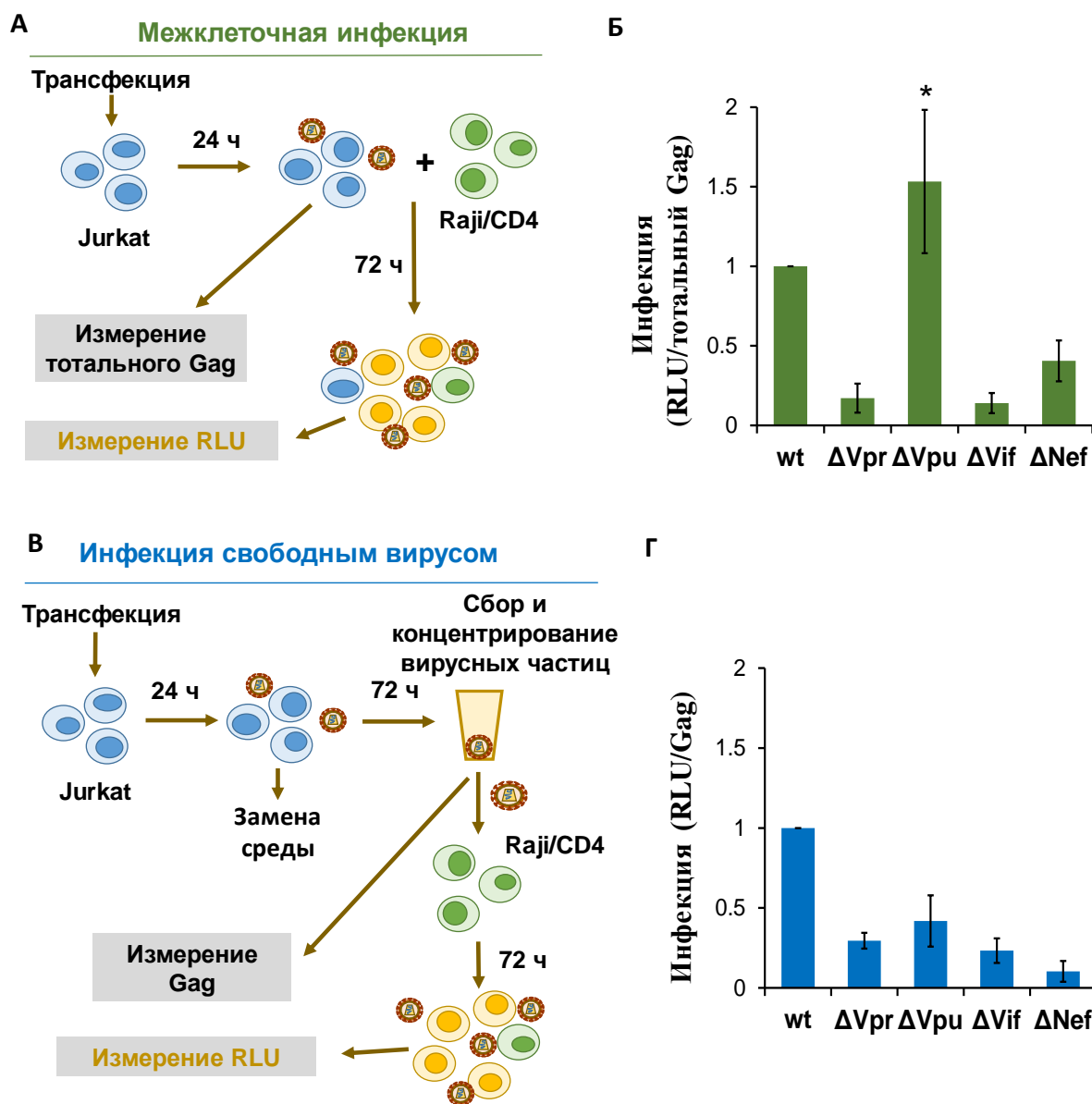
**Таблица 3. Данные по экспрессии известных факторов рестрикции в различных клеточных линиях.**

	<b>HEK 293T</b>	<b>Jurkat</b>	<b>CEM</b>	<b>Raji</b>
BST2	2	89	85	745
Aрobec3G	3	10	41	321
Aрobec3F	18	23	19	23
Serinc5	40	782	154	313
Serinc3	267	246	195	2131
IFITM1	53	71	1082	24
IFITM2	63	109	1491	99
IFITM3	10	44	496	95
TRIM22	3	4	13	514
SAMHD	84	2	11340	16

### **3.2.3 Оценка репликации дефектного ВИЧ-1 в лимфоидных клеточных линиях человека.**

Для оценки уровня межклеточной инфекции в лимфоидных клетках мы использовали ранее разработанную модель межклеточной инфекции от трансфицированных Т клеток Jurkat к клеткам-мишеням Raji/CD4, несущим трансгенный рецептор CD4. Трансфицированные клетки Jurkat либо культивировали вместе с клетками Raji/CD4 (межклеточная инфекция, рис 26А), либо культивировали отдельно в течение 48-72 часов, затем собирали супернатант, вирусные частицы концентрировали центрифугированием и далее добавляли к клеткам Raji/CD4 (инфекция свободным вирусом, рис 26В). При заражении клеток Vpr- и Vif- дефектными псевдовирусами уровень инфекции не зависел от способа передачи и был снижен по сравнению с контролем в 3-5 раз. При инфекции свободным вирусом Nef-дефектный ВИЧ-1 заражал клетки-мишени до десяти раз менее эффективно, чем вирус дикого типа (рис.26Г), тогда как в условиях сокультивирования клеток снижение уровня инфекции не было столь сильным (в 2 раза) (рис.26Б). Интересно, что репликация Vpu-дефектного вируса при совместном культивировании клеток была в 1,5 раз выше, чем репликация вируса дикого типа, тогда как свободный Vpu-дефектный вирус заражал клетки в 2.5 раза менее эффективно, чем вирус без мутаций. Как и на клетках HEK 293T/CD4/X4, такое увеличение уровня межклеточной инфекции может объясняться тем, что клеточный фактор рестрикции BST2

в отсутствие Vpr связывает вирусные частицы на поверхности клеток-продуцентов, способствуя таким образом успешному протеканию межклеточной инфекции.



**Рисунок 26. Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в вспомогательных генах ВИЧ-1 на лимфоидных клетках: схема эксперимента по постановке межклеточной инфекции (А) и инфекции свободным вирусом (В), Б – межклеточная инфекция, Г – инфекция свободным вирусом. Каждое значение для vpr/vif/nef на рисунке Б и для vpr/vpu/vif/nef на рисунке Г значимо отличается от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.01$ . \*, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.05$ .**

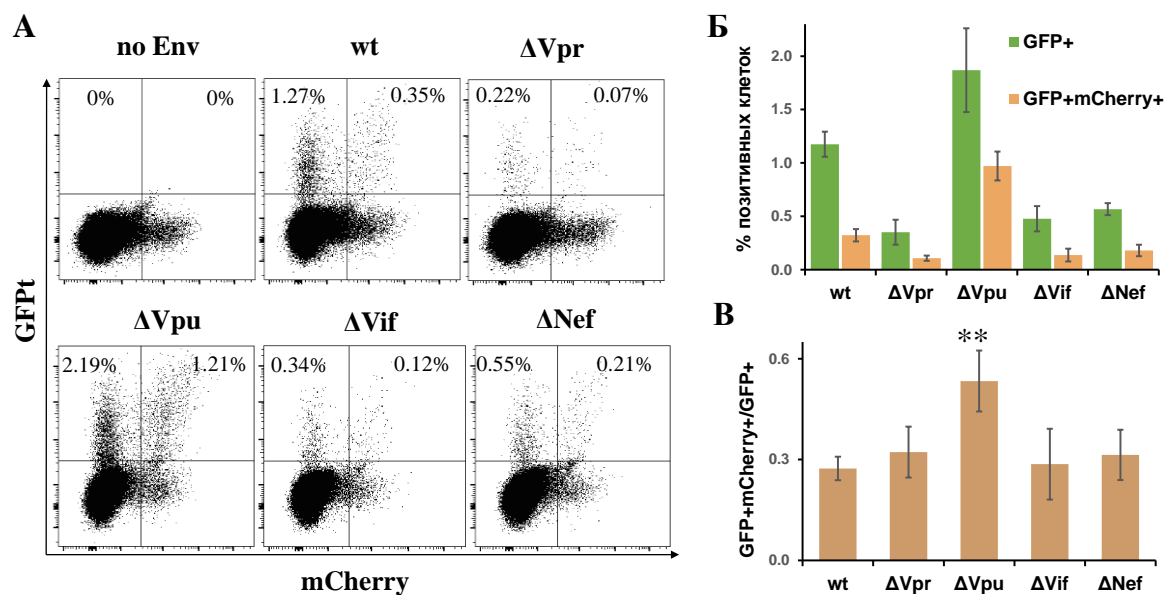
### 3.2.4 Делеция в гене *vpr* приводит к увеличению количества клеток, инфицированных несколькими вирусами

Ранее мы показали, что полученные нами векторы на основе флуоресцентных белков GFPt и mCherry позволяют оценить количество клеток, инфицированных одним или двумя и более вирусами, в условиях межклеточной трансмиссии вируса (см. Результаты 3.1.5, рис. 21). Мы решили выяснить, влияет ли делеция в гене *vpr/vpu/vif/nef* на уровень множественной инфекции в лимфоидных культурах клеток Jurkat=>Raji/CD4.

Постановку межклеточной инфекции от трансфицированных Т клеток Jurkat к клеткам-мишеням Raji/CD4 проводили точно так же, как и ранее (см. Результаты 3.2.3), но в качестве репортерной конструкции брали 3 мкг inGFPt и 3 мкг inmCherry (вместо 3 мкг inLuc). Спустя три дня после смешивания клеток-продуцентов и клеток-мишеней количество инфицированных мишеней анализировали на проточном цитометре по двум каналам – GFP и mCherry, соответственно. На рисунке 27А можно видеть характерные точечные графики (Dot Plot), отражающие результаты инфекционного теста ВИЧ-1 без мутаций и с мутациями в генах *vpr/vpu/vif/nef*. Кроме того, верхний левый график соответствует отрицательному контролю инфекционного теста без белка оболочки Env (по Env). Можно видеть, что в контроле без Env наблюдается выраженная автофлуоресценция клеток в канале mCherry, в связи с чем, в опытных образцах был подсчитан процент клеток GFP+ mCherry+ и GFP+, а также отношение GFP+mCherry+/GFP+, тогда как флуоресценция в канале mCherry отдельно не учитывалась.

Как видно из рисунка 27, результаты инфекционных тестов дефектного ВИЧ-1 с флуоресцентными белками коррелируют с данными, полученными в экспериментах с люциферазой в аналогичном тесте межклеточной инфекции (рис 26Б и 27Б): Vpr-дефектный ВИЧ-1 заражал клетки-мишени эффективнее, чем вирус без мутаций, тогда как мутация в гене *vpr/vif/nef* приводила к снижению межклеточной инфекции дефектного ВИЧ-1.

Для оценки множественности инфекции (MOI, multiplicity of infection) подсчитывали отношение двойных позитивных клеток (GFP+ mCherry+) к одиночным позитивным (GFP+). Из рисунка 27В можно видеть, что данное отношение не менялось для Vpr-/Vif-/Nef-дефектного ВИЧ-1 в сравнении с контролем, тогда как делеция Vpu реализовывалась в увеличение количества двойных позитивных клеток, т.е. клеток, инфицированных как минимум двумя вирусами одновременно.



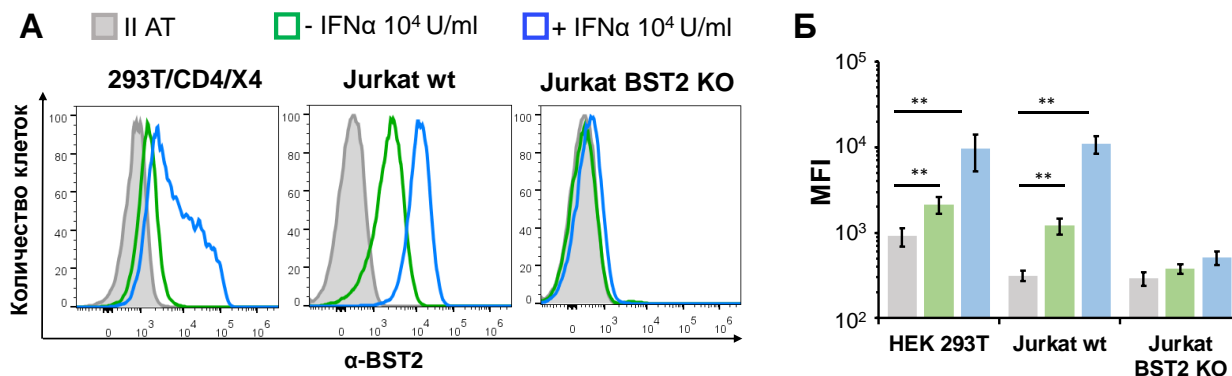
**Рисунок 27. Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в вспомогательных генах ВИЧ-1 при помощи репортерных векторов на основе флуоресцентных белков GFPt и mCherry. А.** Типичные графики вида DotPlot, отображающие клетки с флуоресценцией в каналах GFPt и mCherry спустя три дня культивирования. **Б.** Количественный анализ одиночных позитивных клеток (GFP+) и двойных позитивных клеток (GFP+ mCherry+). **В** Отношение GFP+mCherry+/GFP+ клеток как показатель множественности инфекции. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  SD трех независимых экспериментов. Каждое значение для vpr/vpu/vif/nef на рисунке Б значимо отличается от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.01$ . \*\*, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.01$ .

### 3.2.5 Нокаут по гену *BST2* нивелирует увеличение межклеточной инфекции Vpr-дефектного ВИЧ-1 в клетках

Принимая во внимание тот факт, что вспомогательный белок Vpr вируса противодействует клеточному фактору рестрикции BST2, мы решили сравнить инфекцию Vpr-дефектным вирусом на лимфоидных клетках дикого типа и нокаутных по BST2.

Была получена клеточная линия Jurkat с нокаутом по гену, кодирующему BST2, с помощью CRISPR/Cas9 технологии редактирования генома. Чтобы снизить количество нежелательных off-target эффектов, мы использовали Cas9 с никазной активностью (Cas9n) для данной задачи (F.A. Rap и др. 2013). Клетки электропорировали плазмидами, экспрессирующими Cas9n и пару гидовых РНК, специфичных к гену *BST2*. Спустя неделю экспрессия BST2 на поверхности клеток была стимулирована с помощью интерферона  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), и через сутки после стимуляции клетки окрашивали антителами для анализа в

проточной иммунофлуоресценции. Негативная популяция была сортирована, после чего клетки заново окрашивали для оценки чистоты полученной нокаутной популяции (см. рис. 28А). После двух раундов сортировки нам удалось получить популяцию с 98% нокаутных клеток.

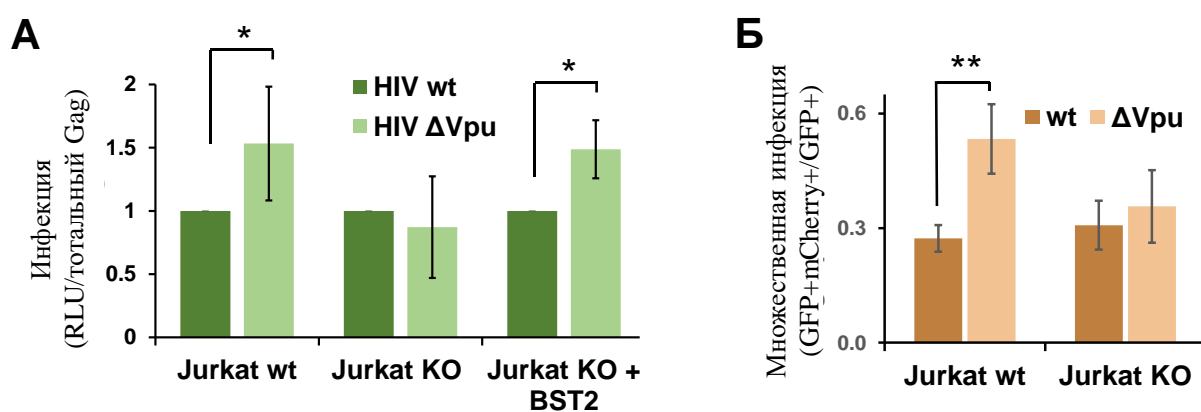


**Рисунок 28. Экспрессия BST2 на клеточных линиях 293T/CD4/X4, Jurkat wt и Jurkat BST2 KO.** А. Проточная цитометрия с иммунофлуоресцентным окрашиванием на BST2. Б. Данные средней интенсивности иммунофлуоресценции клеток. На рисунках серым цветом обозначен контроль, окрашенный только вторичными (II) антителами, зелёным цветом – клетки без предварительной стимуляции IFNα, окрашенные первичными и вторичными антителами (I+II), синим цветом – клетки, стимулированные IFNα, окрашенные первичными и вторичными антителами (I+II). Данные по измерению средней интенсивности иммунофлуоресценции представлены в виде средних значений ±SD.

