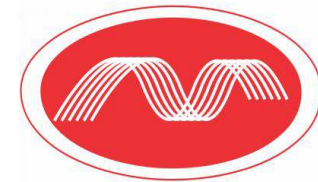


Исследования специфики и
множественности интеграционных
событий в геном клетки человека ВИЧ-1
для субтипов А6, В и CRF63_02А



Выполнила:

Нефедова Анастасия Александровна

Научное руководство:

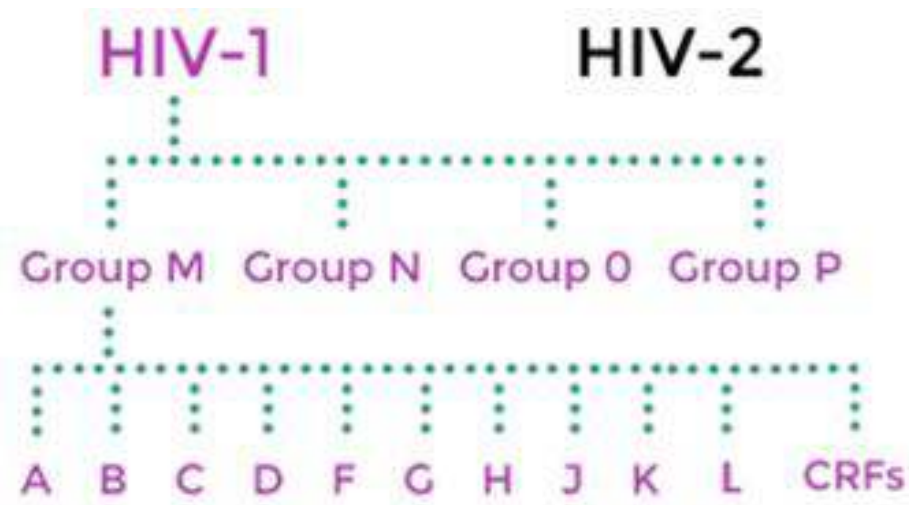
Гашникова Наталья Матвеевна, к.б.н.; зав.
отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Объект исследования

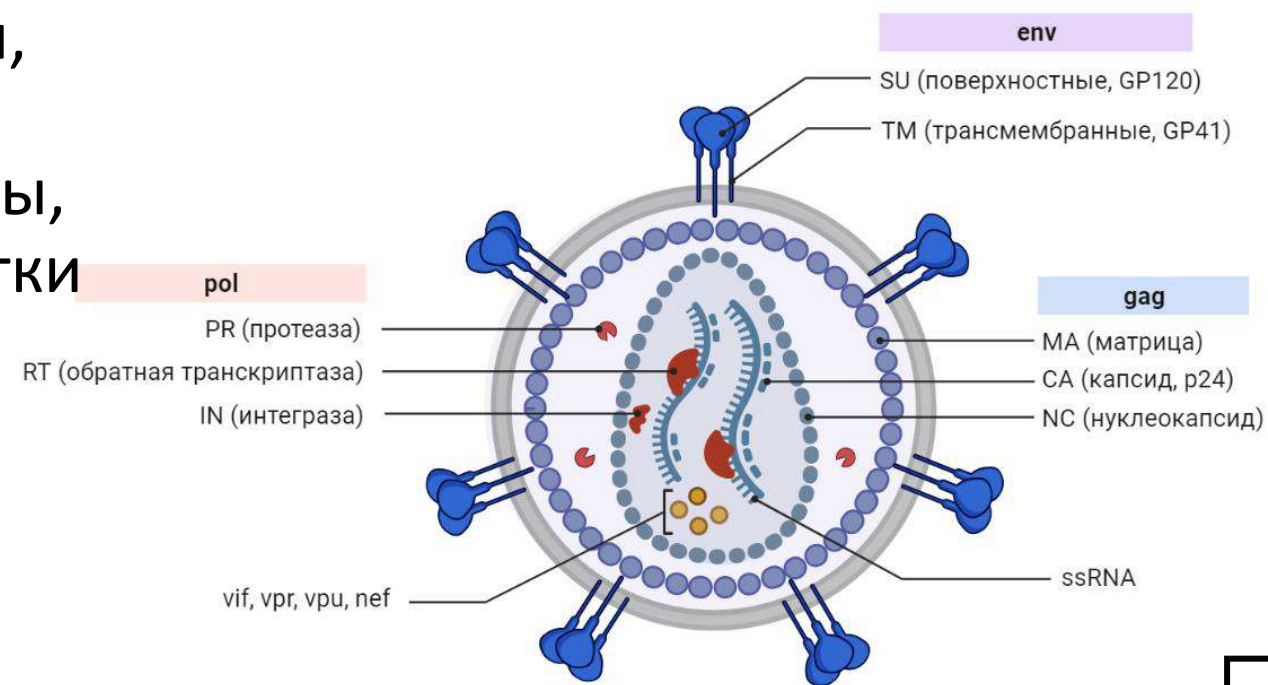
ВИЧ (вирус иммунодефицита человека):

