

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Зотова (Шунаева) Анастасия Андреевна
Факторы рестрикции и репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 в условиях
межклеточной трансмиссии

03.03.03 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в группе клеточных и генных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научные руководители:

Мазуров Дмитрий Вячеславович,
кандидат медицинских наук.

Филатов Александр Васильевич, доктор
биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Лазарев Василий Николаевич – доктор
биологических наук, доцент, заведующий
отделом клеточной биологии, заведующий
лабораторией генной инженерии Федерального
научно-клинического центра физико-химической
медицины Федерального медико-биологического
агентства.

Прилипов Алексей Геннадьевич – доктор
биологических наук, руководитель лаборатории
«Молекулярная генетика» Института
вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ
«ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава
России.

Анисенко Андрей Николаевич – кандидат
биологических наук, научный сотрудник кафедры
химии природных соединений химического
факультета Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится «30» сентября 2019 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/226385036/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1) относятся к семейству ретровирусов, инфицируют преимущественно CD4 Т-лимфоциты и являются патогенными для человека. Несмотря на существование целого ряда клеточных факторов рестрикции, противодействующих ВИЧ-1 на разных этапах его репликации, вирус, тем не менее, успешно реплицируется в клетках в связи с экспрессией вспомогательных вирусных белков. ВИЧ-1 может распространяться, инфицируя клетки свободными вирусными частицами (классический путь передачи), или при непосредственном контакте инфицированной клетки с клеткой-мишенью (D.S. Dimitrov и др., 1993). При этом, эффективность клеточной рестрикции зависит от способа передачи вируса. Характерной особенностью HTLV-1 является низкая репликационная активность вируса и трансмиссия исключительно через межклеточный контакт, о чем свидетельствует невозможность трансмиссии HTLV-1 инфекции вместе с сывороткой крови больных (A. Gessain, O. Cassar, 2012). Взаимоотношения ретровирусов человека и факторов рестрикции остаются сложными и не до конца изученными. Так, по-прежнему открытым остается вопрос о роли фактора рестрикции BST-2 в межклеточной передаче ВИЧ-1. 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). Понимание того, как клетка отвечает на проникновение ВИЧ-1 и HTLV-1 и какие клеточные белки так или иначе участвуют в этом, может способствовать созданию лекарств, направленных на новые клеточные мишени. В данной работе описано создание усовершенствованных векторов для количественного измерения межклеточной инфекции ретровирусов человека, рассмотрены эффекты делеций вспомогательных белков ВИЧ-1, противодействующих факторам рестрикции, на репликацию вируса в разных условиях трансмиссии, показана роль фактора рестрикции BST-2 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.

Цели и задачи работы

Цель работы:

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.

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.

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.

Научная новизна

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 GFPt 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 ВИЧ-1 и HTLV-1, роль которых в биологии данного вируса ранее не была установлена.

Теоретическая и практическая ценность

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 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 могут служить основой для дальнейших многочисленных исследований в области взаимодействия клеток хозяина с ретровирусом, а также предоставляют потенциальную возможность для описания новых интересных молекулярных мишеней для антиретровирусной терапии.

Личный вклад автора

Результаты данной 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 и апробация результатов

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.

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.

Использованные в работе методы исследования, проведенные расчеты и статистическая обработка данных являются общепризнанными и корректными, что позволяет говорить о достоверности представленных научных результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 238 источников. Работа изложена на 132 страницах, содержит 41 рисунок и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения о патогенных ретровирусах – о вирусе иммунодефицита человека и о Т-лимфотропном вирусе человека первого типа. Представлены известные на данный момент клеточные факторы рестрикции и репликации и механизмы противодействия вирусов клеточной защите. Показана значимость способа передачи вируса от клетки к клетке для эффективности борьбы с ретровирусной инфекцией. Представлены способы выявления новых факторов рестрикции и репликации, в том числе, приведены сведения о библиотеке нокаутов GeCKO, применявшейся в скрининге факторов репликации в данной работе.

Материалы и методы

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. Анализ данных глубокого секвенирования проводили с помощью программного обеспечения MAGeCK и нескольких самостоятельно написанных программ на языке программирования Python.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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) позволяли 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.

На первом этапе были сконструированы векторы на основе флуоресцентных белков GFPt и RFPt. Трансдукция клеток НЕК 293Т данными векторами показала, что уровень экспрессии репортерных белков варьировал в зависимости от используемой генетической конструкции репортера. В процессе анализа вторичной структуры РНК интрон-содержащих репортерных векторов была выявлена следующая закономерность: чем меньше неспаренных нуклеотидов в области сайтов сплайс-донора и сплайс-акцептора, тем выше уровень трансдукции гена-репортера. Опираясь на данную закономерность, были сконструированы новые репортерные векторы inGFPt и inmCherry с наиболее удачным расположением интрона в гене-репортере. Полученные конструкции исследовали в инфекционном тесте на клетках НЕК 293Т, эффективность трансдукции сравнивали с таковой у векторов inYFP и inRFPt-2 (оптимизированный вектор второй модификации обладал сравнимыми с RFPt характеристиками в связи с отсутствием оптимального сайта вставки интрона). 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 1А

и 1Б, соответственно. 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.

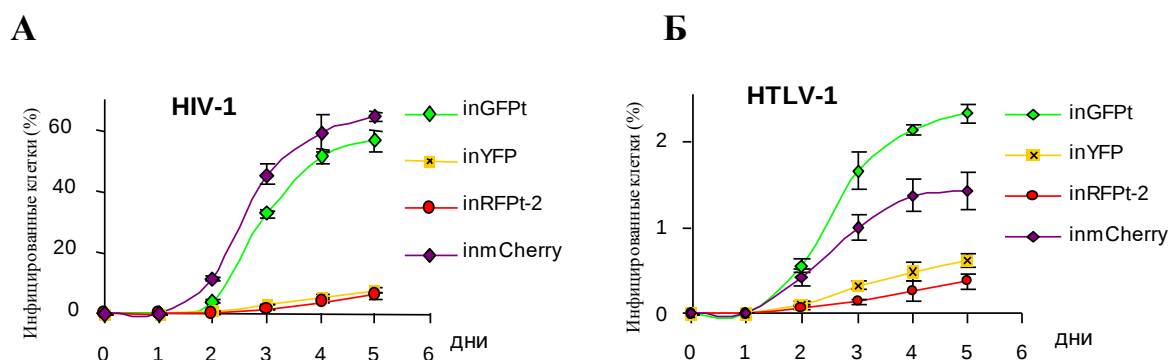


Рисунок 1 – Кинетические кривые экспрессии репортерных конструкций в клетках НЕК 293Т после инфекции псевдовирусами ВИЧ-1 (А) и HTLV-1 (Б) в тесте одноэтапной трансфекции/инфекции. Количественная оценка уровня инфекции проведена методом проточной цитометрии. Указаны средние значения и стандартные отклонения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

Мы предположили, что уровень интрон-содержащей РНК в вирусных частицах дополнительно может быть снижен за счет механизма РНК-интерференции при экспрессии интрон-специфичных shRNA. Мы получили конструкции, содержащие shRNA, которые были нацелены на интрон начиная с позиций 79 и 330. Мы клонировали miR30-shRNA (интрон-специфичные shRNA, а также контрольную – к белку Р1 вируса RSV, в контексте последовательности микроРНК miR30) в репортерный вектор ВИЧ-1 inGFpT, используя рестрикционный сайт Xba I в области интрона (рисунок 2А). Было получено две группы векторов: первая содержала miR30-shRNA в прямой (sense) ориентации, вторая – в противоположной (antisense).