Далее, мы оценили уровень репликации вирусных частиц дикого типа и с мутацией в гене *vri*. Клетки Jurkat дикого типа и Jurkat BST2 KO были трансфицированы всеми конструкциями, необходимыми для продукции вирусных частиц. Кроме того, чтобы показать, что экспрессия именно BST2 в клетках определяет увеличение уровня инфекции Vri-дефектным вирусом, мы проводили дополнительные инфекционные тесты на клетках Jurkat BST2 KO с одновременным восстановлением экспрессии BST2. Методом ПЦР и молекулярного клонирования в вектор pCMVpA была получена конструкция для экспрессии BST2 под CMV промотором. В экспериментах, не предполагающих восстановления экспрессии BST2, использовалась mock плазида (pCDNA hugro) в качестве контроля.

На следующий день трансфицированные клетки смешивали с клетками-мишенями Raji/CD4, часть клеток Jurkat совместно с супернатантом лизировали для последующего измерения тотального уровня Gag. Данные по инфекции, детектируемой в относительных оптических единицах (RLU), нормализовали на тотальный Gag, измеренный с помощью иммуноферментного анализа. Как показано на рисунке 29А, инфекционная способность Vri-дефектного вируса в нокаутных клетках снижалась до уровня репликации вируса

дикого типа (3 и 4 столбики), однако при восстановлении экспрессии BST2 в нокаутных клетках наблюдалось то же явление, что и в клетках дикого типа: Vpu-дефектный вирус реплицировался в 1.5 раза более эффективно по сравнению с вирусом дикого типа (первая и третья пара столбиков). Важно отметить, что уровень репликации вируса дикого типа был сопоставим на клетках дикого типа и нокаутных, что говорит также и том, что клетки с нокаутом ведут себя так же, как и родительские, в таком функциональном тесте, как ретровирусная инфекция. Кроме того, был исследован показатель множественной инфекции на клетках дикого типа и с нокаутом по BST2. Для этого проводили межклеточную инфекцию с двумя репортерными векторами – на основе флуоресцентных белков GFP и mCherry. Далее инфекцию оценивали на проточном цитометре по сигналу репортеров: двойные позитивные клетки оказывались заражены, как минимум, двумя вирусами. Оказалось, что Vpu-дефектный вирус не только более эффективно реплицируется при межклеточной трансмиссии, чем вирус без мутации, но и клеток, инфицированных несколькими вирусами одновременно, наблюдалось больше (рис. 29Б). Таким образом, можно сделать вывод о том, что в отсутствие Vpu клеточный фактор рестрикции BST2 удерживает частицы у поверхности клеток-продуцентов, способствуя тем самым более эффективному заражению клеток-мишеней, в том числе, несколькими вирусами одновременно.



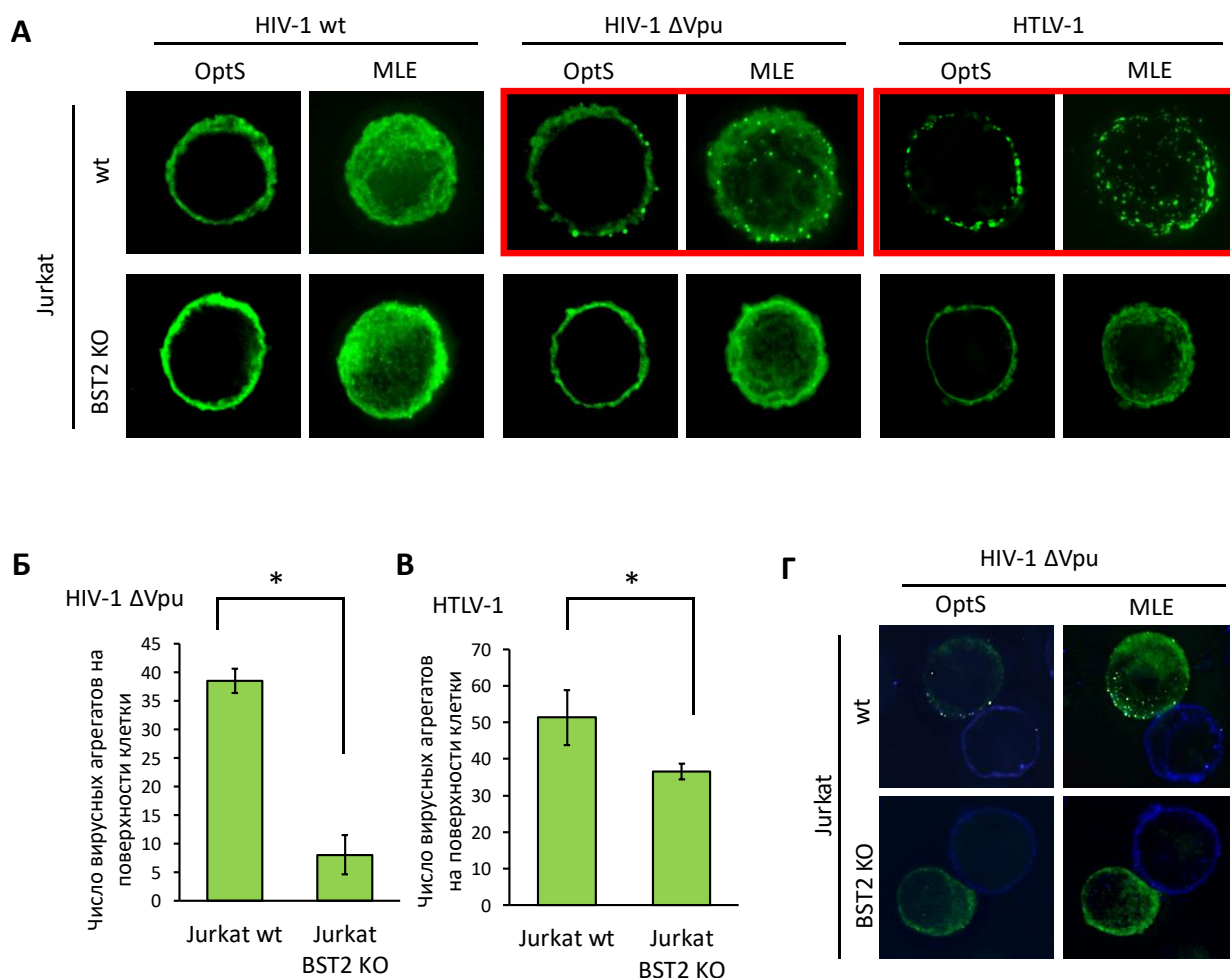
**Рисунок 29. Репликация вируса дикого типа и мутацией в гене Vpu в клетках дикого типа и нокаутных по BST2.** А. Данные RLU нормализованы на тотальный уровень Gag в трансфицированных клетках и на уровень репликации ВИЧ-1 без мутаций. Б. Множественная инфекция ВИЧ-1 wt и ΔVpu на клетках Jurkat дикого типа и с нокаутом по BST2. По оси Y отложено отношение двойных позитивных клеток (GFP+mCherry+) к одиночным позитивным (GFP+). Данные представлены в виде средних значений ±SD. \* и \*\*, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.05$  и  $p < 0.01$ , соответственно.



### **3.2.6 Роль BST2 в агрегации вирусных частиц ВИЧ-1**

BST2 имеет уникальное строение (трансмембранный домен на N-конце и GPI-якорь на C-конце), определяющее его способность удерживать вирусные частицы на поверхности клетки в момент отпочковывания. Подобная кластеризация может способствовать более эффективной передаче вирусных частиц при контакте клеток с помощью структуры, называемой вирусологическим (инфекционным) синапсом. Для того, чтобы визуализировать вирусные частицы на поверхности клеток, мы трансфицировали родительские и нокаутные по BST2 Jurkat клетки упаковочным вектором, кодирующим геном ВИЧ-1 дикого типа или с мутацией в гене *Vpu*. Кроме того, клетки Jurkat дикого типа и Jurkat BST2 KO трансфицировали упаковочным вектором, кодирующим геном HTLV-1 (вирус Т-клеточного лейкоза). Этот вирус передается от клетки к клетке практически исключительно через межклеточный контакт, и его геном не кодирует белки, препятствующие BST2. На следующий день после трансфекции клетки переносили на покровные стекла, предварительно обработанные полилизинном, фиксировали, пермеабелизировали и красили на белок Gag вируса ВИЧ-1 или HTLV-1. Затем образцы анализировали на флуоресцентном деконволюционном микроскопе (рис 30).

Вирусные частицы образуют агрегаты на поверхности клеток дикого типа, трансфицированных векторами, экспрессирующими геном HTLV-1 и *Vpu*-дефектного ВИЧ-1 (обозначены красными рамками на рисунке 30А). На поверхности нокаутных клеток вирусные частицы были распределены равномерно, не образуя кластеры. Кластеры на поверхности окрашенных клеток после деконволюции были подсчитаны, результаты анализа представлены на рисунке 30Б: наблюдалось снижение количества кластеров на поверхности клеток, нокаутных по BST2, при продукции *Vpu*-дефектных вирусных частиц и, в меньшей степени, HTLV-1 псевдовирусов. Итак, можно сделать вывод о том, что BST2 оказывает сильное влияние на образование агрегатов вирусных частиц на поверхности Т клеток. Это может способствовать эффективной передаче вирусных частиц от клетки к клетке через межклеточный контакт, что мы наблюдали в тесте межклеточной инфекции (рис. 27В).



**Рисунок 30. Распределение вирусных частиц ВИЧ-1, Vpu-дефектного ВИЧ-1 и HTLV-1 на поверхности Т-клеток.** А. Иммунофлуоресцентная деконволюционная микроскопия клеток Jurkat и Jurkat BST2 KO, трансфицированных упаковочными плазмидами частиц ВИЧ-1, Vpu-дефектного ВИЧ-1 и HTLV-1. Красными рамками обозначены клетки, на поверхности которых вирусные частицы образуют агрегаты. Результаты представлены в виде оптического среза через срединный слой клетки (OptS) и как проекция всех снятых и прошедших доконволюционную обработку слоев на срединный (maximum likelihood estimation projection (MLE)). Б. Подсчет вирусных агрегатов Vpu-дефектного ВИЧ-1 на поверхности клеток Jurkat и Jurkat BST2 KO. В. Подсчет вирусных агрегатов HTLV-1 на поверхности клеток Jurkat и Jurkat BST2 KO. Г. Визуализация вирусологического синапса методом иммунофлуоресцентной микроскопии клеток Jurkat и Jurkat BST2 KO в контакте с клетками Raji/CD4 при инфицировании Vpu-дефектным ВИЧ-1. Клетки Raji/CD4 окрашены по поверхности на CD20 (синий цвет), окрашивание на вирусный белок Gag выявляет зараженные клетки Jurkat и Jurkat BST2 KO.

Кроме того, мы попробовали визуализировать вирусный синапс клеток Jurkat и Raji/CD4. Для этого мы трансфицировали Jurkat дикого типа и с нокаутом всеми необходимыми плазмидами для экспрессии Vpu-дефектного вируса. Далее, мы смешивали их с мишенями на 1-2 часа, после чего переносили на стекла и красили по поверхности клетки Raji/CD4 на CD20 (синий цвет) и клетки Jurkat на вирусный белок Gag (рис. 30Г).

Оказалось, что и в этом эксперименте Gag распределен диффузно на поверхности нокаутных клеток и в виде кластеров на клетках дикого типа. Кроме этого, кластеры формируются на клетке Jurkat в области формирования вирусного синапса с клеткой-мишенью.

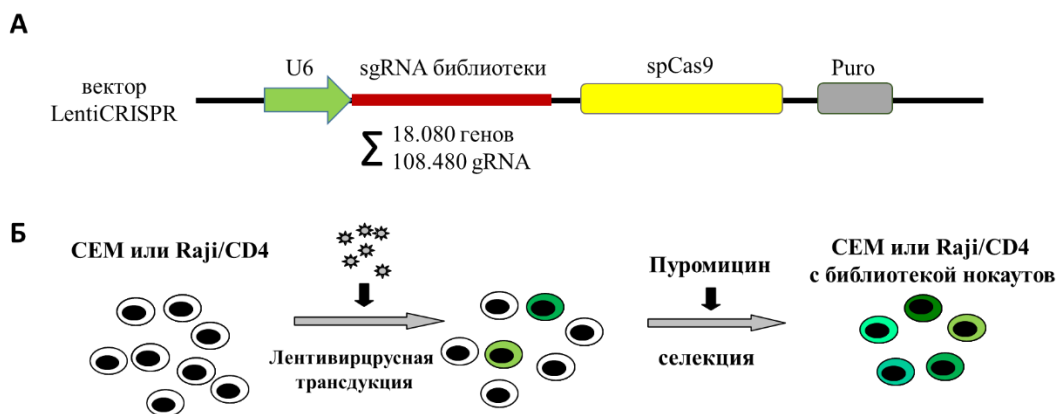
### **3.3 Поиск факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO**

Одними из наиболее современных и эффективных методов поиска новых клеточных генов, вовлеченных в тот или иной процесс, является полногеномные скрининги. В 2014 году О. Shalem с соавторами опубликовали разработанную на основе CRISPR-Cas9 библиотеку нокаутов GeCKO (О. Shalem и др., 2014). Библиотека содержит 108480 специфических последовательностей, нацеленных на 18080 генов человека, что охватывает практически весь экзом человека. Для изучения генов, вовлеченных в ВИЧ инфекцию, до последнего времени использовались только библиотеки интерферирующих РНК (shRNA и siRNA). Преимуществом библиотеки нокаутов перед библиотекой интерферирующих РНК является то, что с помощью ее скрининга можно выявить клеточные факторы, которые вовлечены в репликацию вируса при низком уровне экспрессии.

#### ***3.3.1 Создание клеточных линий CEM и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов GeCKO***

Библиотека нокаутов GeCKO v2, разделенная на библиотеку А и В (обозначены далее v2a и v2b), представляет собой лентивирусные векторы, кодирующие одновременно Cas9 и пул гидовых гидовых РНК (gRNA). Первоначально, векторы были размножены с использованием высококомпетентных бактериальных клеток в целях сохранения полноты библиотеки.

Для лентивирусной трансдукции вирус был сгенерирован на клетках HEK 293T, трансфицированных упаковочной плазмидой pCMV Δ8.2R, плазмидой для экспрессии белка оболочки G вируса везикулярного стоматита VSV (pCMV VSV-G) и лентивирусными векторами LentiCRISPR библиотеки GeCKO. Концентрированный вирус добавляли к клеткам CEM или Raji/CD4 в неразведенном виде или серией нескольких двукратных разведений. В результате селекции клеток пуромицином было выяснено, что максимальная доза вируса приводила к трансдукции менее 30% клеток (т.е. менее 0.5 MOI), поэтому дальнейшую работу проводили именно клетках, инфицированных максимальной дозой вируса (Рис.31).



**Рисунок 31. Получение клеток СЕМ и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов GeCKO.** А. Схематичное изображение лентивирусного вектора LentiCRISPR, трансдуцируемого в клетки. Б. Этапы получения клеток СЕМ и Raji/CD4 с библиотекой нокаутов.