Принадлежит к роду Lentivirus ,входит в семейство Retroviridae .

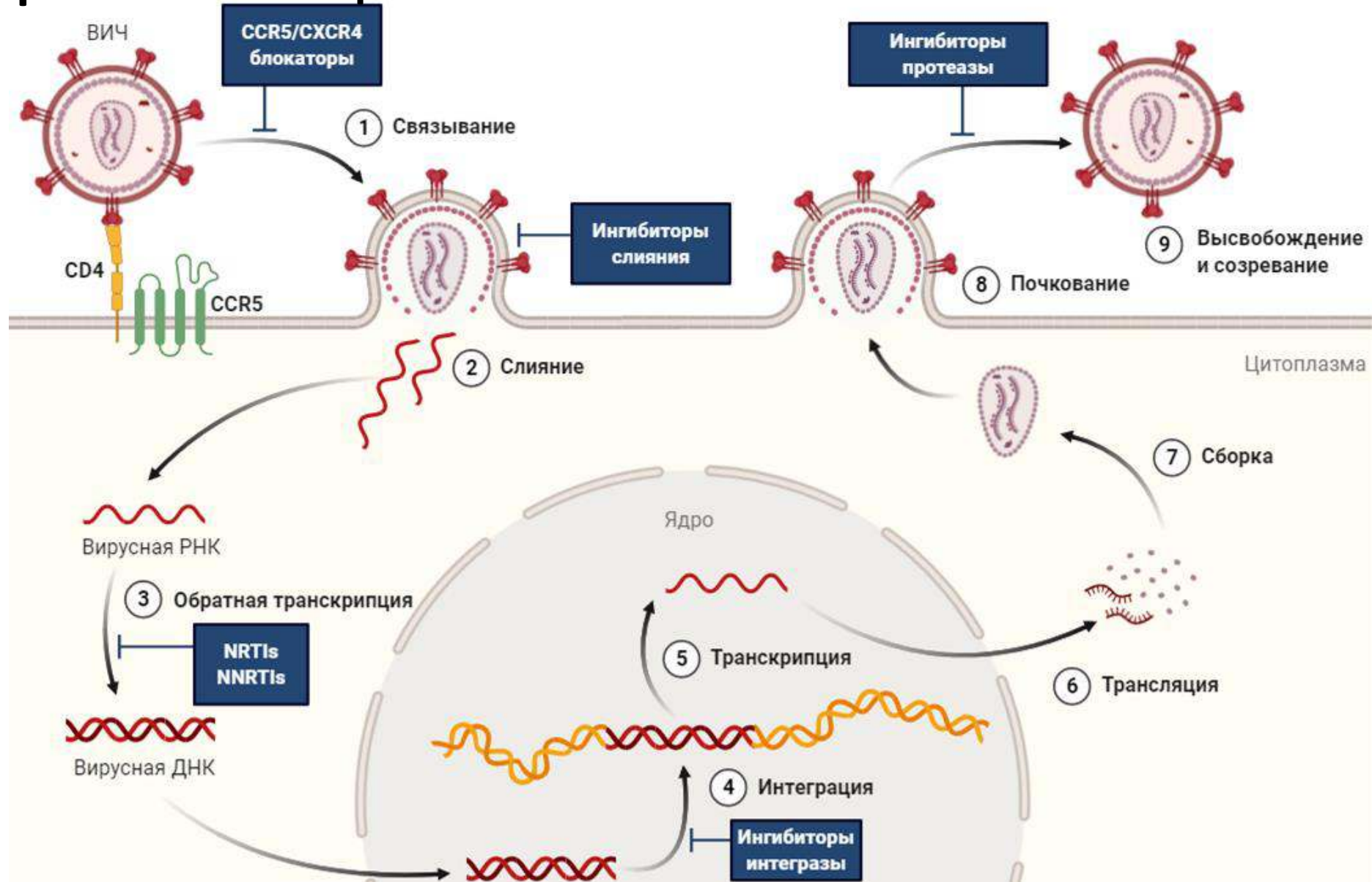
Поражает клетки иммунной системы, имеющие на своей поверхности рецепторы CD4: Т-хелперы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, клетки микроглии и т.д.