Как показано на рисунке 2Б, 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. 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.

Как показано на рисунке 2В, уровень сплайсированной РНК репортерного вектора ВИЧ-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%). Данные результаты

соотносятся с количеством GFP⁺ клеток, измеренном в инфекционном тесте на клетках HEK 293T, трансфицированных соответствующими векторами (рисунок 2Б). Таким образом, miR-shR_330, специфичная к интрону в положении 330, наиболее эффективно снижает количество несплайсированной репортерной РНК в вирусных частицах, обогащая тем самым количество GFP⁺ клеток-мишеней при трансдукции вектором ВИЧ-1 inGFPt.

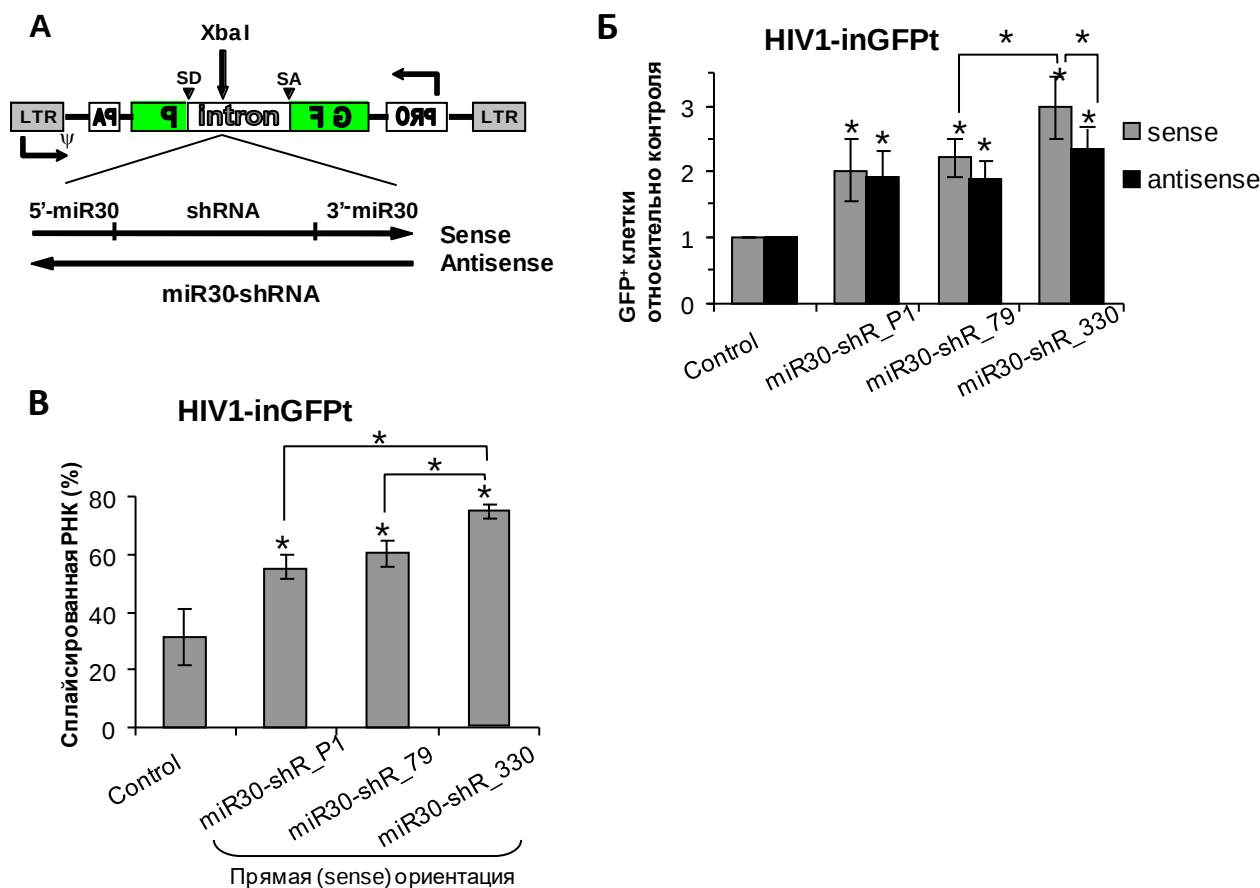


Рисунок 2 – Влияние вставки последовательности miR30-shRNA в интрон на уровень сплайсированной РНК в вирусных частицах и экспрессию репортера в клетках-мишенях. А. Схема вектора ВИЧ-1 inGFPt со вставкой miR30-shRNA. **Б.** Количество GFP⁺ клеток после трансдукции модифицированных векторов, нормированное 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 значения, значительно отличающиеся от контроля значения ($p < 0.05$), если нет дополнительных соединительных линий.

Последовательность miR-shR_330 была переклонирована в векторы inLuc, inmCherry и inRFpt-2 по сайту рестрикции XbaI. Были сконструированы модификации репортерных векторов для измерения как ВИЧ-1, так и HTLV-1 инфекции. Клонированные в область интрона

последовательности miR30_shRNA330 обеспечивали увеличение уровня транскрипции и сплайсинга данных репортерных векторов по сравнению с немодифицированными векторами (рисунок 3).