### 3.3.2 Оценка качества и полноты переноса библиотеки нокаутов GeCKO в клеточные линии СЕМ и Raji/CD4.

Чтобы оценить пригодность полученной библиотеки для последующего скрининга и поиска факторов репликации ретровирусов, необходимо было убедиться в том, что представленность генов в библиотеке на клеточном уровне сравнима с исходным набором таргетируемых генов в пуле лентивирусных векторов v2a и v2b. Для решения данной задачи мы подготовили следующие образцы для глубокого секвенирования:

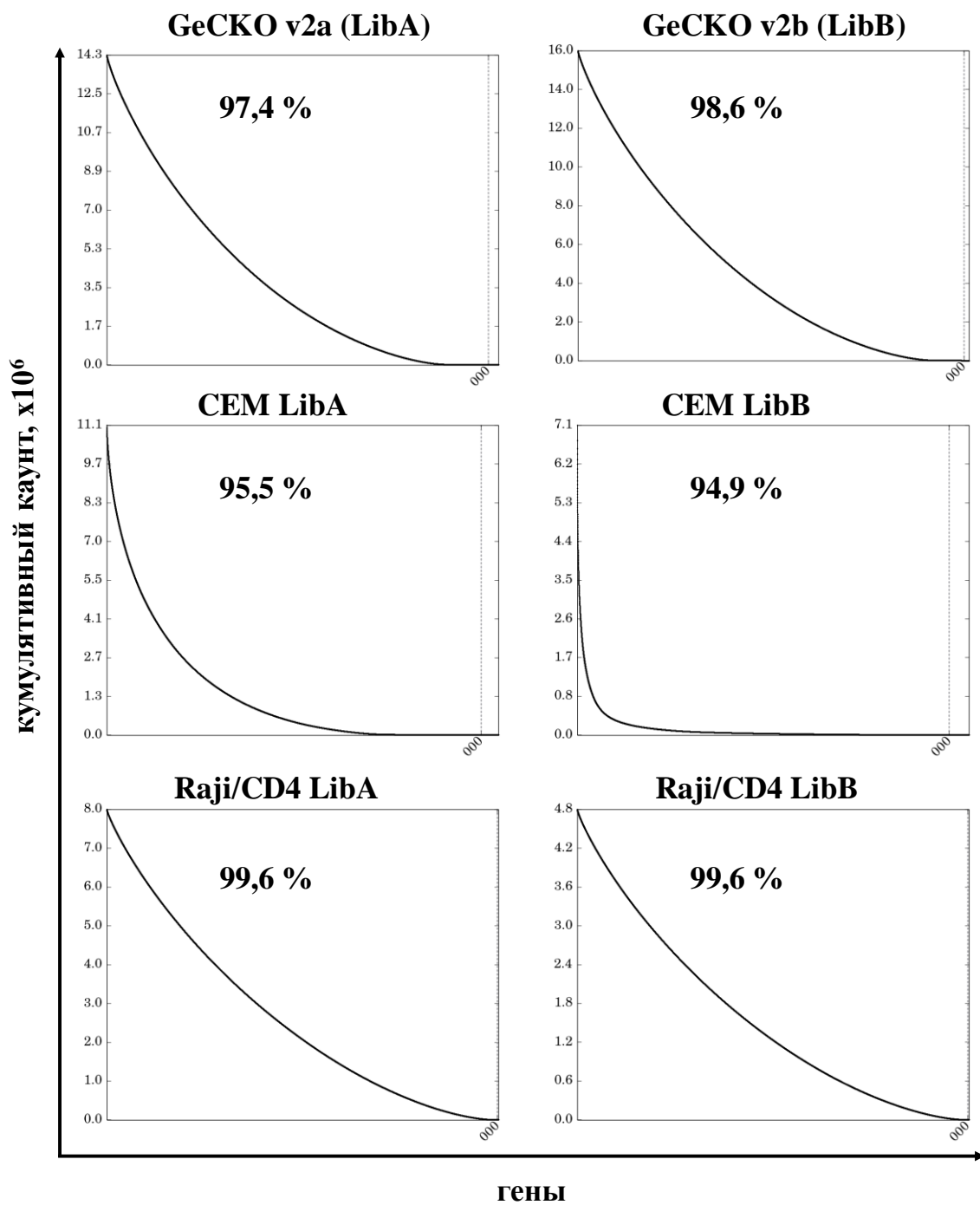
1. Библиотека GeCKO v2a (libA), исходный пул векторов
2. Библиотека GeCKO v2b (libB), исходный пул векторов
3. СЕМ libA
4. СЕМ libB
5. Raji/CD4 libA
6. Raji/CD4 libB

Методом ПЦР была амплифицирована gRNA-кодирующая часть лентивирусных векторов v2 libA и libB. У клеток с библиотекой выделяли геномную ДНК, после чего амплифицировали gRNA-кодирующую часть интегрированного лентивирусного вектора. Далее, мы бар-кодировали полученные образцы: проводили ПЦР с уникальными для

каждого образца праймерами. Получившиеся образцы смешивали и отдавали на HiSeq секвенирование, проводившееся на приборе Illumina.

В полученных данных FASTQ мы анализировали качество прочтений (ридов) и проводили предварительную обработку данных с помощью написанной программы на языке программирования Python (подробнее в Методах). Глубина секвенирования образцов получилась такая, что по крайней мере 80 прочтений приходилось на 1 гидовую РНК. В задачу написанной программы входил поиск константной области гидовой РНК, фланкирующей таргетную последовательность, и тримминг ридов.

Далее, было подсчитано суммарное количество прочтений для каждого гена с учетом прочтений всех гидовых РНК, нацеленных на данный ген. Затем, гены были ранжированы по частоте прочтений. Для оценки репрезентативности генов в каждом образце строили графики распределения таргетируемых генов по прочтениям (см. рис. 32). По оси абсцисс каждого графика расположены гены (18080 генов), по оси ординат – соответствующие генам суммарные (кумулятивные) прочтения (а именно:  $Y$ - $y_1$ ,  $Y$ - $y_1$ - $y_2$ , и т.д., где  $Y$  – это общая сумма всех прочтений по всем генам,  $y_1$  и  $y_2$  – это прочтения для генов 1 и 2 в ранжированном списке). Гены расположены по убыванию их прочтений, нулевая отметка обозначена вертикальной чертой «000». Если прочтения между всеми генами были бы распределены равномерно, мы бы видели линейную функцию с отрицательным наклоном. Чем больше разброс между генами по прочтениям, тем более выпуклой становится кривая распределения. Как можно видеть на рисунке 32, библиотеки на клетках Raji/CD4 получились с наибольшей представленностью генов (99,6% генов с ненулевыми чтениями для обеих библиотек) и равномерным покрытием, в отличие от библиотек на клетках СЕМ (95,5% и 94,9% для библиотеки А и В, соответственно).



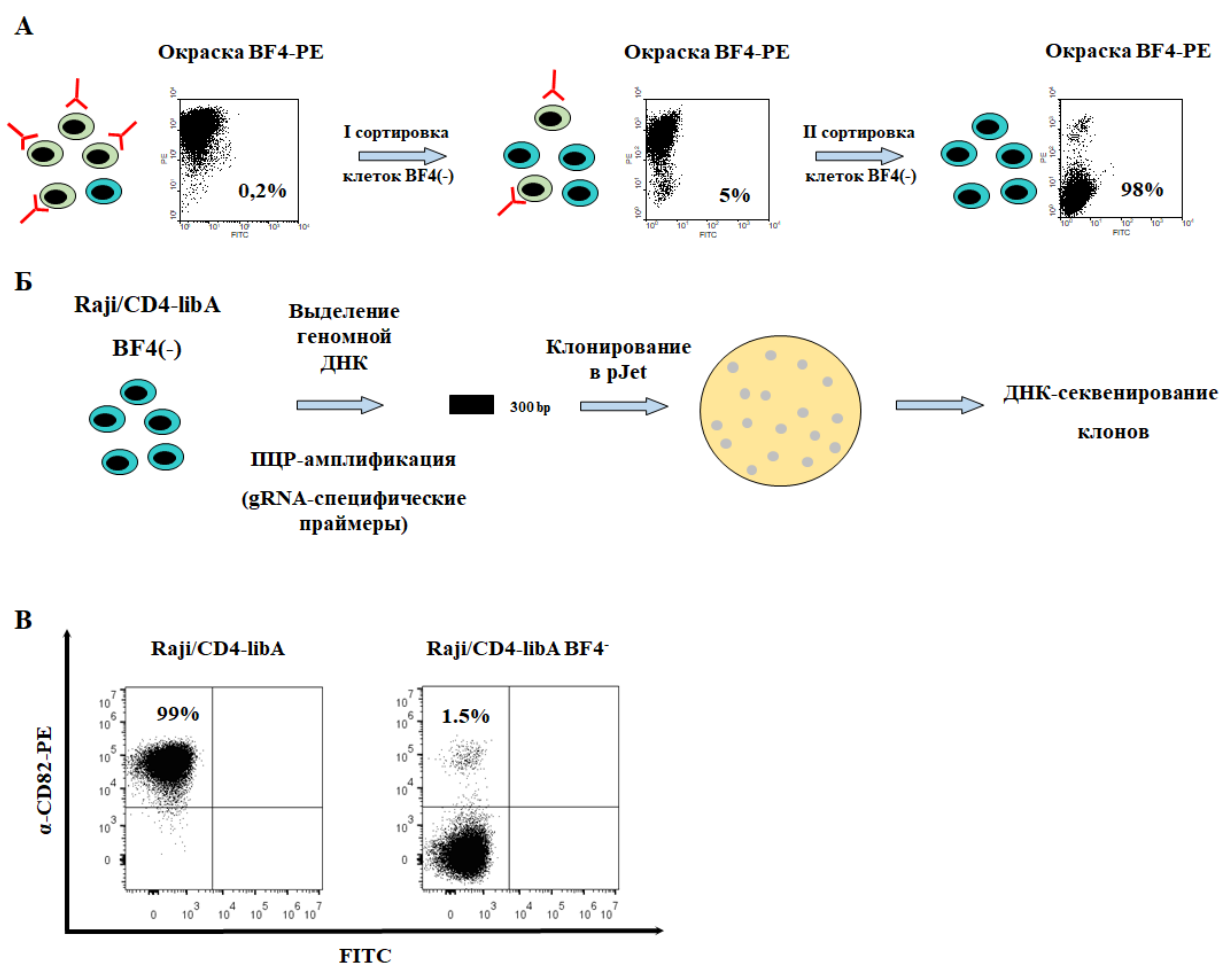
**Рисунок 32. Графики распределения прочтений по генам библиотеки GeCKO.** “000” обозначена нулевая отметка, справа от которой расположены гены с нулевыми прочтениями.

### ***3.3.2.1 Определение специфичности моноклонального антитела с помощью библиотеки нокаутов CRISPR-Cas9***

Репрезентативность нокаутов генов в клетках библиотеки была показана также и косвенно, в идентификации мишени антитела неизвестной специфичности, полученного ранее в нашей лаборатории при иммунизации мышей вирусными биопленками HTLV-1.

Охарактеризовать антитело не представляется сложной задачей, если оно было получено в результате иммунизации известным пептидом или белком. Более нетривиальным является случай, когда иммунизация проводилась целыми клетками или смесью антигенов, особенно, если полученное антитело не реагирует в Вестерн-блоттинге и иммунопреципитации.

Ранее в нашей лаборатории путем иммунизации сложной многокомпонентной смесью клеток, зараженных вирусом HTLV-1, было получено антитело неопределенной специфичности. Оно красило вирусные биопленки (поэтому было названо BF4 – biofilm), но не работало в вестерн-блоте и иммунопреципитации. Используя библиотеку нокаутов GeCKO на клеточной линии Raji/CD4 мы идентифицировали мишень неизвестного антитела.



**Рисунок 33. Идентификация антитела BF4 с неизвестной специфичностью с помощью библиотеки нокауты GeCKO. А.** Сортировка BF4(-) клеток библиотеки Raji/CD4 LibA. **Б.** Генетический анализ популяции клеток Raji/CD4 LibA, негативной по экспрессии BF4. **В.** Верификация антитела BF4 как специфичного к белку CD82 с помощью окрашивания клеток библиотеки до и после сортировки антителами к CD82.

Мы осуществили два раунда негативной селекции, отобрали клетки библиотеки, которые не окрашивались антителом BF4 (рисунок 33А). Далее, мы проводили генетический анализ: клетки лизировали, выделяли из них геномную ДНК и амплифицировали участок, кодирующий гидовую РНК в составе лентивирусной конструкции, интегрированной в геном клеток. Затем клонировали амплифицированный участок в плазмиду pJet и секвенировали несколько клонов (рисунок 33Б). Оказалось, что в 4 из 5 случаев это была последовательность, нацеленная на ген CD82 (таблица 4).



**Таблица 4.** Анализ секвенированных последовательностей gRNA, амплифицированных из клеток библиотеки и клонированных в вектор pJet.

<b>Последовательность gRNA</b>	<b>Соответствующий ген</b>
<b>GAGACTACAACAGCAGTCGCG</b>	<b>CD82</b>
<b>GAGACTACAACAGCAGTCGCG</b>	<b>CD82</b>
<b>GAGACTACAACAGCAGTCGCG</b>	<b>CD82</b>
<b>GAGACTACAACAGCAGTCGCG</b>	<b>CD82</b>
<b>CACGGGAGGAACAGGGTACT</b>	ZNF180

Для подтверждения специфичности антитела BF4 к белку CD82 мы окрашивали исходные клетки библиотеки Raji/CD4-LibA и сортированные клетки библиотеки антителом против CD82 (рисунок 33B). Сортированная популяция клеток, которая не окрашивалась антителом BF4, оказалась негативной по окраске антителом CD82. Это означает, что моноклональное антитело BF4 специфично к белку CD82, компоненту вирусных биопленок.

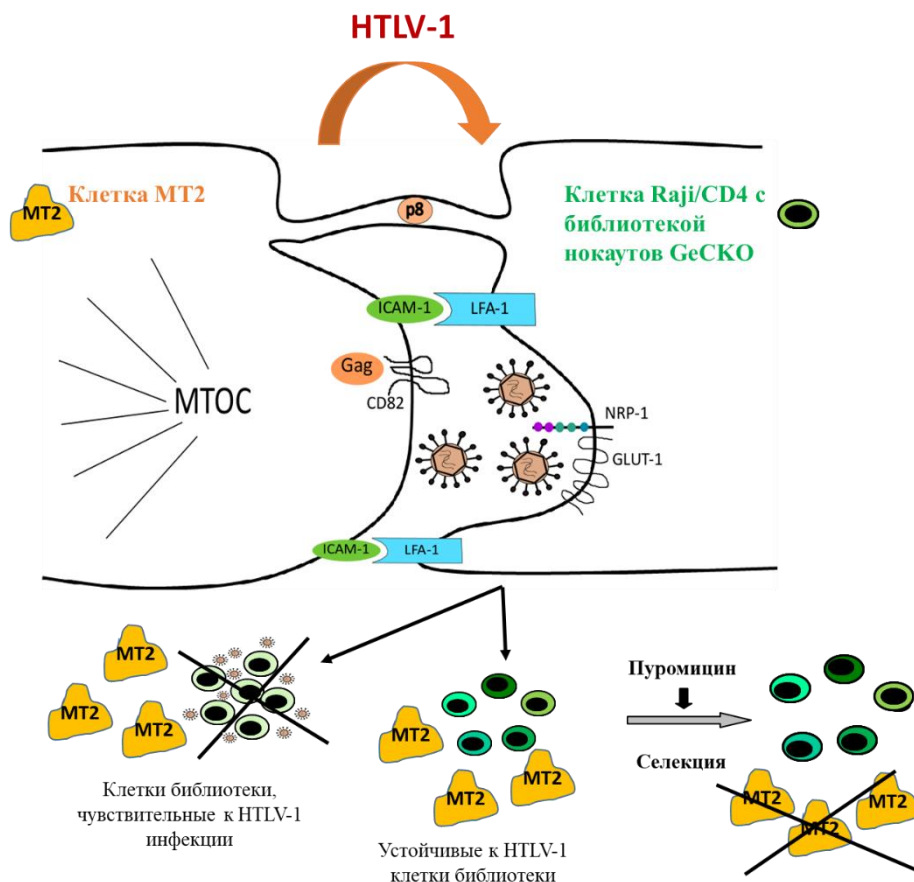
Итак, мы идентифицировали BF4 как анти-CD82 антитело. Описанный метод может быть пригоден для идентификации многих моноклональных антител, предоставляя хорошую альтернативу существующим методам оценки.

### ***3.3.3 Поиск факторов репликации вируса HTLV-1.***

Так же, как в случае ВИЧ-1, репликация HTLV-1 зависит от множества клеточных белков, в совокупности называемых факторами репликации. В отличие от факторов рестрикции, которые подавляют размножение вируса, факторы репликации, включая рецепторы вируса, обеспечивают перmissивность клетки для размножения вируса.