ВИЧ: типы и субтипы [2],[3].

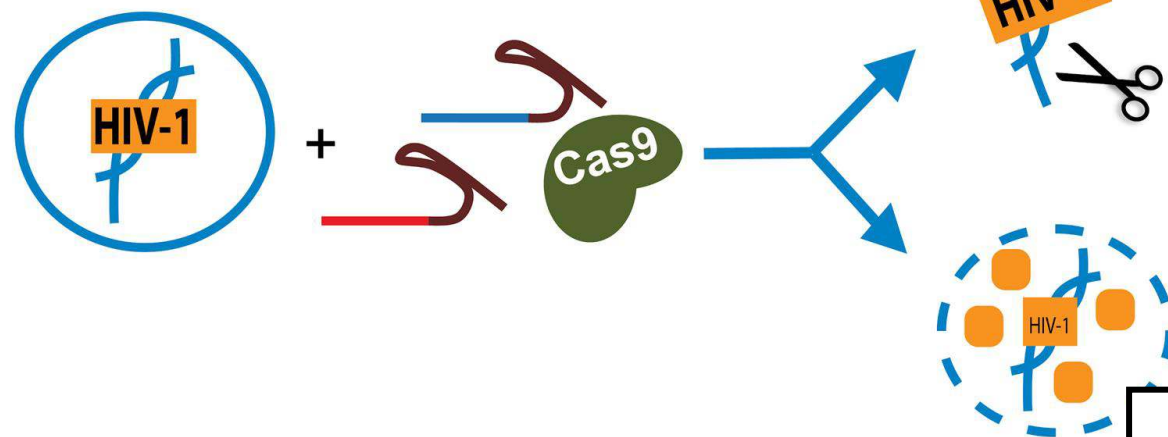


Цикл репликации ВИЧ



Проблемы применения CRISPR-Cas9

1. При разработке лекарства на основе CRISPR-Cas9, необходимо подбирать его к каждому из субтипов вируса.
2. Необходимо учитывать высокую гетерогенность вируса на уровне одного организма и выбирать одновременно несколько мишеней для CRISPR-Cas9 [5].
3. Так как CRISPR-Cas9 вносит двухцепочечные разрывы в клетку, ключевую роль в данном вопросе будет играть количество копий провируса в каждой клетке.



Актуальность

С момента своего открытия в начале 1980-х годов ВИЧ заразил более 75 миллионов человек во всем мире[6].

Число инфицированных в России к 31.12.2020 г. составило 1 492 998 человек.

Способность ВИЧ-1 интегрироваться в геном хозяина в качестве провируса позволяет вирусу избегать не только воздействия антиретровирусных препаратов, но и иммунного надзора хозяина[4].

На данный момент определение копийности встраивания провируса ВИЧ-1 в клетку человека применялось только для модельных хронически инфицированных клеточных линий.

Цели и задачи

Цель: Исследовать копийность и специфичность вставки провируса для разных субтипов ВИЧ-1.

1. Анализ генетической гетерогенности современной популяции ВИЧ-1. Выбор геновариантов вирусов для исследования.
2. Теоретическая проработка экспериментов по моделированию ВИЧ-инфекции с использованием штаммов ВИЧ-1.
3. Заражение чувствительных к ВИЧ клеток выбранными геновариантами ВИЧ-1, подбор условий культивации вируса, позволяющих выполнить корректную оценку копийности встраивания провирусной ДНК ВИЧ-1 в геном клетки человека для различных геновариантов ВИЧ-1.
4. Подтверждение качества и работоспособности синтезированных олигонуклеотидов для ddPCR с помощью ПЦР в режиме реального времени.
5. Определение копийности интеграции провирусов ВИЧ-1 на одну клетку человека при помощи digital drop PCR.