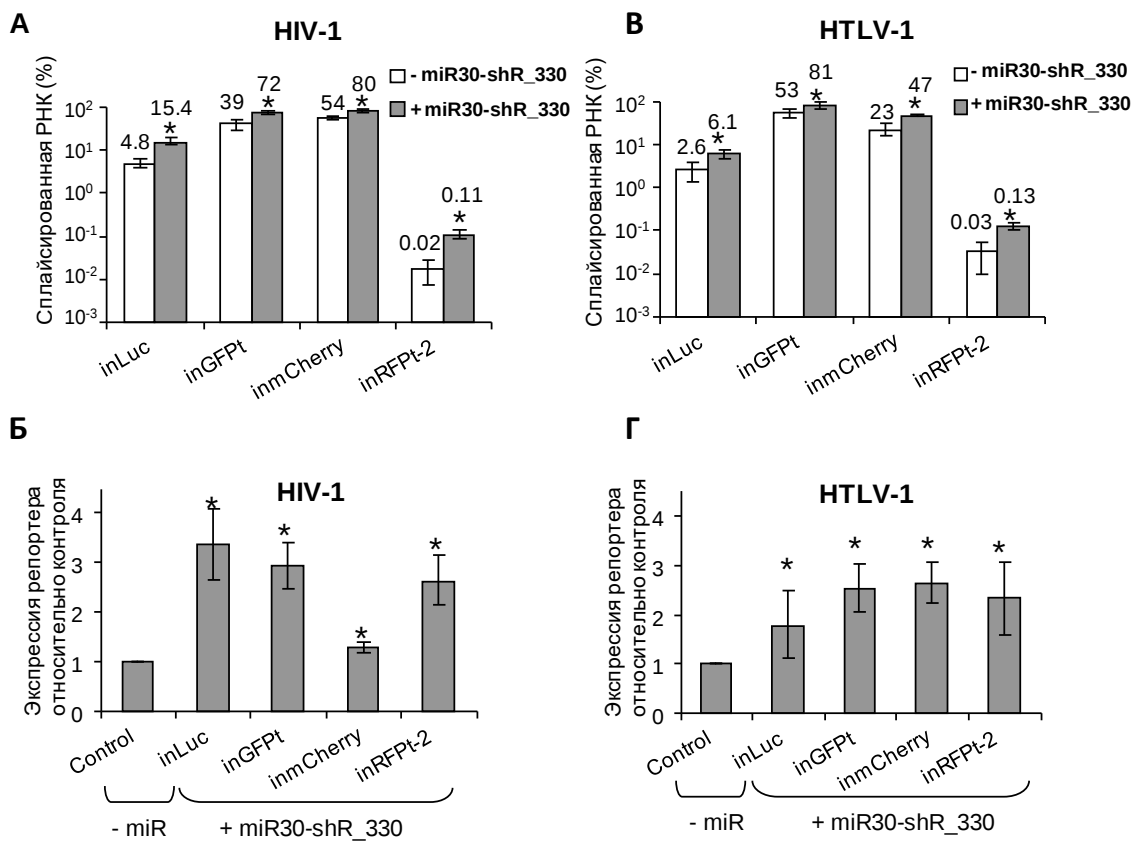


Рисунок 3 – Влияние модификации интрона последовательностью miR30-shRNA330 на уровень сплайсированной РНК, инкорпорированной в вирусные частицы, и на экспрессию различных репортеров в клетках-мишенях. Уровень сплайсинга репортерных РНК в ВИЧ-1 (А) и HTLV-1 (В) вирусных частицах. Б, Г – уровни экспрессии генов репортеров после трансдукции репортерных (для ВИЧ-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).

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 GFP и mCherry) и повышение количества клеток-мишеней, экспрессирующих репортерные белки.

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

Основной функцией вспомогательных 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.

Упаковочная плазида pCMV Δ8.2R кодирует геном ВИЧ-1 штамма NL4-3 за исключением полноразмерного белка оболочки Env. Мы вводили мутации во вспомогательные гены *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef* с образованием стоп-кодона. Чтобы подтвердить эффективность мутагенеза, клетки НЕК 293Т были трансфицированы полученными плазидами. Экспрессия вспомогательных белков была оценена методом Вестерн-блоттинга с сыворотками, специфичными к каждому из белков (рисунок 4А). Мы оценили также продукцию вируса клетками НЕК 293Т, трансфицированными упаковочным вектором без мутаций и с мутациями по каждому вспомогательному белку (рисунок 4Б). В связи с тем, что наблюдалось небольшое снижение 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 (уровень продукции белка Gag, измеренный методом ИФА).

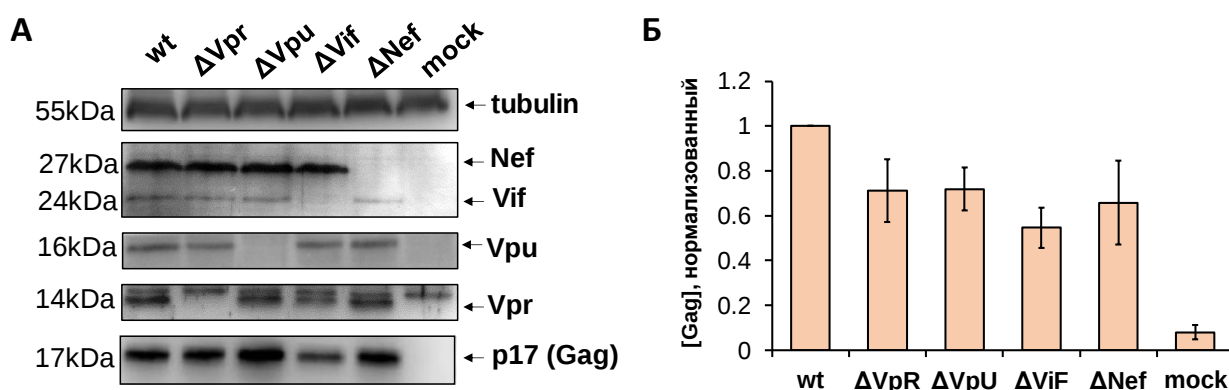


Рисунок 4 – Характеристика мутантных плазмид, экспрессирующих геном ВИЧ-1. А. Данные Вестерн-блота по экспрессии вспомогательных белков в НЕК 293Т клетках, трансфицированных вектором с мутацией в одном из генов *vif*, *vpr*, *vpu* и *nef*. **Б.** Данные ИФА по экспрессии вирусного белка Gag в супернатантах от трансфицированных НЕК 293Т клеток вирусным вектором pCMV Δ8.2R с мутациями и без мутаций (wt).

Мы поставили перед собой цель измерить репликацию вируса с мутациями по генам вспомогательных белков в разных условиях: при инфекции свободными вирусными частицами и при сокультивировании клеток-продуцентов и клеток-мишеней. Кроме того, интересно было сравнить инфекцию на разных типах клеток – на нелимфоидной линии НЕК 293Т/CD4/X4 и на лимфоидных линиях Jurkat и Raji/CD4.

Для измерения инфекции на нелимфоидной клеточной линии НЕК 293Т/CD4/X4 (клетки экспрессировали рецепторы CD4 и CXCR4) использовали интрон-регулируемые репортерные векторы последней модификации на основе люциферазы (pUCHR 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. Трансфицированные клетки производили вирусоподобные частицы (VLPs), которые инфицировали соседние (нетрансфицированные) клетки, что детектировалось по уровню активности люциферазы (RLU). 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, посаженным в отдельных лунках. Последние через 48 ч. лизировали для измерения активности люциферазы (рисунок 5А). Как показано на рисунке 5, 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 Vpr-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 Vpr-дефектного вируса. 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. Из полученных данных можно сделать вывод, что за исключением Nef-дефектного вируса, мутация в генах вспомогательных белков ВИЧ-1 не приводит к сильному

снижению уровня репликации вируса. Это можно объяснить тем, что многие из известных факторов рестрикции ВИЧ-1 экспрессируются в клеточной линии НЕК 293Т на более низком уровне, чем в лимфоидных клеточных линиях.