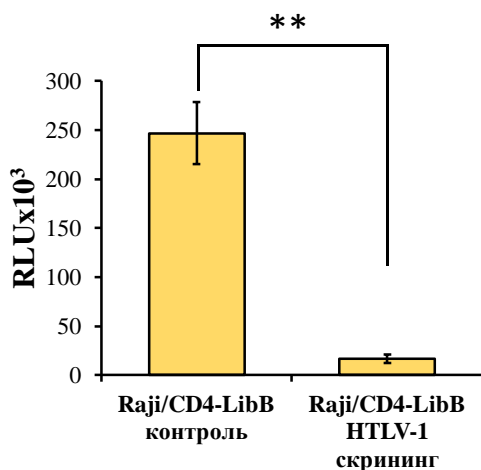
Так как HTLV-1 передается исключительно через межклеточный контакт, то скрининг-тест для поиска факторов репликации HTLV-1 проводили путем непосредственного сокультивирования HTLV-1-инфицированных клеток MT2 с клетками Raji/CD4 с библиотекой LibB в соотношении 5:1. Известно, что белок Tax вируса HTLV-1 имеет цитотоксическое действие по отношению к зараженным клеткам, большинство из которых погибают в первые дни-недели после заражения (А. Naoudi и др., 2003; Т. Kinjo и др., 2010). Продолжительность проводимого нами инфекционного теста составляла 2 недели, за этот срок подавляющее большинство зараженных клеток погибает (см. рис. 34).

Для того, чтобы элиминировать MT2 клетки, после инфекционного теста культуры растили в присутствии пуромицина, к которому клетки библиотеки устойчивы (см. рис. 31). В результате, оставались клетки Raji/CD4-LibB, предположительно устойчивые к инфекции HTLV-1. Было проведено два последовательных раунда инфекции.



**Рисунок 34. Схема инфекционного теста на хронически зараженных клетках MT2 (продуценты HTLV-1) и клетках библиотеки нокауты GeCKO. Часть клеток библиотеки погибает из-за токсичного действия вирусного белка Tax, устойчивые к HTLV-1 клетки выживают.**

Клетки библиотеки нокауты после инфекционного теста были оценены с точки зрения чувствительности к заражению HTLV-1 по сравнению с родительскими клетками библиотеки. Для этого использовали интрон-регулируемый вектор на основе люциферазы и упаковочную плазмиду, экспрессирующую геном HTLV-1 (рис. 35).



**Рисунок 35. Оценка чувствительности клеток Raji/CD4-LibB к инфекции HTLV-1.** Клетки с библиотекой нокаутов, прошедшие отбор в инфекционном тесте HTLV-1 (HTLV-1 скрининг), а также родительские клетки библиотеки нокаутов взяты в качестве мишеней в одноэтапном тесте HTLV-1 инфекции с репортерной конструкцией на основе люциферазы. Уровень свечения репортера указан в единицах RLU, на графике представлены результаты трех независимых экспериментов  $\pm$ SD. \*\*, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости  $p < 0.01$ .

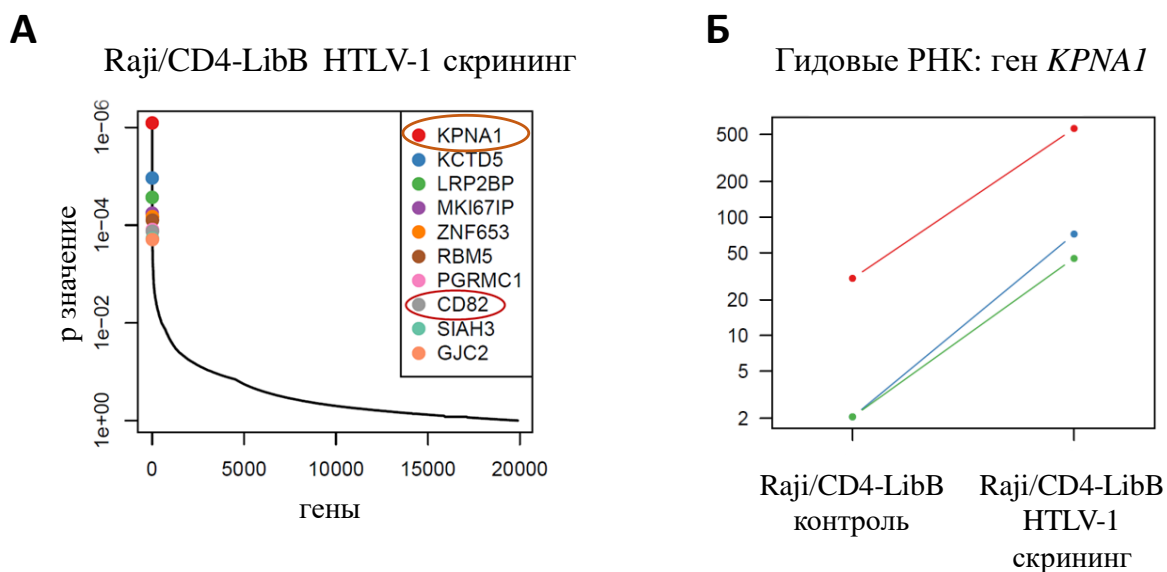
Из рисунка 34 можно видеть, что популяция клеток Raji/CD4-LibB, прошедших два раунда инфекции HTLV-1, оказалась на порядок менее чувствительна к заражению вирусом, чем исходные клетки Raji/CD4-LibB. Из этого можно сделать вывод о том, что в процессе совместного культивирования HTLV-1-продуцирующих клеток MT2 и клеток Raji/CD4-LibB произошло обогащение клеток с нокаутами, обеспечивающими устойчивость к инфекции HTLV-1.

Чтобы выяснить, популяции с какими именно нокаутами обогатились в результате инфекционного теста, необходимо сравнить распределение нокаутных популяций в исходной культуре клеток с библиотекой (контроль) и после инфекции (опыт). Из клеток была выделена геномная ДНК, служившая матрицей для ПЦР-амплификации гидовой РНК в составе интегрированной в геном конструкции LentiCrispr. Именно последовательность гидовой РНК и определяет специфический нокаут в клетке. Пул амплифицированных гидовых РНК был секвенирован на приборе Illumina.

Анализ секвенированных гидовых РНК, полученных методом NGS, проводили, как описано выше. Было подсчитано суммарное число прочтений по каждому гену (учитывая все прочтения соответствующих гену гидовых РНК) в контрольном и опытном образцах. Далее, сравнивали количество прочтений для каждого гена в контроле и опыте с помощью

программного обеспечения MAGeCK. В итоге, был составлен ранжированный список генов, нокаутные популяции по которым обогатились в результате инфекционного теста.

На рисунке 36А представлены «гены-хиты» с наибольшим отличием от контроля на графике с распределением генов в зависимости от р-значения в анализе с помощью алгоритма RRA (Robust rank aggregation). В первую десятку генов, по которым произошло наибольшее обогащение, вошли: *KPNA1*, *KCTD5*, *LRP2BP*, *MKI67IP*, *ZNF653*, *RBM5*, *PGRMC1*, *CD82*, *SIAH3*, *GJC2* (см. рис. 36).

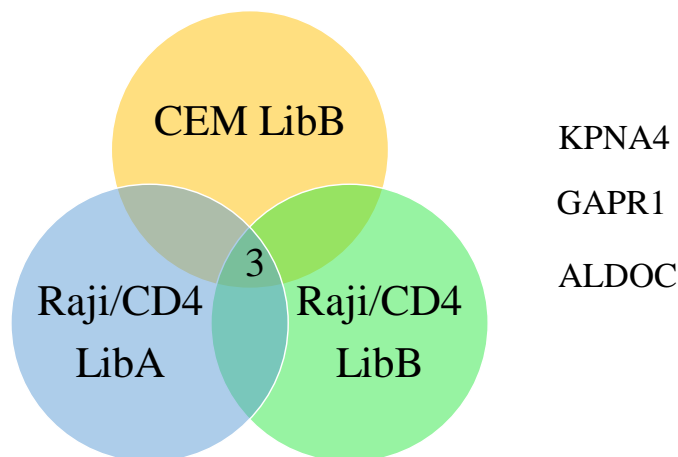


**Рисунок 36. Результаты скрининга факторов репликации HTLV-1 на клетках Raji/CD4.** А. Распределение ранжированных генов после анализа на основе RRA алгоритма. Показаны наиболее отличающиеся от контрольной библиотеки нокауты генов (хиты) в образце Raji/CD4 libB после скрининга. Б. Количество прочтений гидовых РНК, нацеленных на ген *KPNA1*, полученных в результате секвенирования клеток Raji/CD4-LibB до (контроль) и после инфекционного теста (HTLV-1 скрининг).

Из полученного списка нас заинтересовали, прежде всего, *KPNA1* и *CD82*. На рисунке 36Б представлено количество прочтений трех гидовых РНК, соответствующих нокауту по гену *KPNA1*. Число прочтений каждой из трех гидовых РНК было выше в образце, подвергшемся инфекционному тесту: разница с контролем составляла 20-70 раз. Это свидетельствует о том, что популяция клеток с нокаутом по гену *KPNA1* обогатилась после инфекционного теста. Известно, что, будучи компонентом системы импорта клеточных белков в ядро, *KPNA-1* взаимодействует с вирусными белками: с UL84 цитомегаловируса, VP24 вируса Эболы и Vpr ВИЧ-1 (Lischka et al., 2003, Reid et al., 2006, Porov et al., 1998). Однако роль *KPNA1* в репликации HTLV-1 на данный момент неизвестна.

CD82 относится к семейству тетраспанинов, известно, что матриксный белок HTLV-1 связывается с внутренней петлей CD82 (D. Mazurov, G. Heidecker, D. Derse, 2007). Кроме того, CD82 взаимодействует с белком оболочки HTLV-1 (Pique et al., 2000). Предположительно, CD82 служит промежуточным звеном в процессе созревания вирусных частиц, однако на данный момент это пока не подтверждено.

По аналогии с первым скринингом было проведено два дополнительных – на клетках Raji/CD4 с библиотекой LibA (Raji/CD4 LibA) и на клетках CEM с библиотекой B (CEM LibB). В результате NGS анализа были выявлены три гена, встречающиеся в трех независимых скринингах (рис. 37). Это означает, что нокаутные популяции клеток по данным генам обогатились в результате теста инфекции HTLV-1 в трех независимых экспериментах на разных культурах клеток, а также, независимо – на библиотеках А и В.



**Рисунок 37. Выявленные в трех независимых скринингах гены.** Нокаутные популяции по данным генам получили преимущество в тесте HTLV-1 инфекции на уровне значимости  $p < 0.05$ .

Наиболее перспективными кандидатами на факторы репликации из генов *GAPR1*, *KPNA4* и *ALDOC* по результатам анализа литературы оказались гены *GAPR1* и *KPNA4*. Ген *GAPR-1* широко экспрессируется в иммунокомпетентных клетках. Будучи белком, связанным с мембраной аппарата Гольджи, *GAPR-1* регулирует внутриклеточный сигнальный путь врожденного иммунного ответа, ассоциированный с TLR-4. Такого рода регуляция может быть выражена в посттрансляционных модификациях, которые *GAPR-1* способен вносить в белковые молекулы различных внутриклеточных сигнальных путей (Zhou Q. et al. 2016). Продукт экспрессии гена *KPNA-4*, белок импортин  $\alpha$ -3, участвует в процессе транспорта белков в ядро клетки. Известно, что *KPNA-4* взаимодействует с интегразой ВИЧ-1 и способствует импорту преинтеграционного комплекса вируса в ядро (Ao Z et al. 2010).

Интересно, что среди генов, выявленных во всех трех скринингах, обнаружился белок семейства импортинов KPNA4, тогда как ранее, в первоначальном скрининге, был выявлен другой белок этого семейства – KPNA1, который оказался первым в ранжированном списке хитов. Данные результаты указывают на то, что белки семейства импортинов, с большой вероятностью, важны в инфекции HTLV-1, что будет исследовано в дальнейшем в тестах HTLV-1 инфекции на клетках, нокаутных по KPNA1 и KPNA4.

### ***3.3.4 Получение нокаутных по гену KPNA1 клеток с помощью метода SORTS и оценка роли KPNA1 в репликации HTLV-1.***

#### ***3.3.4.1 Разработка метода SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection)***

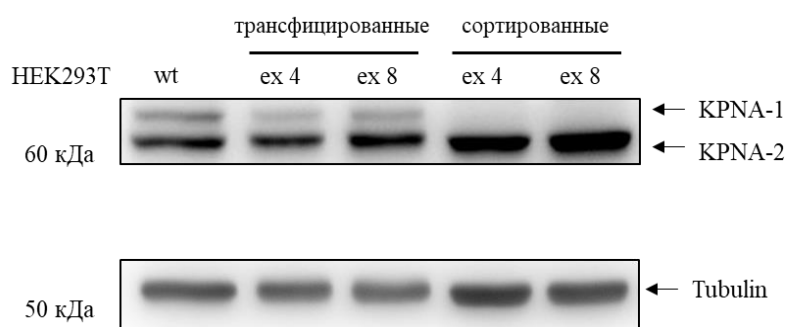
Клетки с нокаутом гена, кодирующего поверхностный белок, легко выделить методом негативной сортировки после окраски соответствующим антителом. Для получения нокаутов по внутриклеточным или секретируемым белкам обычно используют клонирование, пригодное не для всех типов клеток, или конструирование донорского вектора, которое требует много времени и может быть непростым.

Нами был разработан метод SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection), позволяющий с помощью клеточного сортера проводить быструю селекцию пула клеток, в которых произошел биаллельный нокаут по генам, кодирующим внутриклеточные или секретируемые белки. Основой метода служит нок-ин (knock-in) донорской конструкции, в состав которой входят плечи гомологии гена интереса, а также последовательность эпитопного тага (HA и/или Flag) в составе GPI-заякоренного белка CD52 (CD5FL2 и CD5HA2). Малая длина конструкций CD5FL2 и CD5HA2 позволяет использовать короткие (размером около 100 нуклеотидов) плечи гомологии в составе праймеров и получать донорскую ДНК методом ПЦР. GPI-белки (Glycosylphosphatidylinositol) процессируются в эндоплазматическом ретикулуме, где лидерный пептид и GPI-сигнал отщепляются, а средняя часть экспортируется на плазматическую мембрану в липидные рафты, к которым она заякоревается с помощью GPI-хвоста. Если нок-ин в ген интереса прошел успешно, клетки спустя 3-5 дней начинают экспрессировать на поверхности эпитопные таги HA и Flag. С помощью окрашивания клеток антителами против тагов HA и Flag и последующего клеточного сортирования данные клетки выделяют и получают популяцию клеток, в которых произошел биаллельный нокаут по гену.

### 3.3.4.2 Оценка роли *KPNA1* в репликации *HTLV-1*.

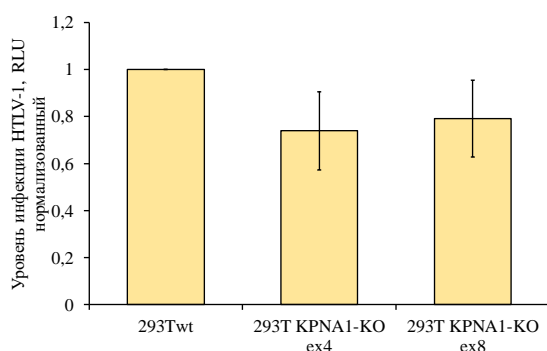
Для получения нок-ина в ген *KPNA1* были подобраны две гидовых РНК, нацеленные на 4 и 8 экзоны гена. Уровень нок-ина определялся с помощью проточной цитометрии через 3 дня после трансфекции клеток НЕК 293Т донорской ДНК и плазмидами, кодирующими Cas9 и гидовую РНК, по количеству клеток, экспрессирующих на поверхности эпитоп HA, и по интенсивности окраски.

HA-позитивные клетки были сортированы, а нокаут по гену *KPNA1* верифицирован методом вестерн-блота (см рис. 38).



**Рисунок 38.** Вестерн-блот анализ экспрессии *KPNA1* в клетках НЕК 293Т дикого типа, после трансфекции плазмидами для получения нок-ина, а также в сортированных по HA-тагу клетках.

Инфекционный тест на клетках НЕК293Т показывает снижение уровня инфекции *HTLV-1* в нокаутных по гену *kpna1* клетках по сравнению с клетками дикого типа (рис 39).