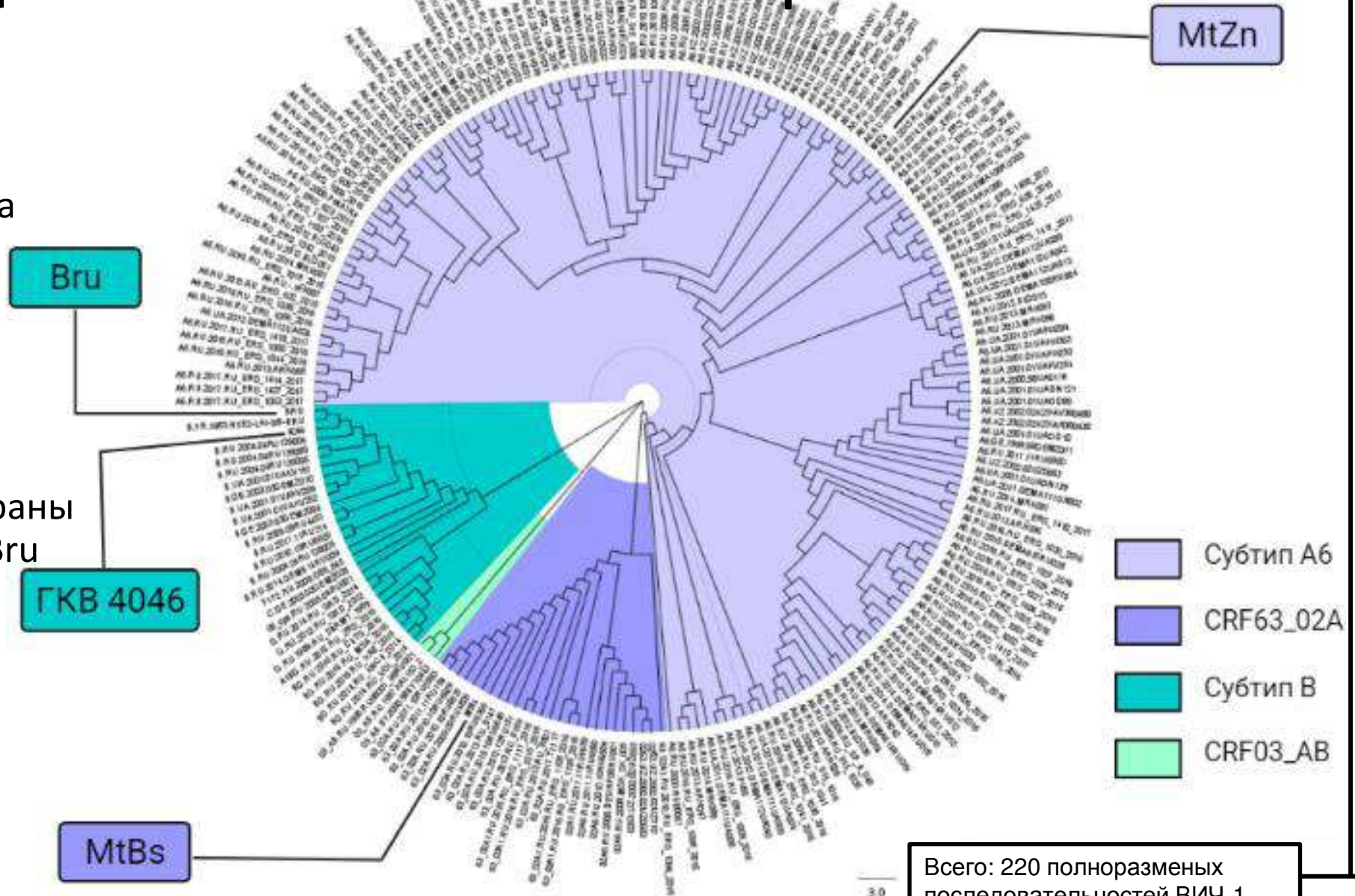
План эксперимента



Анализ представленности геновариантов ВИЧ-1 в России

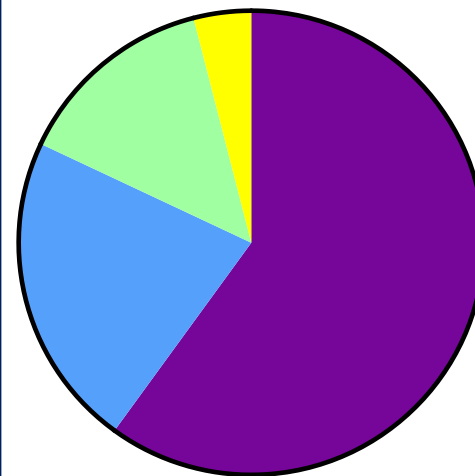
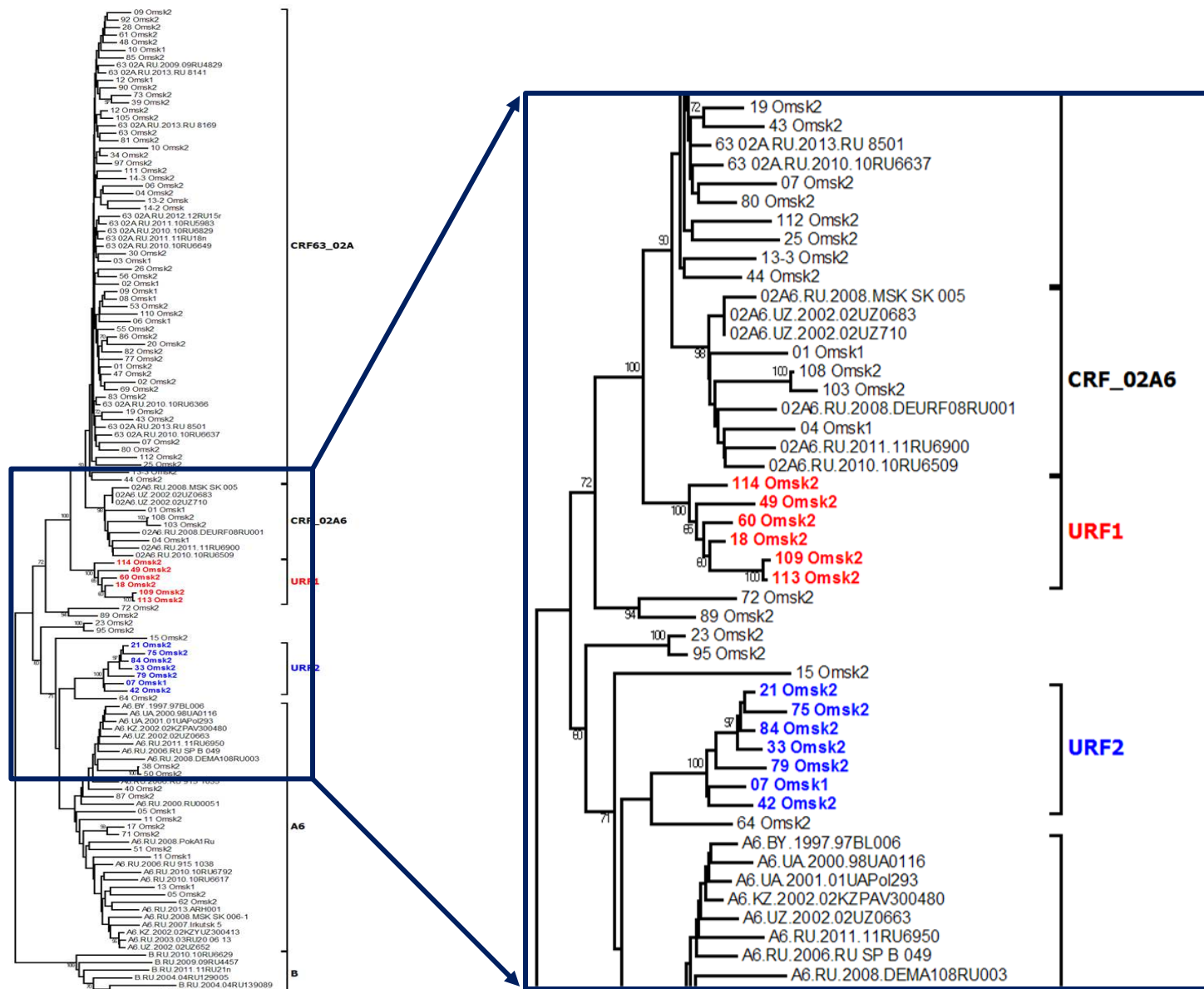
1. По результатам филогенетического анализа были выбраны следующие геноварианты ВИЧ-1 для эксперимента: А6, В и CRF63_02А.

2. Для последующих экспериментов были отобраны изоляты ВИЧ-1 MtZn (А6), Bru (В), ГKB 4046 (В) MtBs (CRF63_02А).