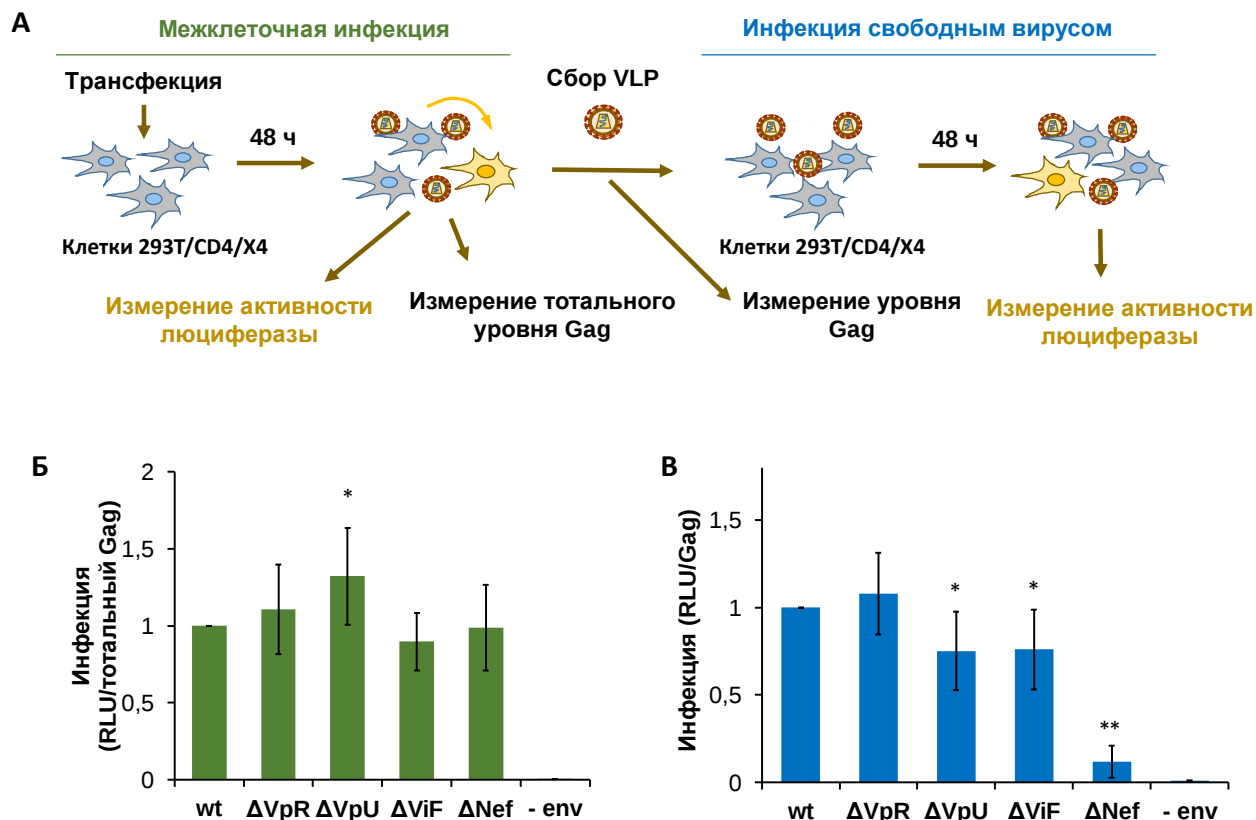


Рисунок 5 – Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в аксессуарных генах ВИЧ-1 на клетках НЕК 293Т/CD4/X4: А – схема эксперимента по постановке межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, Б – межклеточная инфекция, В – инфекция свободным вирусом. * и **, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно.

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, рисунок 6А), 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, рисунок 6В).