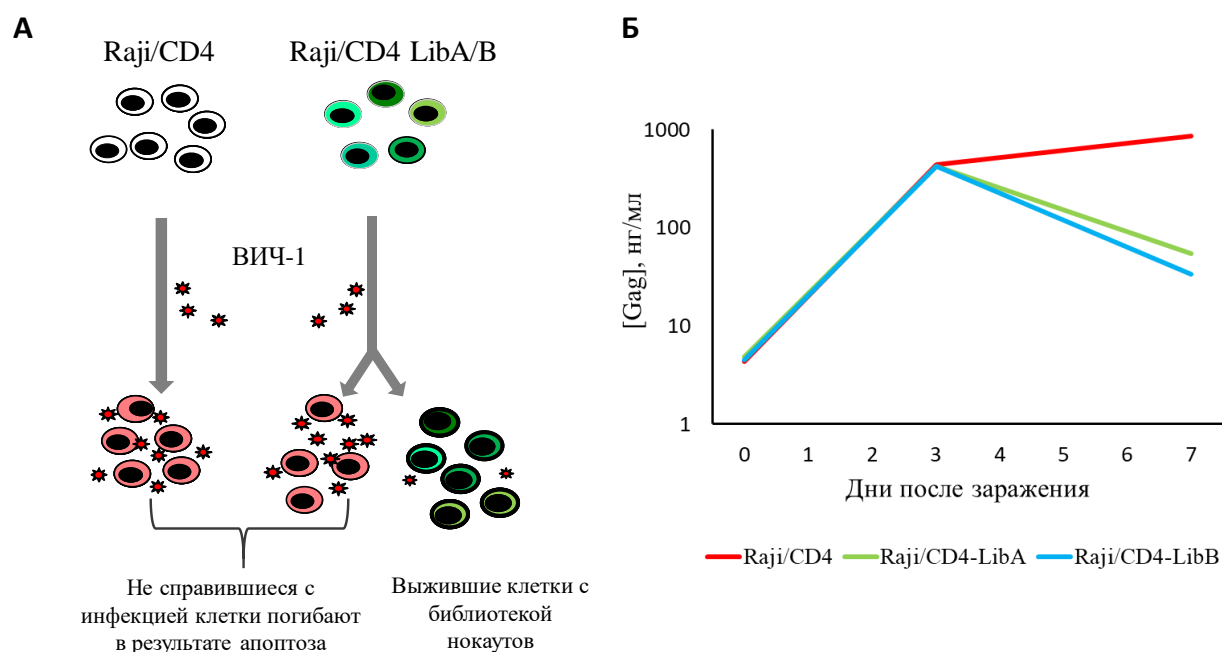
**Рисунок 39.** Результаты инфекционного теста *HTLV-1* на клетках НЕК293Т с нокаутом по гену *kpna1*, полученным с использованием двух гидовых РНК, нацеленных на 4 и 8 экзоны гена.

В ближайшей перспективе планируется получение нокаутных линий клеток СЕМ и Raji/CD4 по генам *KPNA1/4*, а также по гену *CD82* и изучение роли данных генов в инфекционных тестах.

### 3.3.5 Разработка скринингового теста для поиска факторов репликации ВИЧ-1

1

Поскольку наши результаты показывают, что межклеточная передача ВИЧ-1 позволяет вирусу преодолеть действие некоторых факторов рестрикции (раздел 3.2, рис. 26), а применение клеток библиотеки в качестве продуцентов вируса технически оказалось затруднительно, мы решили осуществить поиск факторов репликации ВИЧ-1, т.е. клеточных белков, способствующих успешной инфекции ВИЧ-1. Мы планировали искать факторы репликации на клетках библиотеки Raji/CD4 LibA и LibB. Коллеги из Института вирусологии помогли нам в постановке инфекционного теста: клетки библиотек были заражены вирусом ВИЧ-1 в дозе 0,5 MOI (рис. 40А). Уровень продукции вирусного белка Gag контролировался с помощью ИФА в нулевой точке, а также по прошествии 3 и 7 дней после заражения (см. рис. 40). Далее, после того как мы убедились, что репликация вируса в клетках библиотеки снижена по сравнению с родительскими клетками, из клеток выделялась геномная ДНК и готовились образцы для глубокого секвенирования.

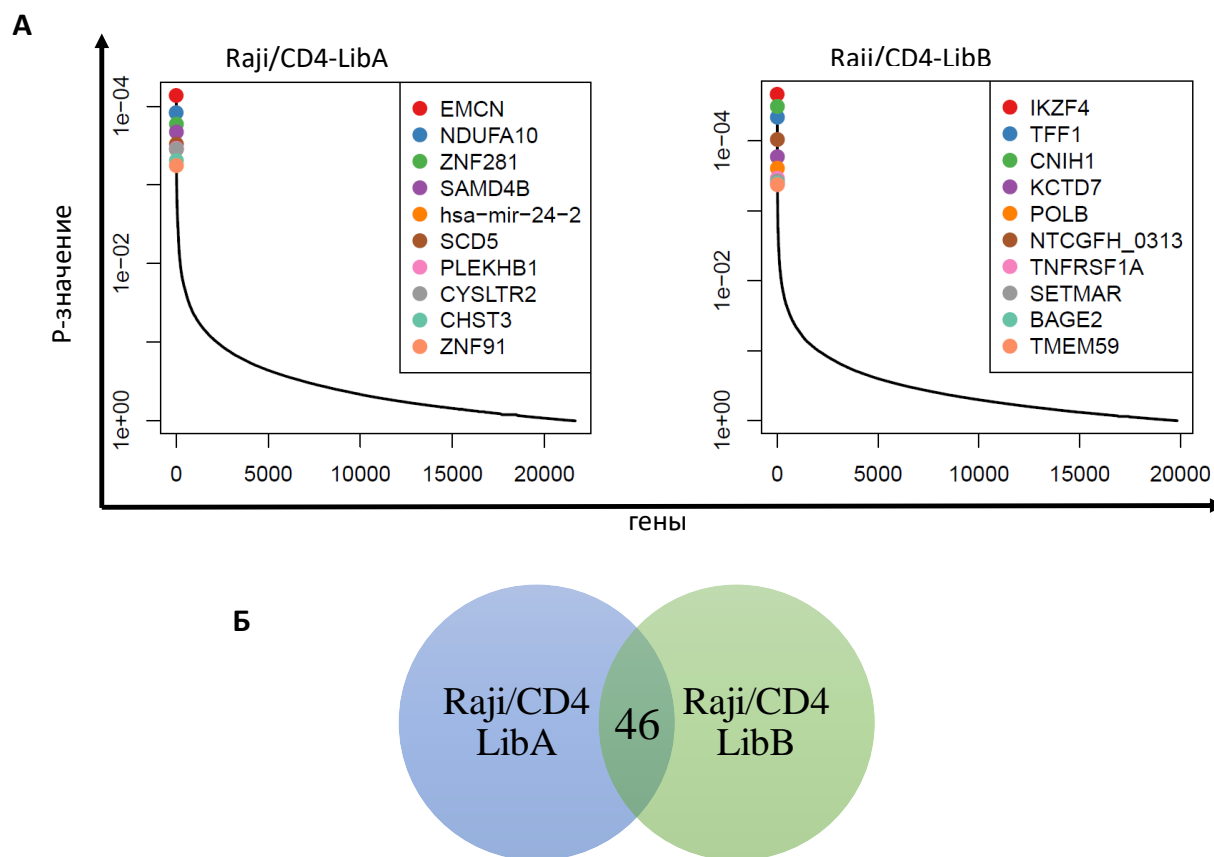


**Рисунок 40. Скрининг факторов репликации ВИЧ-1.** А. Схема инфекционного теста ВИЧ-1 на клетках Raji/CD4. Б. ИФА анализ концентрации (типичные значения) вирусного Gag после заражения клеток Raji/CD4, Raji/CD4 LibA и Raji/CD4 LibB.

Мы провели сравнительный анализ целевых последовательностей генов РНК в клетках, прошедших отбор в результате инфекции ВИЧ-1, и сравнили частоту встречаемости нокаутов генов в этих клетках по сравнению с исходными клетками библиотеки. Как и раньше, нашей задачей было выявить хиты, т.е. гены с наибольшим отклонением по отношению к контролю. Мы предполагали, что гены, нокауты которых



обогатились в результате инфекционного теста, кодируют факторы репликации вируса, способствующего инфекции. На рисунке 41 показаны хиты в каждом опытном эксперименте, а также количество общих для двух скринингов генов-хитов, выявленных с помощью RRA алгоритма на уровне значимости  $p < 0.05$ .



**Рисунок 41. Результаты скрининга факторов репликации ВИЧ-1. А.** Распределение ранжированных генов после анализа на основе RRA алгоритма. Показаны 10 нокаутов генов (хиты), наиболее отличающихся по прочтениям от контрольной библиотеки в образцах Raji/CD4-libA, Raji/CD4-libB после инфекционного теста. **Б.** Выявленные в двух независимых скринингах гены, нокаутные популяции по которым получили преимущество в тесте ВИЧ-1 инфекции на уровне значимости  $p < 0.05$ .

После анализа литературы по найденным генам-хитам оказалось, что многие из них уже известны в качестве факторов репликации ВИЧ-1, по другим кандидатам получены противоречивые данные о роли в ВИЧ-инфекции, а некоторые известны как белки-партнеры вирусных белков (Gag-pol, Env и др.), однако неизвестно, к чему приводит данное взаимодействие. Так, например, NDUFA10 (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10) – компонент электрон-транспортной цепи митохондрий. Этот фактор был уже выявлен ранее как необходимый для репликации ВИЧ в результате RNAi-скрининга (H. Zhou и др., 2008).

Мы также проанализировали все нокауты генов, обогащение которых после инфекционного теста было выявлено с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Общими для Raji/CD4-LibA и Raji/CD4-LibB оказались нокауты по 46 генам.

Среди них особенный интерес представляют гены *GP340* и *SGK1*. *GP340 (DMBT1)* кодирует гликопротеин, известный как важный рецептор (SR, Scavenger receptor) иммунной системы слизистых. Было показано, что данный рецептор связывается с белком оболочки Env ВИЧ-1 и способствует более эффективной трансмиссии вируса (E. Stoddard и др. 2007). Продукт гена *SGK1* (Serum/glucocorticoid regulated kinase) представляет собой киназу, которая была выявлена в shРНК скрининге как фактор, необходимый для репликации ВИЧ-1 (S. Rato и др., 2010).

Итак, в ходе проведенного нами скринингового теста библиотеки нокаутов GeCKO были найдены потенциальные факторы репликации ВИЧ-1, многие из которых были прежде исследованы в инфекции ВИЧ-1. Это указывает на то, что разработанная нами система поиска факторов репликации релевантная и может рассматриваться как способ нахождения новых, ранее не изученных клеточных факторов, участвующих в репликации ВИЧ-1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе было проведено исследование репликации ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии и инфекции свободными вирусными частицами. Показан вклад вспомогательных белков ВИЧ-1 в инфекцию: в нелимфоидных клетках делеции вспомогательных белков в общем случае не оказывали влияния на инфекцию, тогда как на лимфоидных линиях клеток инфекция свободными вирусными частицами падала в 2.5-10 раз. Интересно, что при межклеточной передаче инфекции Vри-дефектный вирус инфицировал клетки-мишени в 1.5 раза эффективнее, чем вирус без мутаций. Мы показали, что это объясняется действием фактора рестрикции BST2: вирусные частицы удерживались у поверхности клетки, и это, по-видимому, способствовало более эффективной межклеточной трансмиссии при контакте зараженной клетки и клетки-мишени. Более того, показатель множественности инфекции (MOI) для Vри-дефектного вируса оказался выше по сравнению с вирусом без мутаций, что говорит о том, что BST2 в отсутствие Vри способствовал заражению клетки-мишени несколькими вирусами одновременно в условиях межклеточной трансмиссии.

В ходе работы получены клеточные линии с библиотекой нокаутов GeCKO. Показана репрезентативность генов в клетках библиотеки с помощью глубокого секвенирования и анализа представленности последовательностей гидовых РНК. Показано успешное применение библиотеки нокаутов для идентификации антитела с неизвестной специфичностью: антитело VF4, полученное при иммунизации вирусными биопленками, было идентифицировано как антитело, распознающее антиген CD82.

Мы также разработали скрининговый тест для поиска факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1. Для этого в качестве мишеней инфекции использовались клетки библиотеки нокаутов GeCKO на основе CRISPR/Cas9 системы редактирования генома. Скрининговый тест предполагал, что в результате инфекционных тестов выживали популяции клеток с нокаутами по факторам репликации. После проведения анализа данных глубокого секвенирования были выявлены гены, нокауты по которым получили преимущество в результате скрининга. Среди них обнаружилось, в том числе, уже известные факторы репликации вирусов (CD82 для HTLV-1 и Sgk1 для ВИЧ-1), что говорит о релевантности данной системы.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение найденных в результате скрининга генов потенциальных факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1, в первую очередь, импортинов KPNA1, KPNA4, а также тетраспанина CD82.

## ВЫВОДЫ

1. Для определения межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1 получены усовершенствованные интрон-регулируемые векторы с повышенным уровнем сплайсинга и экспрессии.

2. Репликация ВИЧ-1, дефектного по одному из вспомогательных белков *Vpr/Vpu/Vif/Nef*, зависит от способа передачи инфекции и от типа клеток-продуцентов и клеток-мишеней. В нелимфоидных клетках эта зависимость незначительная. В лимфоидных клетках делеция в любом из вспомогательных генов ВИЧ-1 приводит к снижению инфекции свободным вирусом в 2.5-10 раза и к повышению межклеточной инфекции в 1.5 раза в случае делеции в гене *vpr*.

3. Фактор рестрикции BST2 способствует связыванию и кластеризации вирусных частиц ВИЧ-1 на поверхности эффекторных клеток, что приводит к увеличению общего количества инфицированных клеток-мишеней, а также доли клеток, зараженных двумя и более вирусными частицами одновременно.

4. Созданы лимфоидные линии человека CEM и Raji/CD4 с репрезентативной библиотекой нокаутов GeCKO для последующего поиска факторов репликации ретровирусов человека. С помощью клеток Raji/CD4 с библиотекой нокаутов определена антигенная специфичность мышинной гибридомы BF4, полученной при иммунизации вирусными биопленками HTLV-1.

5. Разработаны инфекционные тесты для скрининга библиотеки нокаутов GeCKO в целях поиска новых факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1. Подобраны оптимальные алгоритмы обработки данных глубокого секвенирования. Выявлены потенциальные факторы репликации HTLV-1, гены *KPNA1* и *KPNA4* семейства импортинов, а также ряд генов, важных для репликации ВИЧ-1, среди которых особенный интерес представляют гены *GP340* и *SGK1*.

6. Получен и верифицирован нокаут по гену *KPNA1* в клетках HEK 293T с помощью разработанного нами метода SORTS (Surface Oligopeptide knock-in for Rapid Target Selection), позволяющего сортировать редактированные клетки по поверхностной экспрессии короткого эпитопного тага.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Хочу выразить огромную благодарность моим научным руководителям, Дмитрию Вячеславовичу Мазурову и Филатову Александру Васильевичу, за чуткое руководство, полезные рекомендации, помощь в планировании экспериментов, поддержку на всех этапах работы, доброжелательное отношение и терпение. Кроме того, хочу поблагодарить Взорова Андрея Николаевича за помощь с инфекционными тестами, Пичугина Алексея Васильевича и Поташникову Дарью Марковну за помощь в сортировке клеточных культур.

Хочу также поблагодарить Зотова Ивана за помощь в обработке данных глубокого секвенирования и Герасимова Евгения за ценные советы и рекомендации в области биоинформатики. Большое спасибо Купрашу Дмитрию Владимировичу и Шилову Евгению Сергеевичу за ценные советы и критическое чтение текста диссертации.

Большое спасибо Сергею Артуровичу Недоспасову и коллективу кафедры за возможность обучения, приобретенные теоретические и практические знания, многостороннюю помощь. Я благодарна Дмитрию Борисовичу Киселевскому, Рафаелу Шаэновичу Казаряну и Нине Владимировне Взоровой за организационную помощь в работе.

Хочу выразить благодарность коллективу группы клеточных и генных технологий и лаборатории иммунохимии: Кругловой Наталье, Комкову Дмитрию, Цой Татьяне, Атемасовой Анастасии, Масленниковой Александре-Констанции, Бязровой Марии и Романовой Альфире за дружескую поддержку и полезное обсуждение рабочих моментов.

Глубочайшую благодарность выражаю Александру Александровичу Ярилину за замечательные лекции по иммунологии, доброе отношение и привитую любовь к науке.

Огромное спасибо моим родным и близким за поддержку и невероятное терпение.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Карамов Э.В., Петров Р.В. Суверенный иммунитет. Часть 1. Особенности антиретровирусного иммунного ответа. Клеточные факторы защиты, взаимодействующие с капсидными белками ретровирусов: TRIM5, циклофилин. // Физиология и патология иммунной системы. 2011. Т. 15. № 3. С. 3–22.

Карамов Э.В., Петров Р.В. Суверенный иммунитет. Часть 2. Клеточные факторы антиретровирусной защиты: тетерин, семейство APOBEC3, клеточные микроРНК. CRISPR/CAS системы прокариот. // Физиология и патология иммунной системы. 2011. Т. 15. № 4. С. 3–23.

Ahn J., Hao C., Yan J., DeLucia M., Mehrens J., Wang C., Gronenborn A.M., Skowronski J. HIV/simian immunodeficiency virus (SIV) accessory virulence factor Vpx loads the host cell restriction factor SAMHD1 onto the E3 ubiquitin ligase complex CRL4DCAF1. // J. Biol. Chem. 2012. Т. 287. № 15. С. 12550–8.

Albin J.S., Brown W.L., Harris R.S. Catalytic activity of APOBEC3F is required for efficient restriction of Vif-deficient human immunodeficiency virus. // Virology. 2014. Т. 450–451. С. 49–54.

Allan J.S., Coligan J.E., Lee T.H., McLane M.F., Kanki P.J., Groopman J.E., Essex M. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. // Science. 1985. Т. 230. № 4727. С. 810–3.

Amie S.M., Bambara R.A., Kim B. GTP Is the Primary Activator of the Anti-HIV Restriction Factor SAMHD1 // J. Biol. Chem. 2013. Т. 288. № 35. С. 25001–25006.

Andrew A.J., Miyagi E., Kao S., Strebel K. The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu // Retrovirology. 2009. Т. 6. № 1. С. 80.

Antonucci JM, St Gelais C, de Silva S, Yount JS, Tang C, Ji X, Shepard C, Xiong Y, Kim B, Wu L. SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity // Nat. Med. 2016. Т. 22. № 10. С. 1072–1074.

Arrildt K.T., Joseph S.B., Swanstrom R. The HIV-1 Env Protein: A Coat of Many Colors // Curr. HIV/AIDS Rep. 2012. Т. 9. № 1. С. 52–63.

Bachand F., Yao X.J., Hrimech M., Rougeau N., Cohen E.A. Incorporation of Vpr into human

immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. // *J. Biol. Chem.* 1999. T. 274. № 13. C. 9083–91.

Barr S.D., Smiley J.R., Bushman F.D. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. // *PLoS Pathog.* 2008. T. 4. № 2. C. e1000007.

Beitari S., Ding S., Pan Q., Finzi A., Liang C. Effect of HIV-1 Env on SERINC5 Antagonism. // *J. Virol.* 2017. T. 91. № 4.

Beloglazova N., Flick R., Tchigvintsev A., Brown G., Popovic A., Nocek B., Yakunin A.F. Nuclease activity of the human SAMHD1 protein implicated in the Aicardi-Goutieres syndrome and HIV-1 restriction. // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. № 12. C. 8101–10.

Berger A, Sommer AF, Zwarg J, Hamdorf M, Welzel K, Esly N, Panitz S, Reuter A, Ramos I, Jatiani A, Mulder LC, Fernandez-Sesma A, Rutsch F, Simon V, König R, Flory E. SAMHD1-deficient CD14+ cells from individuals with Aicardi-Goutières syndrome are highly susceptible to HIV-1 infection. // *PLoS Pathog.* 2011. T. 7. № 12. C. e1002425.

Bieniasz P.D., Grdina T.A., Bogerd H.P., Cullen B.R. Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999. T. 96. № 14. C. 7791–6.

Bishop K.N., Verma M., Kim E.-Y., Wolinsky S.M., Malim M.H. APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. // *PLoS Pathog.* 2008. T. 4. № 12. C. e1000231.

Blanchet F.P., Stalder R., Czubala M., Lehmann M., Rio L., Mangeat B., Piguet V. TLR-4 engagement of dendritic cells confers a BST-2/tetherin-mediated restriction of HIV-1 infection to CD4+ T cells across the virological synapse // *Retrovirology.* 2013. T. 10. № 1. C. 6.

Boden D., Pusch O., Silbermann R., Lee F., Tucker L., Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins // *Nucleic Acids Res.* 2004. T. 32. № 3. C. 1154–1158.

Boxus M., Twizere J.-C., Legros S., Dewulf J.-F., Kettmann R., Willems L. The HTLV-1 Tax interactome // *Retrovirology.* 2008. T. 5. № 1. C. 76.

Boxus M., Willems L. How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells. // *Retrovirology.* 2012. T. 9. C. 2.

Brass A.L., Dykxhoorn D.M., Benita Y., Yan N., Engelman A., Xavier R.J., Lieberman J.,

Elledge S.J. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. // *Science*. 2008. T. 319. № 5865. C. 921–6.

Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. // *Cell*. 2009. T. 139. № 7. C. 1243–54.

Browne E.P., Allers C., Landau N.R. Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent // *Virology*. 2009. T. 387. № 2. C. 313–321.

Burrell C.J., Li P., Davis A.J. Kinetics of viral RNA synthesis following cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. // *J. Gen. Virol.* 1997. T. 78. № 8. C. 1897–1906.

Bushman FD1, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, Zhou H, Hazuda DJ, Espeseth AS, König R, Bandyopadhyay S, Ideker T, Goff SP, Krogan NJ, Frankel AD, Young JA, Chanda SK. Host Cell Factors in HIV Replication: Meta-Analysis of Genome-Wide Studies // *PLOS Pathog.* 2009. T. 5. № 5. C. e1000437.

Casartelli N., Sourisseau M., Feldmann J., Guivel-Benhassine F., Mallet A., Marcelin A.-G., Guatelli J., Schwartz O. Tetherin Restricts Productive HIV-1 Cell-to-Cell Transmission // *PLoS Pathog.* 2010. T. 6. № 6. C. e1000955.

Chang F., Re F., Sebastian S., Sazer S., Luban J. HIV-1 Vpr induces defects in mitosis, cytokinesis, nuclear structure, and centrosomes. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. T. 15. № 4. C. 1793–801.

Chen P., Hübner W., Spinelli M.A., Chen B.K. Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. // *J. Virol.* 2007. T. 81. № 22. C. 12582–95.

Coccia E.M., Krust B., Hovanessian A.G. Specific inhibition of viral protein synthesis in HIV-infected cells in response to interferon treatment. // *J. Biol. Chem.* 1994. T. 269. № 37. C. 23087–94.

Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. Principles of Particle Assembly // *Retroviruses*. 1997.

Coleman C.M., Spearman P., Wu L. Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. // *Retrovirology*. 2011. T. 8. № 1. C. 26.



Dai W., Usami Y., Wu Y., Göttlinger H. A Long Cytoplasmic Loop Governs the Sensitivity of the Anti-viral Host Protein SERINC5 to HIV-1 Nef. // *Cell Rep.* 2018. T. 22. № 4. C. 869–875.

Dalglish A.G., Beverley P.C.L., Clapham P.R., Crawford D.H., Greaves M.F., Weiss R.A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus // *Nature.* 1984. T. 312. № 5996. C. 763–767.

Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, Ananworanich J, Benkirane M, Cannon P, Chomont N, Douek D, Lifson JD, Lo YR, Kuritzkes D, Margolis D, Mellors J, Persaud D, Tucker JD, Barre-Sinoussi F; International AIDS Society Towards a Cure Working Group, Alter G, Auerbach J, Autran B, Barouch DH, Behrens G, Cavazzana M, Chen Z, Cohen ÉA, Corbelli GM, Eholié S, Eyal N, Fidler S, Garcia L, Grossman C, Henderson G, Henrich TJ, Jefferys R, Kiem HP, McCune J, Moodley K, Newman PA, Nijhuis M, Nsubuga MS, Ott M, Palmer S, Richman D, Saez-Cirion A Sharp M, Siliciano J, Silvestri G, Singh J Spire B, Taylor J, Tolstrup M, Valente S, van Lunzen J, Walensky R, Wilson I, Zack J. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. // *Nat. Med.* 2016. T. 22. № 8. C. 839–50.

Derse D., Hill S.A., Princler G., Lloyd P., Heidecker G. Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. T. 104. № 8. C. 2915–2920.

Derse D., Hill S.A., Lloyd P.A., Chung Hk, Morse B.A. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. // *J. Virol.* 2001. T. 75. № 18. C. 8461–8.

Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, Yatim A, Schwartz O, Laguette N, Benkirane M. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+ T-cells // *Retrovirology.* 2012. T. 9. № 1. C. 87.

Desimie B.A., Delviks-Frankenberry K.A., Burdick R.C., Qi D., Izumi T., Pathak V.K. Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. // *J. Mol. Biol.* 2014. T. 426. № 6. C. 1220–45.

Dicks M.D.J., Goujon C., Pollpeter D., Betancor G., Apolonia L., Bergeron J.R.C., Malim M.H. Oligomerization Requirements for MX2-Mediated Suppression of HIV-1 Infection. // *J. Virol.* 2016. T. 90. № 1. C. 22–32.

Dimitrov D.S., Willey R.L., Sato H., Chang L.J., Blumenthal R., Martin M.A. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. // *J. Virol.* 1993. T. 67. № 4. C. 2182–

90.

Douglas J.L., Viswanathan K., McCarroll M.N., Gustin J.K., Fruh K., Moses A. V. Vpu Directs the Degradation of the Human Immunodeficiency Virus Restriction Factor BST-2/Tetherin via a TrCP-Dependent Mechanism // *J. Virol.* 2009. T. 83. № 16. C. 7931–7947.

Dutartre H., Clavière M., Journo C., Mahieux R. Cell-Free versus Cell-to-Cell Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Exploring the Link among Viral Source, Viral Trafficking, and Viral Replication DETERMINE THE OUTCOME OF INFECTION // 2016. T. 90. № 17. C. 7607–7617.

Dykxhoorn D.M., Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. // *Annu. Rev. Med.* 2005. T. 56. C. 401–23.

Esposito D., Koliopoulos M.G., Rittinger K. Structural determinants of TRIM protein function // *Biochem. Soc. Trans.* 2017. T. 45. № 1. C. 183–191.

Ewart G.D., Sutherland T., Gage P.W., Cox G.B. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. // *J. Virol.* 1996. T. 70. № 10. C. 7108–15.

Fan J., Ma G., Nosaka K., Tanabe J., Satou Y., Koito A., Wain-Hobson S., Vartanian J.-P., Matsuoka M. APOBEC3G Generates Nonsense Mutations in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes In Vivo // *J. Virol.* 2010. T. 84. № 14. C. 7278–7287.

Felzien L.K., Woffendin C., Hottiger M.O., Subbramanian R.A., Cohen E.A., Nabel G.J. HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. T. 95. № 9. C. 5281–6.

Fourati S, Malet I, Binka M, Boukobza S, Wirden M, Sayon S, Simon A, Katlama C, Simon V, Calvez V, Marcelin AG. Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. // *AIDS.* 2010. T. 24. № 15. C. 2313–21.

Fribourgh JL, Nguyen HC, Matreyek KA, Alvarez FJD, Summers BJ, Dewdney TG, Aiken C, Zhang P, Engelman A, Xiong Y. Structural insight into HIV-1 restriction by MxB. // *Cell Host Microbe.* 2014. T. 16. № 5. C. 627–638.

Fricke T., White T.E., Schulte B., Souza Aranha Vieira D.A. de, Dharan A., Campbell E.M., Brandariz-Nuñez A., Diaz-Griffero F. MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1 // *Retrovirology.* 2014. T. 11. № 1. C. 68.

- Galão R.P., Le Tortorec A., Pickering S., Kueck T., Neil S.J.D. Innate Sensing of HIV-1 Assembly by Tetherin Induces NFκB-Dependent Proinflammatory Responses // *Cell Host Microbe*. 2012. T. 12. № 5. C. 633–644.
- Gallay P., Stitt V., Mundy C., Oettinger M., Trono D. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. // *J. Virol*. 1996. T. 70. № 2. C. 1027–32.
- Gallo R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. // *Retrovirology*. 2005. T. 2. C. 17.
- Garcia J. V, Miller A.D. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. // *Nature*. 1991. T. 350. № 6318. C. 508–11.
- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. // *Cell*. 2001. T. 107. № 1. C. 55–65.
- Gaudray G., Gachon F., Basbous J., Biard-Piechaczyk M., Devaux C., Mesnard J.-M. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. // *J. Virol*. 2002. T. 76. № 24. C. 12813–22.
- Gélinas J.-F., Gill D.R., Hyde S.C. Multiple Inhibitory Factors Act in the Late Phase of HIV-1 Replication: a Systematic Review of the Literature // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2018. T. 82. № 1. C. e00051-17.
- Gessain A., Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection // *Front. Microbiol.* 2012. T. 3. C. 388.
- Gessain A., Barin F., Vernant J.C., Gout O., Maurs L., Calender A., Thé G. de. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. // *Lancet*. 1985. T. 2. № 8452. C. 407–10.
- Giese S., Marsh M. Tetherin Can Restrict Cell-Free and Cell-Cell Transmission of HIV from Primary Macrophages to T Cells // *PLoS Pathog.* 2014. T. 10. № 7. C. e1004189.
- Goh W.C., Rogel M.E., Kinsey C.M., Michael S.F., Fultz P.N., Nowak M.A., Hahn B.H., Emerman M. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. // *Nat. Med.* 1998. T. 4. № 1. C. 65–71.

Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E, Walker PA, Kelly G, Haire LF, Yap MW, de Carvalho LP, Stoye JP, Crow YJ, Taylor IA, Webb M. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. // *Nature*. 2011. T. 480. № 7377. C. 379–82.

Goto T., Kennel S.J., Abe M., Takishita M., Kosaka M., Solomon A., Saito S. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. // *Blood*. 1994. T. 84. № 6. C. 1922–30.

Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, Hué S, Barclay WS, Schulz R, Malim MH. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection // *Nature*. 2013. T. 502. № 7472. C. 559–562.

Goujon C., Greenbury R.A., Papaioannou S., Doyle T., Malim M.H. A triple-arginine motif in the amino-terminal domain and oligomerization are required for HIV-1 inhibition by human MX2. // *J. Virol*. 2015. T. 89. № 8. C. 4676–80.

Greenwood E.J., Matheson N.J., Wals K., Boomen D.J. van den, Antrobus R., Williamson J.C., Lehner P.J. Temporal proteomic analysis of HIV infection reveals remodelling of the host phosphoproteome by lentiviral Vif variants. // *Elife*. 2016. T. 5.

Haller O., Kochs G. Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like GTPase with Broad Antiviral Activity // *J. Interf. Cytokine Res*. 2011. T. 31. № 1. C. 79–87.

Hammonds J., Spearman P. Tetherin Is as Tetherin Does // *Cell*. 2009. T. 139. № 3. C. 456–457.

Han K., Lou D.I., Sawyer S.L. Identification of a genomic reservoir for new TRIM genes in primate genomes. // *PLoS Genet*. 2011. T. 7. № 12. C. e1002388.

Hansen E.C., Seamon K.J., Cravens S.L., Stivers J.T. GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2014. T. 111. № 18. C. E1843–E1851.

Haoudi A., Daniels R.C., Wong E., Kupfer G., Semmes O.J. Human T-cell leukemia virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA damage-response. // *J. Biol. Chem*. 2003. T. 278. № 39. C. 37736–44.

Harris R.S., Bishop K.N., Sheehy A.M., Craig H.M., Petersen-Mahrt S.K., Watt I.N., Neuberger M.S., Malim M.H. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. // *Cell*. 2003. T. 113. № 6. C. 803–9.