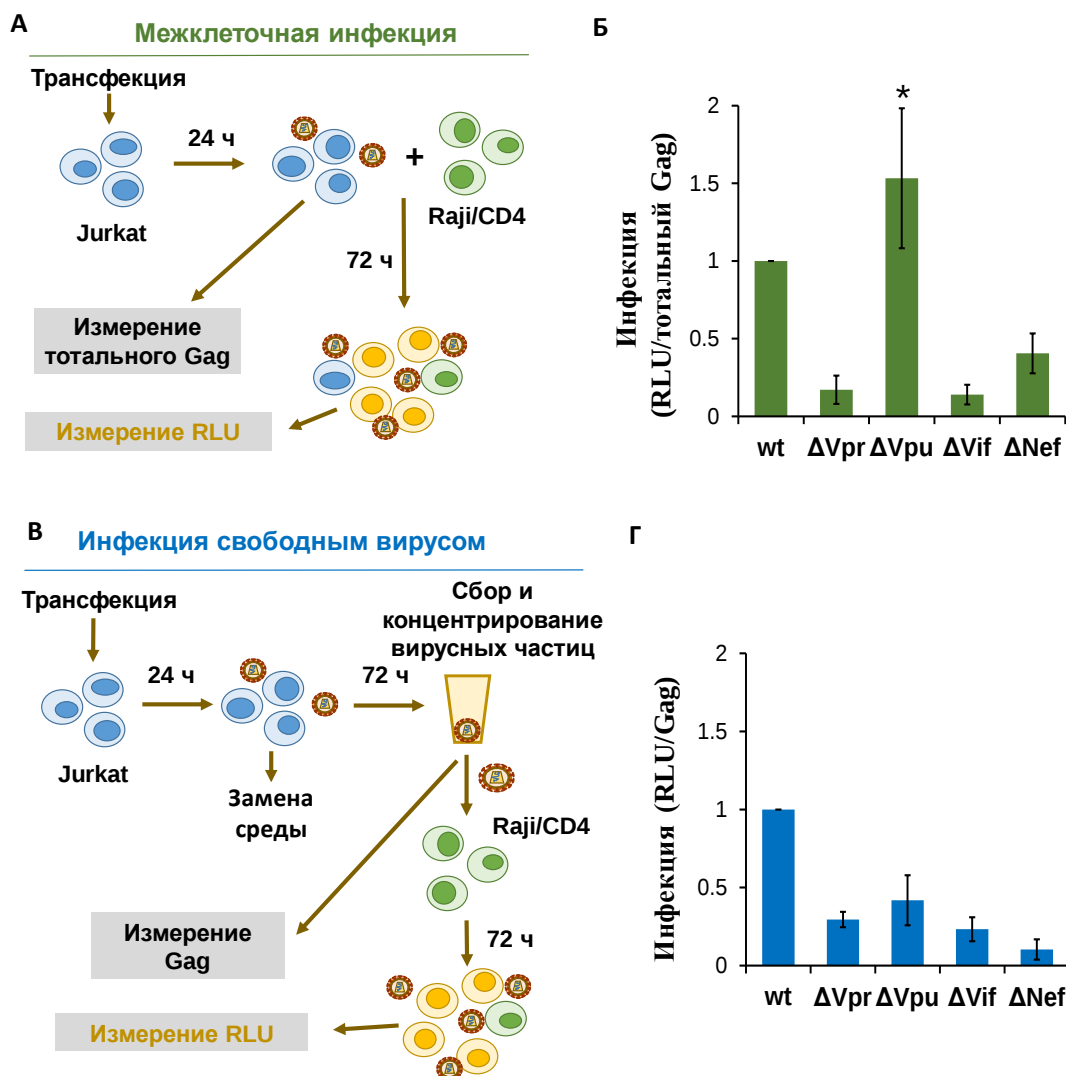


Рисунок 6 – Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в вспомогательных генах ВИЧ-1 на лимфоидных клетках: схема эксперимента по постановке межклеточной инфекции (А) и инфекции свободным вирусом (В), Б – межклеточная инфекция, Г – инфекция свободным вирусом. Каждое значение для vpr/vif/nef на рисунке Б и для vpr/vpu/vif/nef на рисунке Г значительно отличается от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.01$. *, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.05$.

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 (рисунок 6Г), тогда как в условиях сокультивирования клеток снижение уровня инфекции не было столь сильным (в 2 раза) (рисунок 6Б). 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.

Интересной задачей оказалось изучение влияния делеции в гене *vpr/vpu/vif/nef* на уровень множественной инфекции в лимфоидных культурах клеток. В качестве репортерной конструкции использовались векторы inGFPt и inmCherry, трансфицированные совместно. 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 7 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. Для оценки множественности инфекции (MOI, multiplicity of infection) подсчитывали отношение двойных позитивных клеток (GFP+ mCherry+) к одиночным позитивным (GFP+). Данный показатель не менялся для Vpr-/Vif-/Nef-дефектного ВИЧ-1 в сравнении с контролем, тогда как делеция Vpu приводила к увеличению количества двойных позитивных клеток, т.е. клеток, инфицированных как минимум двумя вирусами одновременно.

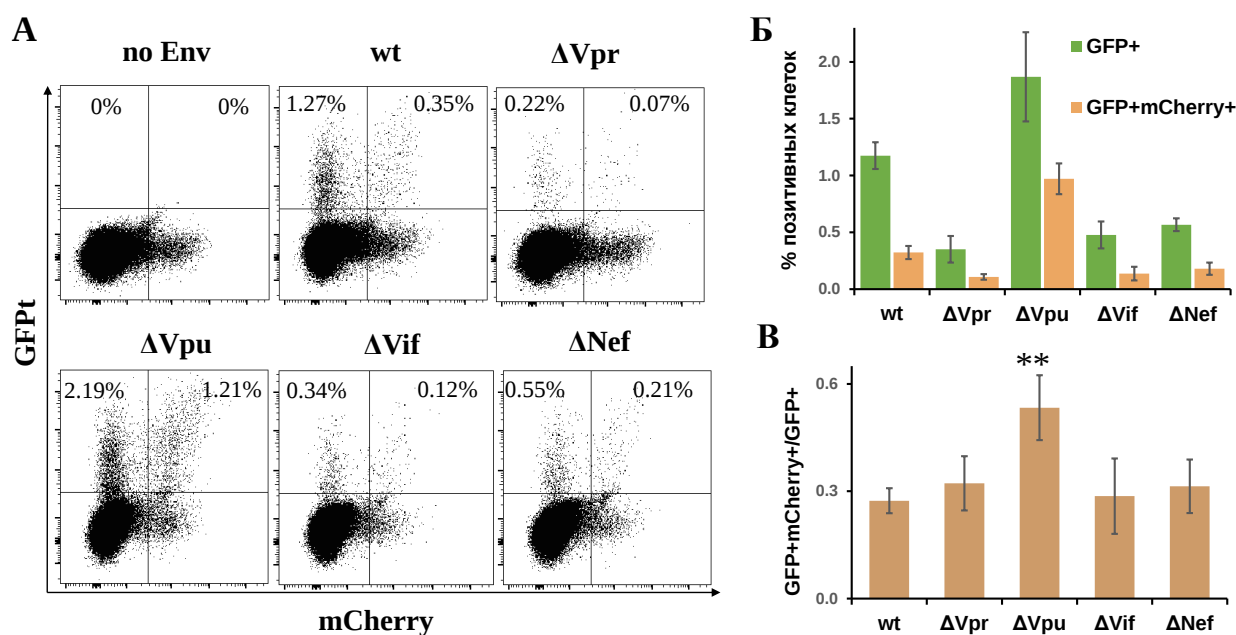


Рисунок 7 – Измерение уровня репликации вируса дикого типа и с мутациями в вспомогательных генах ВИЧ-1 при помощи репортерных векторов на основе флуоресцентных белков GFPt и mCherry. А. Типичные графики вида DotPlot, отображающие клетки с флуоресценцией в каналах GFPt и mCherry спустя три дня культивирования. **Б.** Количественный анализ одиночных позитивных клеток (GFP+) и двойных позитивных клеток (GFP+ mCherry+). **В** Отношение GFP+mCherry+/GFP+ клеток как показатель MOI. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD трех независимых экспериментов. Каждое значение для *vpr/vpu/vif/nef* на рисунке Б отличается от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.01$. **, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.01$.

Нокаут по гену BST2 нивелирует увеличение межклеточной инфекции Vpu-дефектного ВИЧ-1 в клетках

Принимая во внимание тот факт, что вспомогательный белок Vpu вируса противодействует клеточному фактору рестрикции BST2, мы решили сравнить инфекцию Vpu-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. Мы оценили уровень репликации вирусных частиц дикого типа и с мутацией в гене *vpu*. 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 Vpu-дефектным вирусом, мы проводили дополнительные инфекционные тесты на клетках Jurkat BST2 KO с одновременным восстановлением экспрессии BST2.