- Harris R.S., Petersen-Mahrt S.K., Neuberger M.S. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. // *Mol. Cell*. 2002. T. 10. № 5. C. 1247–53.
- Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. // *Science*. 2010. T. 327. № 5962. C. 167–70.
- Hrecka K., Hao C., Gierszewska M., Swanson S.K., Kesik-Brodacka M., Srivastava S., Florens L., Washburn M.P., Skowronski J. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. // *Nature*. 2011. T. 474. № 7353. C. 658–61.
- Hsu K., Han J., Shinlapawittayatorn K., Deschenes I., Marbán E. Membrane potential depolarization as a triggering mechanism for Vpu-mediated HIV-1 release. // *Biophys. J*. 2010. T. 99. № 6. C. 1718–25.
- Igakura T., Stinchcombe J.C., Goon P.K.C., Taylor G.P., Weber J.N., Griffiths G.M., Tanaka Y., Osame M., Bangham C.R.M. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. // *Science*. 2003. T. 299. № 5613. C. 1713–6.
- Inuzuka M., Hayakawa M., Ingi T. Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. // *J. Biol. Chem*. 2005. T. 280. № 42. C. 35776–83.
- Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E, Li M, Anderson BD, Yen L, Stanley D, Mahon C, Kane J, Franks-Skiba K, Cimermanic P, Burlingame A, Sali A, Craik CS, Harris RS, Gross JD, Krogan NJ. Vif hijacks CBF- $\beta$  to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. // *Nature*. 2011. T. 481. № 7381. C. 371–5.
- Jarmuz A., Chester A., Bayliss J., Gisbourne J., Dunham I., Scott J., Navaratnam N. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. // *Genomics*. 2002. T. 79. № 3. C. 285–96.
- Ji X, Wu Y, Yan J, Mehrens J, Yang H, DeLucia M, Hao C, Gronenborn AM, Skowronski J, Ahn J, Xiong Y. Mechanism of allosteric activation of SAMHD1 by dGTP // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2013. T. 20. № 11. C. 1304–1309.
- Ji X., Tang C., Zhao Q., Wang W., Xiong Y. Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1 // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2014. T. 111. № 41. C. E4305–E4314.
- Jia B., Serra-Moreno R., Neidermyer W., Rahmberg A., Mackey J., Fofana I. Ben, Johnson W.E., Westmoreland S., Evans D.T. Species-Specific Activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in Overcoming Restriction by Tetherin/BST2 // *PLoS Pathog*. 2009. T. 5. № 5. C. e1000429.

- Jolly C., Booth N.J., Neil S.J.D. Cell-cell spread of human immunodeficiency virus type 1 overcomes tetherin/BST-2-mediated restriction in T cells. // *J. Virol.* 2010. T. 84. № 23. C. 12185–12199.
- Jolly C., Mitar I., Sattentau Q.J. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. // *J. Virol.* 2007. T. 81. № 11. C. 5547–60.
- Jolly C., Kashefi K., Hollinshead M., Sattentau Q.J. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. // *J. Exp. Med.* 2004. T. 199. № 2. C. 283–93.
- Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Bénit L, Ruscetti FW, Hermine O, Pique C. Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors // *Viruses.* 2011. T. 3. № 6. C. 794–810.
- Jones K.S., Petrow-Sadowski C., Bertolette D.C., Huang Y., Ruscetti F.W. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4+ T Cells // *J. Virol.* 2005. T. 79. № 20. C. 12692–12702.
- Kajaste-Rudnitski A, Marelli SS, Pultrone C, Pertel T, Uchil PD, Mehti N, Mothes W, Poli G, Luban J, Vicenzi E. TRIM22 inhibits HIV-1 transcription independently of its E3 ubiquitin ligase activity, Tat, and NF-kappaB-responsive long terminal repeat elements. // *J. Virol.* 2011. T. 85. № 10. C. 5183–96.
- Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, Kutluay SB, Zang T, Wilson SJ, Schoggins JW, Rice CM, Yamashita M, Hatzioannou T, Bieniasz PD. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection // *Nature.* 2013. T. 502. № 7472. C. 563–566.
- Kim EY, Lorenzo-Redondo R, Little SJ, Chung YS, Phalora PK, Maljkovic Berry I, Archer J, Penugonda S, Fischer W, Richman DD, Bhattacharya T, Malim MH, Wolinsky SM. Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. // *PLoS Pathog.* 2014. T. 10. № 7. C. e1004281.
- Ketting R.F., Fischer S.E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G.J., Plasterk R.H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. // *Genes Dev.* 2001. T. 15. № 20. C. 2654–9.
- Kinjo T., Ham-Terhune J., Peloponese J.M., Jeang K.T. Induction of Reactive Oxygen Species by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Correlates with DNA Damage and Expression of Cellular Senescence Marker // *J. Virol.* 2010. T. 84. № 10. C. 5431–5437.

Kirchhoff F., Greenough T.C., Brettler D.B., Sullivan J.L., Desrosiers R.C. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. // *N. Engl. J. Med.* 1995. T. 332. № 4. C. 228–32.

Klimkait T., Strebel K., Hoggan M.D., Martin M.A., Orenstein J.M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. // *J. Virol.* 1990. T. 64. № 2. C. 621–9.

Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato H, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. // *J. Virol.* 2011. T. 85. № 2. C. 932–45.

König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhlen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. // *Cell.* 2008. T. 135. № 1. C. 49–60.

Kooij B. van de, Verbrugge I., Vries E. de, Gijsen M., Montserrat V., Maas C., Neeffjes J., Borst J. Ubiquitination by the Membrane-associated RING-CH-8 (MARCH-8) Ligase Controls Steady-state Cell Surface Expression of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Receptor 1 // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. № 9. C. 6617–6628.

Kress A.K., Grassmann R., Fleckenstein B. Cell Surface Markers in HTLV-1 Pathogenesis // *Viruses.* 2011. T. 3. № 8. C. 1439–1459.

Kuhl B.D., Sloan R.D., Donahue D.A., Bar-Magen T., Liang C., Wainberg M.A. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1 // *Retrovirology.* 2010. T. 7. № 1. C. 115.

Kupzig S., Korolchuk V., Rollason R., Sugden A., Wilde A., Banting G. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. // *Traffic.* 2003. T. 4. № 10. C. 694–709.

Kutluay S.B., Perez-Caballero D., Bieniasz P.D. Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. // *PLoS Pathog.* 2013. T. 9. № 3. C. e1003214.

Kyei G.B., Cheng X., Ramani R., Ratner L. Cyclin L2 is a critical HIV dependency factor in macrophages that controls SAMHD1 abundance. // *Cell Host Microbe.* 2015. T. 17. № 1. C. 98–106.

Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringiard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, Yatim A, Emiliani S, Schwartz O, Benkirane M. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx // *Nature*. 2011. T. 474. № 7353. C. 654–657.

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. // *Science*. 2001. T. 294. № 5543. C. 853–8.

Lama J., Mangasarian A., Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. // *Curr. Biol*. 1999. T. 9. № 12. C. 622–31.

Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Petrow-Sadowski C, Janvier S, Heveker N, Ruscetti FW, Perret G, Jones KS, Pique C. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. // *Blood*. 2009. T. 113. № 21. C. 5176–85.

Lamichhane R., Mukherjee S., Smolin N., Pauszek R.F., Bradley M., Sastri J., Robia S.L., Millar D., Campbell E.M. Dynamic conformational changes in the rhesus TRIM5 $\alpha$  dimer dictate the potency of HIV-1 restriction // *Virology*. 2017. T. 500. C. 161–168.

Larue R.S., Lengyel J., Jónsson S.R., Andrésdóttir V., Harris R.S. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. // *J. Virol*. 2010. T. 84. № 16. C. 8193–201.

Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. // *Science*. 2001. T. 294. № 5543. C. 858–62.

Lavallée C., Yao X.J., Ladha A., Göttlinger H., Haseltine W.A., Cohen E.A. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. // *J. Virol*. 1994. T. 68. № 3. C. 1926–34.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. // *Nature*. 2003. T. 425. № 6956. C. 415–9.

Li M, Kao E, Gao X, Sandig H, Limmer K, Pavon-Eternod M, Jones TE, Landry S, Pan T, Weitzman MD, David M. Codon-usage-based inhibition of HIV protein synthesis by human schlafen 11 // *Nature*. 2012. T. 491. № 7422. C. 125–128.

Li YL, Chandrasekaran V, Carter SD, Woodward CL, Christensen DE, Dryden KA, Pornillos O, Yeager M, Ganser-Pornillos BK, Jensen GJ, Sundquist W. Primate TRIM5 proteins form hexagonal nets on HIV-1 capsids // *Elife*. 2016. T. 5.



- Liu L, Oliveira NM, Cheney KM, Pade C, Dreja H, Bergin AM, Borgdorff V, Beach DH, Bishop CL, Dittmar MT, McKnight A. A whole genome screen for HIV restriction factors // *Retrovirology* 2011 81. 2011. T. 8. № 1. C. 94.
- Liu Z., Pan Q., Ding S., Qian J., Xu F., Zhou J., Cen S., Guo F., Liang C. The interferon-inducible MxB protein inhibits HIV-1 infection. // *Cell Host Microbe*. 2013. T. 14. № 4. C. 398–410.
- Ma G., Yasunaga J., Akari H., Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. T. 112. № 7. C. 2216–2221.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. // *Science*. 2013. T. 339. № 6121. C. 823–6.
- Manel N., Kim F.J., Kinet S., Taylor N., Sitbon M., Battini J.-L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. // *Cell*. 2003. T. 115. № 4. C. 449–59.
- Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L., Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. // *Nature*. 2003. T. 424. № 6944. C. 99–103.
- Mariani R., Chen D., Schröfelbauer B., Navarro F., König R., Bollman B., Münk C., Nymark-McMahon H., Landau N.R. Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. // *Cell*. 2003. T. 114. № 1. C. 21–31.
- Martin-Serrano J., Zang T., Bieniasz P.D. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress // *Nat. Med.* 2001. T. 7. № 12. C. 1313–1319.
- Masuyama N, Kuronita T, Tanaka R, Muto T, Hirota Y, Takigawa A, Fujita H, Aso Y, Amano J, Tanaka Y. HM1.24 Is Internalized from Lipid Rafts by Clathrin-mediated Endocytosis through Interaction with  $\alpha$ -Adaptin // *J. Biol. Chem.* 2009. T. 284. № 23. C. 15927–15941.
- Matheson NJ, Sumner J, Wals K, Rapiteanu R, Weekes MP, Vigan R, Weinelt J, Schindler M, Antrobus R, Costa AS, Frezza C, Clish CB, Neil SJ, Lehner PJ. Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Amino Acid Metabolism by Vpu and Nef // *Cell Host Microbe*. 2015. T. 18. № 4. C. 409–423.
- Matreyek K.A., Wang W., Serrao E., Singh P.K., Levin H.L., Engelman A. Host and viral determinants for MxB restriction of HIV-1 infection // *Retrovirology*. 2014. T. 11. № 1. C. 90.

Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways // *Oncogene*. 2003. T. 22. № 21. C. 3307–3318.

Mavrommatis E., Fish E.N., Plataniotis L.C. The schlafen family of proteins and their regulation by interferons. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2013. T. 33. № 4. C. 206–10.

Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G., Lloyd P., Derse D. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. // *PLoS Pathog.* 2010. T. 6. № 2. C. e1000788.

Mazurov D., Ilinskaya A., Heidecker G., Filatov A. Role of O-glycosylation and expression of CD43 and CD45 on the surfaces of effector T cells in human T cell leukemia virus type 1 cell-to-cell infection. // *J. Virol.* 2012. T. 86. № 5. C. 2447–58.

Mazurov D., Heidecker G., Derse D. The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. // *J. Biol. Chem.* 2007. T. 282. № 6. C. 3896–903. Mitchell M.S., Bodine E.T., Hill S., Princler G., Lloyd P., Mitsuya H., Matsuoka M., Derse D. Phenotypic and genotypic comparisons of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptases from infected T-cell lines and patient samples. // *J. Virol.* 2007. T. 81. № 9. C. 4422–8.

McManus M.T., Petersen C.P., Haines B.B., Chen J., Sharp P.A. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. // *RNA*. 2002. T. 8. № 6. C. 842–50.

Montfort N. Van, Olganier D., Hiscott J. Unmasking immune sensing of retroviruses: Interplay between innate sensors and host effectors // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. T. 25. № 6. C. 657-68.

Mourez T., Simon F., Plantier J.-C. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2013. T. 26. № 3. C. 448–61.

Müller B., Tessmer U., Schubert U., Kräusslich H.G. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. // *J. Virol.* 2000. T. 74. № 20. C. 9727–31.

Murakami T., Freed E.O. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. T. 97. № 1. C. 343–8.

Murray JL, Mavrakakis M, McDonald NJ, Yilla M, Sheng J, Bellini WJ, Zhao L, Le Doux JM, Shaw MW, Luo CC, Lippincott-Schwartz J, Sanchez A, Rubin DH, Hodge TW. Rab9 GTPase Is Required for Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1, Filoviruses, and Measles Virus // *J. Virol.* 2005. T. 79. № 18. C. 11742–11751.

Muthumani K., Hwang D.S., Dayes N.S., Kim J.J., Weiner D.B. The HIV-1 accessory gene vpr can inhibit antigen-specific immune function. // *DNA Cell Biol.* 2002a. T. 21. № 9. C. 689–95.

Muthumani K., Hwang D.S., Desai B.M., Zhang D., Dayes N., Green D.R., Weiner D.B. HIV-1 Vpr induces apoptosis through caspase 9 in T cells and peripheral blood mononuclear cells. // *J. Biol. Chem.* 2002b. T. 277. № 40. C. 37820–31.

Nakayama EE, Saito A, Sultana T, Jin Z, Nohata K, Shibata M, Hosoi M, Motomura K, Shioda T, Sangkitporn S, Locket R, Saeng-Aroon S. Naturally Occurring Mutations in HIV-1 CRF01\_AE Capsid Affect Viral Sensitivity to Restriction Factors. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2018. T. 34. № 4. C. 382–392.

Napolitano L.M., Meroni G. TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation // *IUBMB Life.* 2012. T. 64. № 1. C. 64–71.

Neil S.J.D., Eastman S.W., Jouvenet N., Bieniasz P.D. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane // *PLoS Pathog.* 2006. T. 2. № 5. C. 354–367.

Neil S.J.D., Zang T., Bieniasz P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. // *Nature.* 2008. T. 451. № 7177. C. 425–430.

Nguyen D.G., Yin H., Zhou Y., Wolff K.C., Kuhlen K.L., Caldwell J.S. Identification of novel therapeutic targets for HIV infection through functional genomic cDNA screening // *Virology.* 2007. T. 362. № 1. C. 16–25.

Nisole S., Lynch C., Stoye J.P., Yap M.W. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. T. 101. № 36. C. 13324–13328.

Ohmura-Hoshino M., Matsuki Y., Aoki M., Goto E., Mito M., Uematsu M., Kakiuchi T., Hotta H., Ishido S. Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. // *J. Immunol.* 2006. T. 177. № 1. C. 341–54.

Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, Ono K, Yoshimura Y, Kawai S, Koishihara Y, Ozaki S,

- Kosaka M, Hirano T, Tsuchiya M. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. T. 258. № 3. C. 583–91.
- Ohtsuki Y., Akagi T., Takahashi K., Miyoshi I. Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. // *Arch. Virol.* 1982. T. 73. № 1. C. 69–73.
- Ooms M., Krikoni A., Kress A.K., Simon V., Munk C. APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H Haplotype 2 Restrict Human T-Lymphotropic Virus Type 1 // *J. Virol.* 2012. T. 86. № 11. C. 6097–6108.
- Ozato K., Shin D.-M., Chang T.-H., Morse H.C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. T. 8. № 11. C. 849–860.
- Pais-Correia A.-M., Sachse M., Guadagnini S., Robbiati V., Lasserre R., Gessain A., Gout O., Alcover A., Thoulouze M.-I. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses // *Nat. Med.* 2010. T. 16. № 1. C. 83–89.
- Park RJ, Wang T, Koundakjian D, Hultquist JF, Lamothe-Molina P, Monel B, Schumann K, Yu H, Krupczak KM, Garcia-Beltran W, Piechocka-Trocha A, Krogan NJ, Marson A, Sabatini DM, Lander ES, Hacohen N, Walker BD. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors // *Nat. Genet.* 2017. T. 49. № 2. C. 193–203.
- Pearce-Pratt R., Malamud D., Phillips D.M. Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. // *J. Virol.* 1994. T. 68. № 5. C. 2898–905.
- Perez-Caballero D., Zang T., Ebrahimi A., McNatt M.W., Gregory D. a., Johnson M.C., Bieniasz P.D. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells // *Cell.* 2009. T. 139. № 3. C. 499–511.
- Pertel T, Hausmann S, Morger D, Züger S, Guerra J, Lascano J, Reinhard C, Santoni FA, Uchil PD, Chatel L, Bisiaux A, Albert ML, Strambio-De-Castillia C, Mothes W, Pizzato M, Grütter MG, Luban J. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice // *Nature.* 2011. T. 472. № 7343. C. 361–365.
- Piguet V., Sattentau Q. Dangerous liaisons at the virological synapse // 2004. T. 114. № 5. C. 1–6.
- Plantier J.C., Leoz M., Dickerson J.E., Oliveira F. De, Cordonnier F., Lemée V., Damond F., Robertson D.L., Simon F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas // *Nat.*

Med. 2009. T. 15. № 8. C. 871–872.

Poiesz B.J., Ruscetti F.W., Gazdar A.F., Bunn P.A., Minna J.D., Gallo R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1980. T. 77. № 12. C. 7415–9.