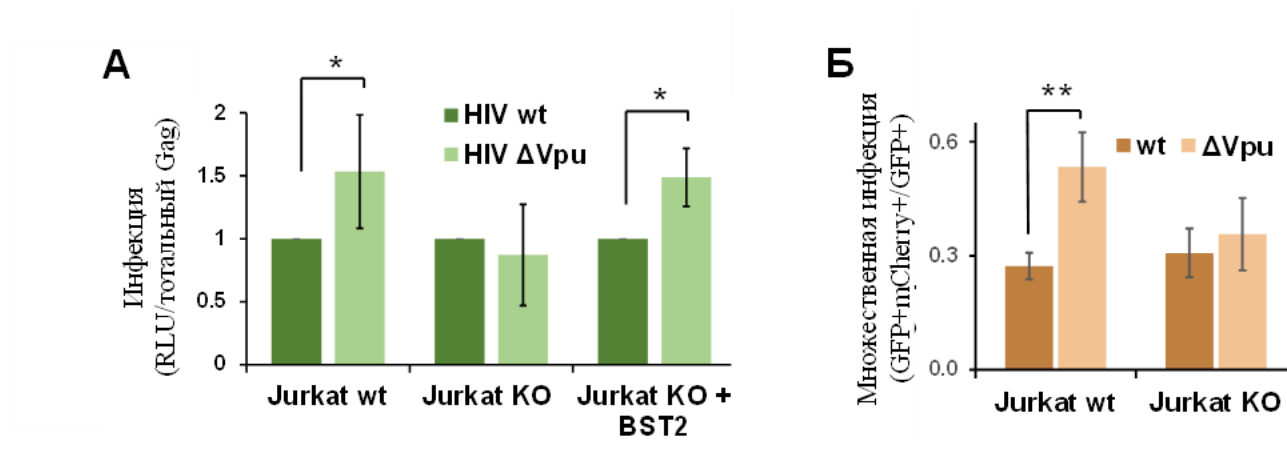


Рисунок 8 – Репликация вируса дикого типа и мутацией в гене Vpu в клетках дикого типа и нокаутных по BST2. А. Данные RLU нормализованы на тотальный уровень Gag в трансфицированных клетках и на уровень репликации ВИЧ-1 без мутаций. Б. Множественная инфекция ВИЧ-1 wt и Δ Vpu на клетках Jurkat дикого типа 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 $\pm$ SD. * и **, статистическое отличие от контроля (wt) на уровне значимости $p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно.

Как показано на рисунке 8А, инфекционная способность Vpu-дефектного вируса в нокаутных клетках снижалась до уровня репликации вируса дикого типа, 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. Кроме того, был исследован показатель множественной инфекции на клетках дикого типа и с

нокаутом по BST2. 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 (рисунок 8Б). В отсутствие Vpu клеточный фактор рестрикции BST2, как известно, удерживает частицы у поверхности клеток-продуцентов. Это, по-видимому, способствует более эффективному заражению клеток-мишеней, в том числе, несколькими вирусами одновременно, в случае их прямого контакта с клетками-продуцентами вируса.

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. На следующий день после трансфекции клетки переносили на покровные стекла, предварительно обработанные полилизинном, фиксировали, пермеабилизировали и красили на белок Gag вируса ВИЧ-1 или HTLV-1. Затем образцы анализировали на флуоресцентном деконволюционном микроскопе (рисунок 9).

Как видно из рисунка 9, вирусные частицы образуют агрегаты на поверхности клеток дикого типа, трансфицированных векторами, экспрессирующими геном HTLV-1 и Vpu-дефектного ВИЧ-1. 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 9Б,В: 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 (рисунки 6В, 7).

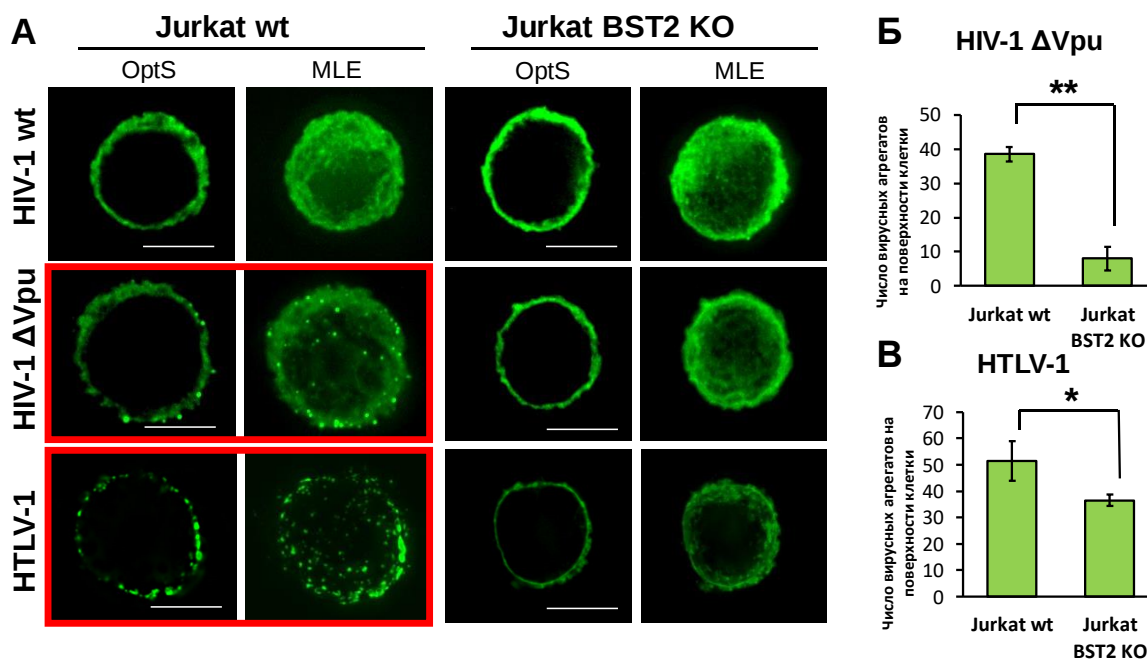


Рисунок 9 – Распределение вирусных частиц ВИЧ-1, Ври-дефектного ВИЧ-1 и HTLV-1 на поверхности Т-клеток. А. Иммунофлуоресцентная деконволюционная микроскопия клеток Jurkat и Jurkat BST2 KO, трансфицированных упаковочными плазмидами частиц ВИЧ-1, Ври-дефектного ВИЧ-1 и HTLV-1. Красными рамками обозначены 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 (MLE). **Б.** Подсчет вирусных агрегатов Ври-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.

Поиск факторов репликации HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO.

Одними из наиболее современных и эффективных методов поиска новых клеточных генов, вовлеченных в тот или иной процесс, являются полногеномные скрининги. Для изучения генов, вовлеченных в ВИЧ инфекцию, до последнего времени использовались только библиотеки интерферирующих РНК. В 2014 году О. Shalem с соавторами опубликовали описание разработанной на основе CRISPR-Cas9 библиотеки нокаутов GeCKO (О. Shalem и др., 2014). Библиотека содержит 108480 специфических последовательностей, нацеленных на 18080 генов человека.

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 РНК (gRNA). В результате трансдукции и последующей селекции пуромицином была получена клеточная линия Raji/CD4 с библиотекой нокаутов. Репрезентативность нокаутов генов в клетках

библиотеки была показана при анализе данных глубокого секвенирования. Клеточные библиотеки были также успешно использованы для идентификации антител с неизвестной специфичностью. Используя библиотеку нокаутов GeCKO на клеточной линии Raji/CD4 мы определили антигенную специфичность антитела BF4, полученного при иммунизации вирусными биопленками HTLV-1.

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 (рисунок 10).

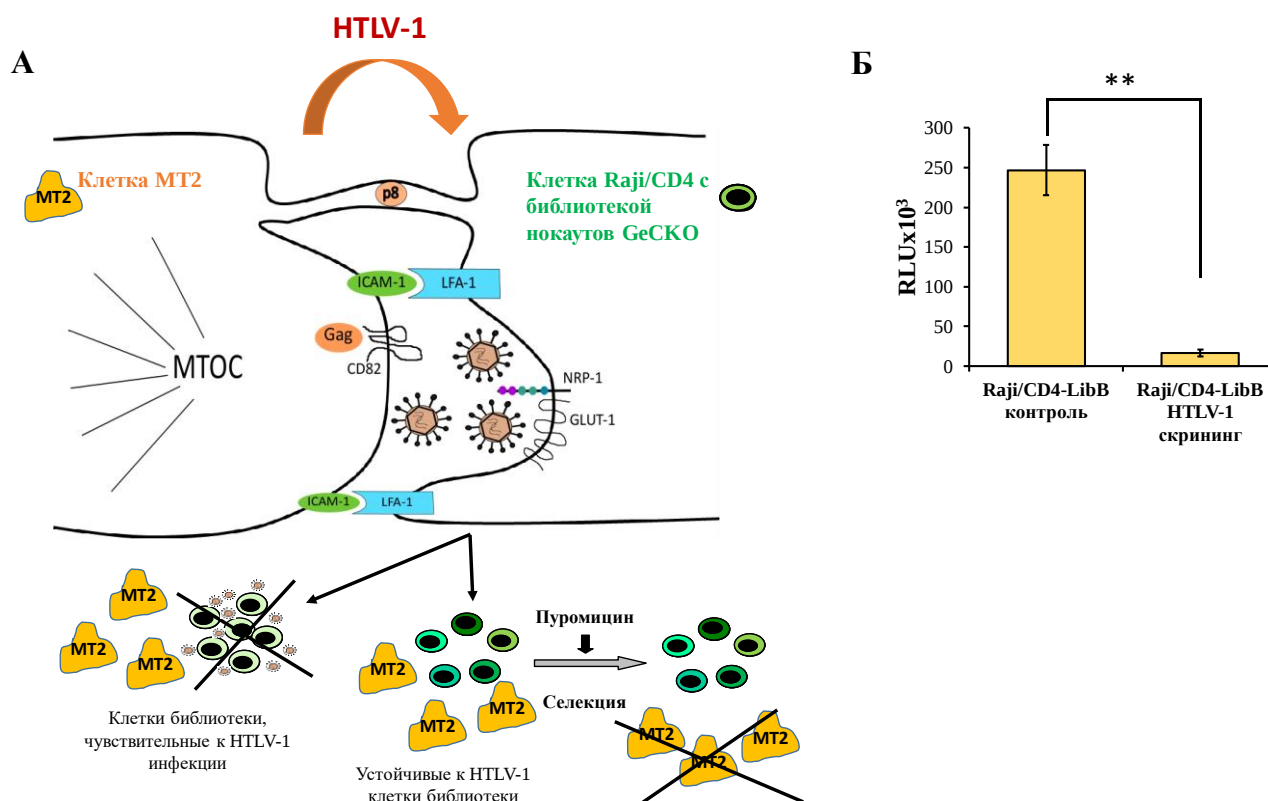


Рисунок 10 – Инфекционный тест на клетках библиотеки нокаутов GeCKO (А) и оценка чувствительности клеток Raji/CD4-LibB после теста к инфекции HTLV-1 (Б). Клетки с библиотекой нокаутов, прошедшие отбор в инфекционном тесте HTLV-1 (HTLV-1 скрининг), а также родительские клетки библиотеки нокаутов взяты 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 $p < 0.01$.

Продолжительность проводимого нами инфекционного теста составляла 2 недели, за этот срок подавляющее большинство зараженных клеток погибало вследствие токсического действия

белка Tax вируса HTLV-1. Для того, чтобы элиминировать MT2 клетки, после инфекционного теста культуры растили в присутствии пуромина, к которому клетки библиотеки устойчивы (рисунок 10А). В результате, оставались клетки Raji/CD4-LibB, предположительно устойчивые к инфекции HTLV-1. Было проведено два последовательных раунда инфекции. 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 (рисунок 10Б). 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 распределения 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 лентивирусной конструкции, интегрированной в геном. Пул амплифицированных гидовых РНК был секвенирован на приборе Illumina и проанализирован с помощью программного обеспечения MAGeCK: сравнивали количество прочтений для каждого гена в контроле и опыте. В итоге, был составлен ранжированный список генов, нокаутные популяции по которым обогатились в результате инфекционного теста.

Из полученного списка нас заинтересовали, прежде всего, гены *KPNA1* и *CD82* (рисунок 11А). На рисунке 11Б представлено количество прочтений трех гидовых РНК, соответствующих гену *KPNA1*: разница в прочтениях по сравнению 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, *KPNA1* взаимодействует с вирусными белками: с UL84 цитомегаловируса, VP24 вируса Эболы и Vpr ВИЧ-1 (Lischka et al., 2003, Reid et al., 2006, Popov et al., 1998). Однако роль *KPNA1* в репликации HTLV-1 на данный момент неизвестна. Мы получили клеточную линию НЕК 293Т с нокаутом по гену *KPNA1* с помощью разработанного нами метода SORTS (Surface Oligopeptide knock-in system for Rapid Target Selection). Метод позволяет с помощью клеточного сортера проводить быструю селекцию пула клеток, в которых произошел нокаут по генам, кодирующим внутриклеточные или секретируемые белки.

Предварительный инфекционный тест показал снижение уровня инфекции HTLV-1 на 30% в нокаутных по гену *KPNA1* клетках по сравнению с клетками дикого типа. По аналогии с первым скринингом было проведено два дополнительных – на клетках Raji/CD4 с библиотекой А и на клетках СЕМ с библиотекой В. В результате NGS анализа были выявлены гены, встречающиеся в трех независимых скринингах: 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. 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. Данные результаты указывают на то, что белки семейства импортинов, с большой вероятностью, важны в инфекции HTLV-1, что будет исследовано в дальнейшем.