Popov S., Rexach M., Ratner L., Blobel G., Bukrinsky M. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. // J. Biol. Chem. 1998. T. 273. № 21. C. 13347–52.

Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P, Venzon D, Franchini G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. T. 107. № 48. C. 20738–43.

Rajsbaum R., García-Sastre A., Versteeg G.A. TRIMmunity: The Roles of the TRIM E3-Ubiquitin Ligase Family in Innate Antiviral Immunity // J. Mol. Biol. 2014. T. 426. № 6. C. 1265–1284.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. // Cell. 2013. T. 154. № 6. C. 1380–9.

Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D. a, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. // Nat. Protoc. 2013. T. 8. № 11. C. 2281–308.

Rato S, Maia S, Brito PM, Resende L, Pereira CF, Moita C, Freitas RP, Moniz-Pereira J, Hacothen N, Moita LF, Goncalves J. Novel HIV-1 knockdown targets identified by an enriched kinases/phosphatases shRNA library using a long-term iterative screen in jurkat T-cells // PLoS One. 2010. T. 5. № 2.

Refsland E.W., Stenglein M.D., Shindo K., Albin J.S., Brown W.L., Harris R.S. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. // Nucleic Acids Res. 2010. T. 38. № 13. C. 4274–84.

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. // EMBO J. 2001. T. 20. № 9. C. 2140–51.

Rold C.J., Aiken C. Proteasomal Degradation of TRIM5 $\alpha$  during Retrovirus Restriction // PLoS Pathog. 2008. T. 4. № 5. C. e1000074.

- Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, McCauley SM, Nowosielska A, Antonarakis SE, Luban J, Santoni FA, Pizzato M. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation // *Nature*. 2015. T. 526. № 7572. C. 212–217.
- Roulston A., Lin R., Beauparlant P., Wainberg M.A., Hiscott J. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 and cytokine gene expression in myeloid cells by NF-kappa B/Rel transcription factors. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1995. T. 59. № 3.
- Rudnicka D, Feldmann J, Porrot F, Wietgreffe S, Guadagnini S, Prévost MC, Estaquier J, Haase AT, Sol-Foulon N, Schwartz O. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. // *J. Virol.* 2009. T. 83. № 12. C. 6234–6246.
- Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, Seo D, Kim J, White TE, Brandariz-Nuñez A, Diaz-Griffero F, Yun CH, Hollenbaugh JA, Kim B, Baek D, Ahn K. The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction // *Nat. Med.* 2014. T. 20. № 8. C. 936–941.
- Ryoo J., Hwang S.-Y., Choi J., Oh C., Ahn K. Reply to SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity // *Nat. Med.* 2016. T. 22. № 10. C. 1074–1075.
- Sakai H., Tokunaga K., Kawamura M., Adachi A. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types // *J. Gen. Virol.* 1995. T. 76. № 11. C. 2717–2722.
- Sanjana N.E., Shalem O., Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. // *Nat. Methods.* 2014. T. 11. № 8. C. 783–784.
- Sardiello M., Cairo S., Fontanella B., Ballabio A., Meroni G. Genomic analysis of the TRIM family reveals two groups of genes with distinct evolutionary properties. // *BMC Evol. Biol.* 2008. T. 8. № 1. C. 225.
- Sastri J., Campbell E.M. Recent insights into the mechanism and consequences of TRIM5 $\alpha$  retroviral restriction. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2011. T. 27. № 3. C. 231–8.
- Sato H., Orenstein J., Dimitrov D., Martin M. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. // *Virology.* 1992. T. 186. № 2. C. 712–24.
- Sattentau Q.J. The direct passage of animal viruses between cells // *Curr. Opin. Virol.* 2011. T. 1. № 5. C. 396–402.
- Sauter D. Counteraction of the multifunctional restriction factor tetherin // *Front. Microbiol.*

2014. T. 5. № APR. C. 1–14.

Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayouba A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatziioannou T, Kirchhoff F. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. // *Cell Host Microbe*. 2009. T. 6. № 5. C. 409–21.

Sauter D., Specht A., Kirchhoff F. Tetherin: holding on and letting go. // *Cell*. 2010. T. 141. № 3. C. 392–8.

Sawaya B.E., Khalili K., Gordon J., Taube R., Amini S. Cooperative Interaction between HIV-1 Regulatory Proteins Tat and Vpr Modulates Transcription of the Viral Genome // *J. Biol. Chem*. 2000. T. 275. № 45. C. 35209–35214.

Sayah D.M., Sokolskaja E., Berthoux L., Luban J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. // *Nature*. 2004. T. 430. № 6999. C. 569–73.

Schwartz O., Maréchal V., Gall S. Le, Lemonnier F., Heard J.M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. // *Nat. Med*. 1996. T. 2. № 3. C. 338–42.

Schwartz S., Felber B.K., Fenyö E.M., Pavlakis G.N. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. // *J. Virol*. 1990. T. 64. № 11. C. 5448–56.

Seamon K.J., Sun Z., Shlyakhtenko L.S., Lyubchenko Y.L., Stivers J.T. SAMHD1 is a single-stranded nucleic acid binding protein with no active site-associated nuclease activity // *Nucleic Acids Res*. 2015. T. 43. № 13. C. 6486–6499.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. // *Science*. 2014. T. 343. № 6166. C. 84–7.

Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2011. T. 1. № 1. C. a006841.

Sheehy A.M., Gaddis N.C., Malim M.H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. // *Nat. Med*. 2003. T. 9. № 11. C. 1404–7.

- Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein // *Nature*. 2002. T. 418. № 6898. C. 646–650.
- Sherer N.M., Lehmann M.J., Jimenez-Soto L.F., Horensavitz C., Pypaert M., Mothes W. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. // *Nat. Cell Biol.* 2007. T. 9. № 3. C. 310–5.
- Singh R, Gaiha G, Werner L, McKim K, Mlisana K, Luban J, Walker BD, Karim SS, Brass AL, Ndung'u T; CAPRISA Acute Infection Study Team. Association of TRIM22 with the type 1 interferon response and viral control during primary HIV-1 infection. // *J. Virol.* 2011. T. 85. № 1. C. 208–16.
- Schwartz O. ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. // *EMBO J.* 2007. T. 26. № 2. C. 516–26.
- Soliman M., Srikrishna G., Balagopal A. Mechanisms of HIV-1 Control. // *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2017. T. 14. № 3. C. 101–109.
- Sood C., Marin M., Chande A., Pizzato M., Melikyan G.B. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins // *J. Biol. Chem.* 2017. T. 292. № 14. C. 6014–6026.
- Sourisseau M., Sol-Foulon N., Porrot F., Blanchet F., Schwartz O. Inefficient Human Immunodeficiency Virus Replication in Mobile Lymphocytes // *J. Virol.* 2007. T. 81. № 2. C. 1000–1012.
- Stabell A.C., Hawkins J., Li M., Gao X., David M., Press W.H., Sawyer S.L. Non-human Primate Schlafen11 Inhibits Production of Both Host and Viral Proteins // *PLOS Pathog.* 2016. T. 12. № 12. C. e1006066.
- Subramanya S., Kim S.-S., Manjunath N., Shankar P. RNA interference-based therapeutics for human immunodeficiency virus HIV-1 treatment: synthetic siRNA or vector-based shRNA? // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2010. T. 10. C. 201–213.
- Weissman D. gp340 expressed on human genital epithelia binds HIV-1 envelope protein and facilitates viral transmission. // *J. Immunol.* 2007. T. 179. № 5. C. 3126–32.
- Stoddard E., Cannon G., Ni H., Kariko K., Capodici J., Malamud D., Weissman D. gp340 Expressed on Human Genital Epithelia Binds HIV-1 Envelope Protein and Facilitates Viral Transmission // *J. Immunol.* 2014. T. 179. № 5. C. 3126–3132.



- Strebel K., Klimkait T., Maldarelli F., Martin M.A. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. // *J. Virol.* 1989. T. 63. № 9. C. 3784–91.
- Stremlau M., Owens C.M., Perron M.J., Kiessling M., Autissier P., Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. // *Nature.* 2004. T. 427. № 6977. C. 848–53.
- Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, Diaz-Griffero F, Anderson DJ, Sundquist WI, Sodroski J. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 $\alpha$  restriction factor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. T. 103. № 14. C. 5514–9.
- Suspène R., Rusniok C., Vartanian J.-P., Wain-Hobson S. Twin gradients in APOBEC3 edited HIV-1 DNA reflect the dynamics of lentiviral replication. // *Nucleic Acids Res.* 2006. T. 34. № 17. C. 4677–84.
- Tada T., Zhang Y., Koyama T., Tobiume M., Tsunetsugu-Yokota Y., Yamaoka S., Fujita H., Tokunaga K. MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins // *Nat. Med.* 2015. T. 21. № 12. C. 1502–1507.
- Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. // *Retrovirology.* 2005. T. 2. C. 16.
- Telesnitsky A., Goff S. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 1997.
- Terwilliger E.F., Cohen E.A., Lu Y.C., Sodroski J.G., Haseltine W.A. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. T. 86. № 13. C. 5163–7.
- Tokarev A., Suarez M., Kwan W., Fitzpatrick K., Singh R., Guatelli J. Stimulation of NF- B Activity by the HIV Restriction Factor BST2 // *J. Virol.* 2013. T. 87. № 4. C. 2046–2057.
- Tol S. van, Hage A., Giraldo M., Bharaj P., Rajsbaum R. The TRIMendous Role of TRIMs in Virus–Host Interactions // *Vaccines.* 2017. T. 5. № 3. C. 23.
- Turrini F., Marelli S., Kajaste-Rudnitski A., Lusic M., Lint C. Van, Das A.T., Harwig A., Berkhout B., Vicenzi E. HIV-1 transcriptional silencing caused by TRIM22 inhibition of Sp1 binding to the viral promoter. // *Retrovirology.* 2015. T. 12. № 1. C. 104.
- Uchil P.D., Quinlan B.D., Chan W.-T., Luna J.M., Mothes W. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. // *PLoS Pathog.* 2008. T. 4. № 2. C. e16.

- Uchil P.D., Hinz A., Siegel S., Coenen-Stass A., Pertel T., Luban J., Mothes W. TRIM Protein-Mediated Regulation of Inflammatory and Innate Immune Signaling and Its Association with Antiretroviral Activity // *J. Virol.* 2013. T. 87. № 1. C. 257–272.
- Usami Y., Wu Y., Göttlinger H.G. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. // *Nature.* 2015. T. 526. № 7572. C. 218–23.
- Vallari A1, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, Mbanya D, Kaptué L, Ndembi N, Gürtler L, Devare S, Brennan CA. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. // *J. Virol.* 2011. T. 85. № 3. C. 1403–7.
- Vallari A., Bodelle P., Ngansop C., al. et, Simon F. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: prevalence continues to be low // *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010. T. 26. № 9806. C. 109–115.
- Vasiliver-Shamis G, Tuen M, Wu TW, Starr T, Cameron TO, Thomson R, Kaur G, Liu J, Visciano ML, Li H, Kumar R, Ansari R, Han DP, Cho MW, Dustin ML, Hioe CE. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 induces a stop signal and virological synapse formation in noninfected CD4+ T cells. // *J. Virol.* 2008. T. 82. № 19. C. 9445–57.
- Venkatesh S., Bieniasz P.D. Mechanism of HIV-1 virion entrapment by tetherin. // *PLoS Pathog.* 2013. T. 9. № 7. C. e1003483.
- Verdonck K., González E., Dooren S. Van, Vandamme A., Vanham G., Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1 : recent knowledge about an ancient infection // *Lancet Infect Dis.* 2007. T. 7. № 4. C. 266-81
- Versteeg GA, Rajsbaum R, Sánchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, Inn KS, Fernandez-Sesma A, Jung J, García-Sastre A. The E3-Ligase TRIM Family of Proteins Regulates Signaling Pathways Triggered by Innate Immune Pattern-Recognition Receptors // *Immunity.* 2013. T. 38. № 2. C. 384–398.
- Versteeg G.A., Benke S., García-Sastre A., Rajsbaum R. InTRIMsic immunity: Positive and negative regulation of immune signaling by tripartite motif proteins // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. T. 25. № 5. C. 563–576.
- Vodicka M.A., Koepp D.M., Silver P.A., Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. // *Genes Dev.* 1998. T. 12. № 2. C. 175–85.
- Wagner JM, Christensen DE, Bhattacharya A, Dawidziak DM, Roganowicz MD, Wan Y,

- Pumroy RA, Demeler B, Ivanov DN, Ganser-Pornillos BK, Sundquist WI, Pornillos O. General Model for Retroviral Capsid Pattern Recognition by TRIM5 Proteins. // *J. Virol.* 2018. T. 92. № 4. C. JVI.01563-17.
- Wei P., Garber M.E., Fang S.M., Fischer W.H., Jones K.A. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. // *Cell.* 1998. T. 92. № 4. C. 451–62.
- Wei W., Guo H., Han X., Liu X., Zhou X., Zhang W., Yu X.-F. A novel DCAF1-binding motif required for Vpx-mediated degradation of nuclear SAMHD1 and Vpr-induced G2 arrest // *Cell. Microbiol.* 2012. T. 14. № 11. C. 1745–1756.
- Wei W., Guo H., Ma M., Markham R., Yu X.-F. Accumulation of MxB/Mx2-resistant HIV-1 Capsid Variants During Expansion of the HIV-1 Epidemic in Human Populations. // *EBioMedicine.* 2016. T. 8. C. 230–236.
- Willey R.L., Maldarelli F., Martin M.A., Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. // *J. Virol.* 1992a. T. 66. № 1. C. 226–34.
- Willey R.L., Maldarelli F., Martin M.A., Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. // *J. Virol.* 1992b. T. 66. № 12. C. 7193–200.
- Yan J, Kaur S, DeLucia M, Hao C, Mehrens J, Wang C, Golczak M, Palczewski K, Gronenborn AM, Ahn J, Skowronski J. Tetramerization of SAMHD1 Is Required for Biological Activity and Inhibition of HIV Infection // *J. Biol. Chem.* 2013. T. 288. № 15. C. 10406–10417.
- Yap M.W., Nisole S., Stoye J.P. A Single Amino Acid Change in the SPRY Domain of Human Trim5 $\alpha$  Leads to HIV-1 Restriction // *Curr. Biol.* 2005. T. 15. № 1. C. 73–78.
- Yu Q., König R., Pillai S., Chiles K., Kearney M., Palmer S., Richman D., Coffin J.M., Landau N.R. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. T. 11. № 5. C. 435–42.
- Yu X.X.-F., Yu Y., Liu B., Luo K., Kong W., Mao P., Yu X.X.-F. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. // *Science.* 2003. T. 302. № 5647. C. 1056–60.
- Yuan T., Yao W., Huang F., Sun B., Yang R. The Human Antiviral Factor TRIM11 Is under the Regulation of HIV-1 Vpr // *PLoS One.* 2014. T. 9. № 8. C. e104269.

Yudina Z, Roa A, Johnson R, Biris N1, de Souza Aranha Vieira DA, Tsiperson V, Reszka N, Taylor AB, Hart PJ, Demeler B, Diaz-Griffero F, Ivanov DN. RING Dimerization Links Higher-Order Assembly of TRIM5 $\alpha$  to Synthesis of K63-Linked Polyubiquitin // Cell Rep. 2015. T. 12. № 5. C. 788–797.

Zhang R., Mehla R., Chauhan A. Perturbation of Host Nuclear Membrane Component RanBP2 Impairs the Nuclear Import of Human Immunodeficiency Virus -1 Preintegration Complex (DNA) // PLoS One. 2010. T. 5. № 12. C. e15620.

Zhang X, Zhou T, Yang J, Lin Y, Shi J, Zhang X, Frabutt DA, Zeng X, Li S, Venta PJ, Zheng YH. Identification of SERINC5-001 as the Predominant Spliced Isoform for HIV-1 Restriction. // J. Virol. 2017. T. 91. № 10.

Zhong P., Agosto L.M., Ilinskaya A., Dorjbal B., Truong R., Derse D., Uchil P.D., Heidecker G., Mothes W. Cell-to-cell transmission can overcome multiple donor and target cell barriers imposed on cell-free HIV. // PLoS One. 2013. T. 8. № 1. C. e53138.

Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ, Espeseth AS. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. // Cell Host Microbe. 2008. T. 4. № 5. C. 495–504.

Zeng Y., Wagner E.J., Cullen B.R. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. // Mol. Cell. 2002. T. 9. № 6. C. 1327–33.

Список литературы включает 238 источников.