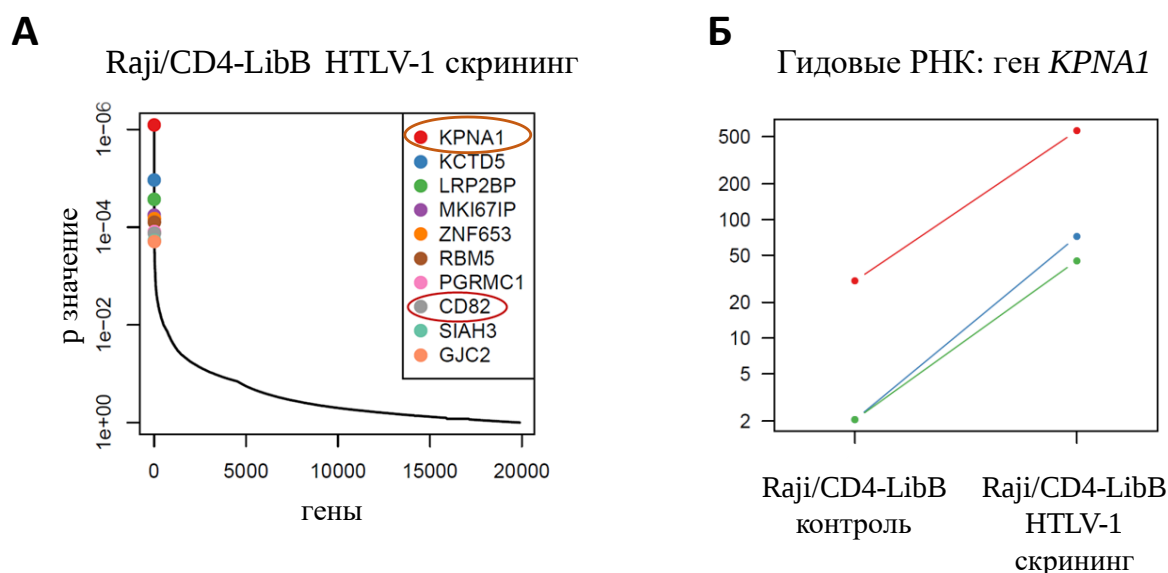


Рисунок 11 – Результаты скрининга факторов репликации HTLV-1 на клетках Raji/CD4. **А.** Распределение ранжированных генов после анализа секвенированных последовательностей gRNA. Показаны наиболее отличающиеся от контрольной библиотеки нокауты генов (хиты) в образце Raji/CD4 libB после скрининга. **Б.** 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).

Поиск факторов репликации ВИЧ-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO.

Скрининг-тест для поиска факторов репликации ВИЧ-1 проводили путем постановки инфекции свободными вирусными частицами (классический путь передачи инфекции). Коллеги из

Института вирусологии помогли нам в реализации данной задачи: клетки библиотеки были заражены вирусом ВИЧ-1 в дозе 0,5 МОІ (рисунок 12А). Уровень продукции вирусного белка Gag контролировался с помощью ИФА в нулевой точке, а также по прошествии 3 и 7 дней после заражения (рисунок 12Б).

Далее, из клеток выделялась геномная ДНК и готовились образцы для глубокого секвенирования. Мы провели сравнительный анализ таргетных 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.

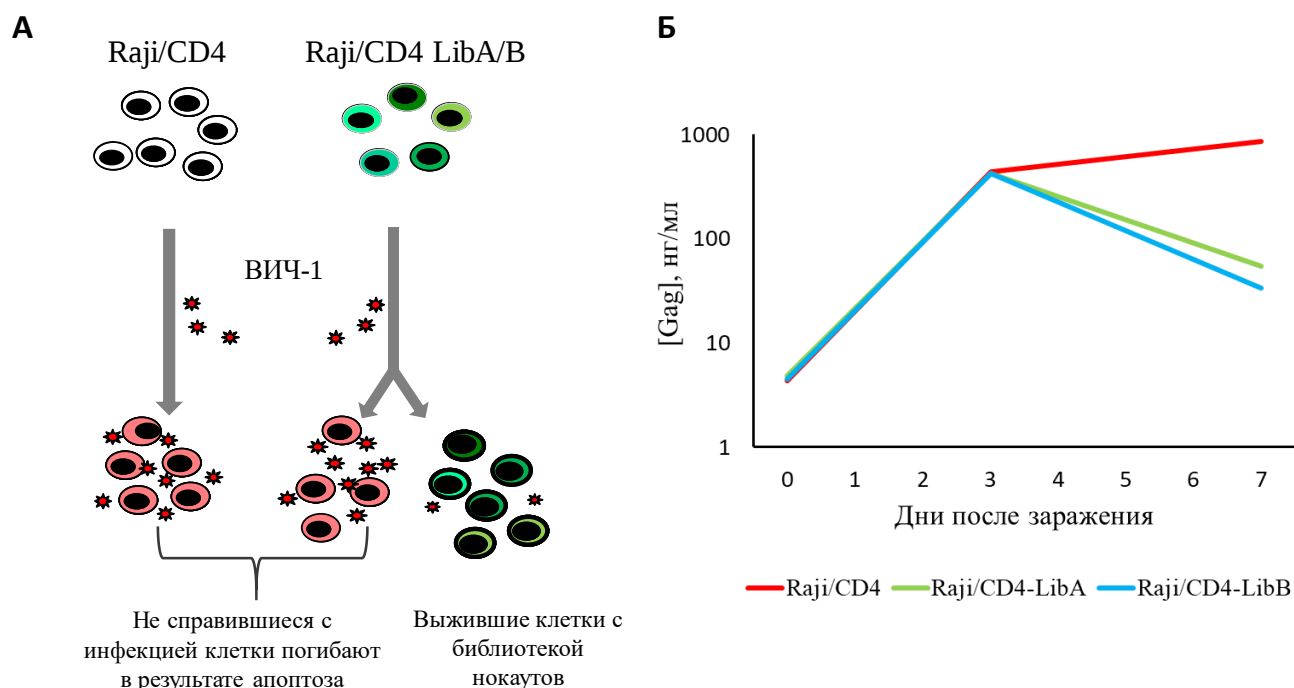


Рисунок 12 – Скрининг факторов репликации ВИЧ-1. А. Схема инфекционного теста ВИЧ-1 на клетках Raji/CD4. **Б.** ИФА анализ концентрации (типичные значения) вирусного Gag после заражения клеток Raji/CD4, Raji/CD4 LibA и Raji/CD4 LibB.

Как и раньше, нашей задачей было выявить гены-хиты, т.е. гены с наибольшим отклонением по встречаемости по сравнению с контролем. 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.

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 мышиной 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах Scopus, WoS

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. T. 89. № 20. С. 10591–601. ИФ 4,606.

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. T. 439. С. 8–14. ИФ 2,162.

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. T. 11. № 5. E390. ИФ 3,419.

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

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).