Всего: 220 полноразменных последовательностей ВИЧ-1

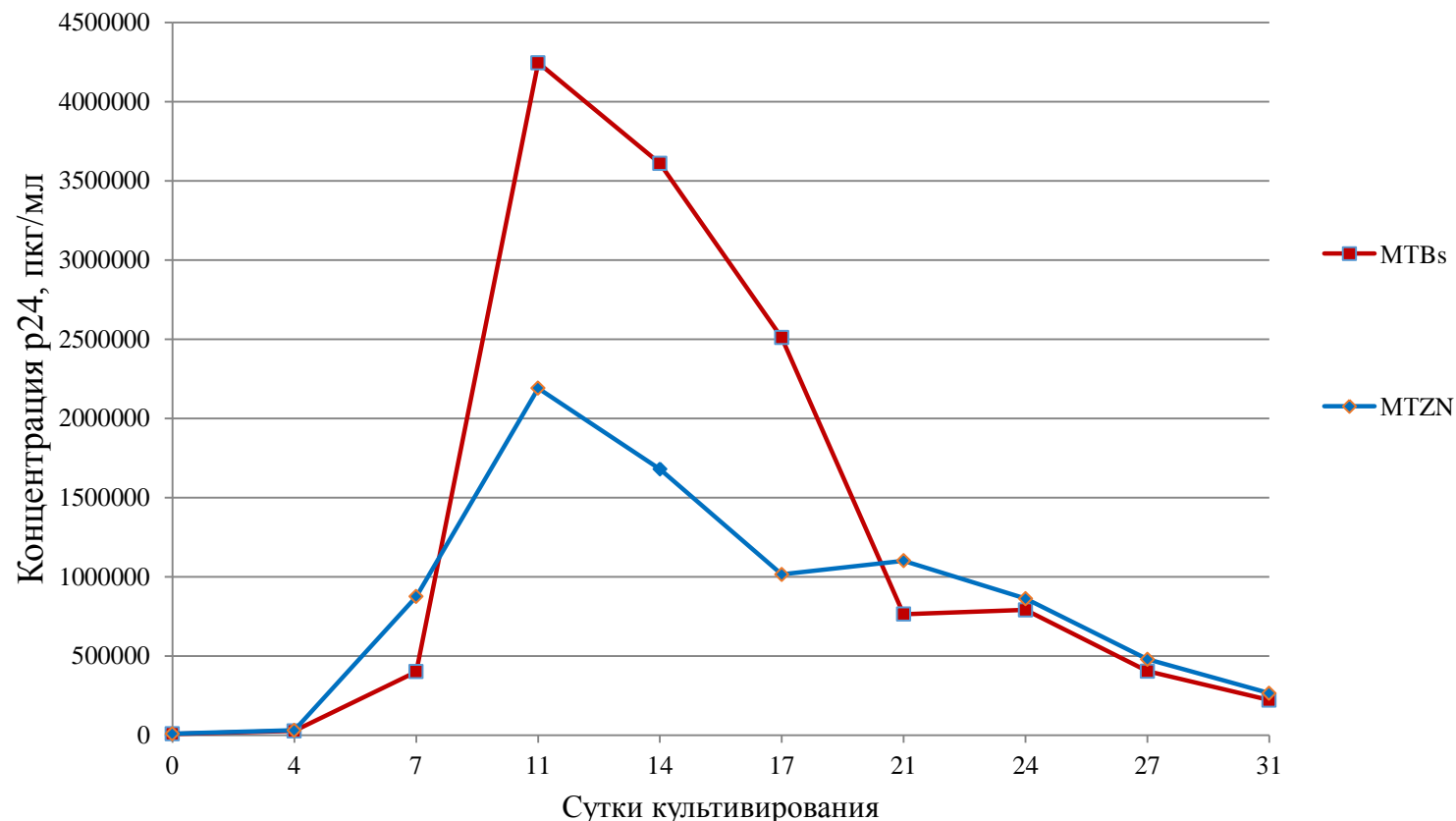
Анализ представленности геновариантов ВИЧ-1 для Омской области



- 60% CRF63_02A
- 22% URF
- 14% Субтип A6
- 4% CRF02_A

Всего: 235 последовательностей гена pol ВИЧ-1, полученных на территории Омской области

Проработка начальных условий культивирования различных штаммов ВИЧ-1



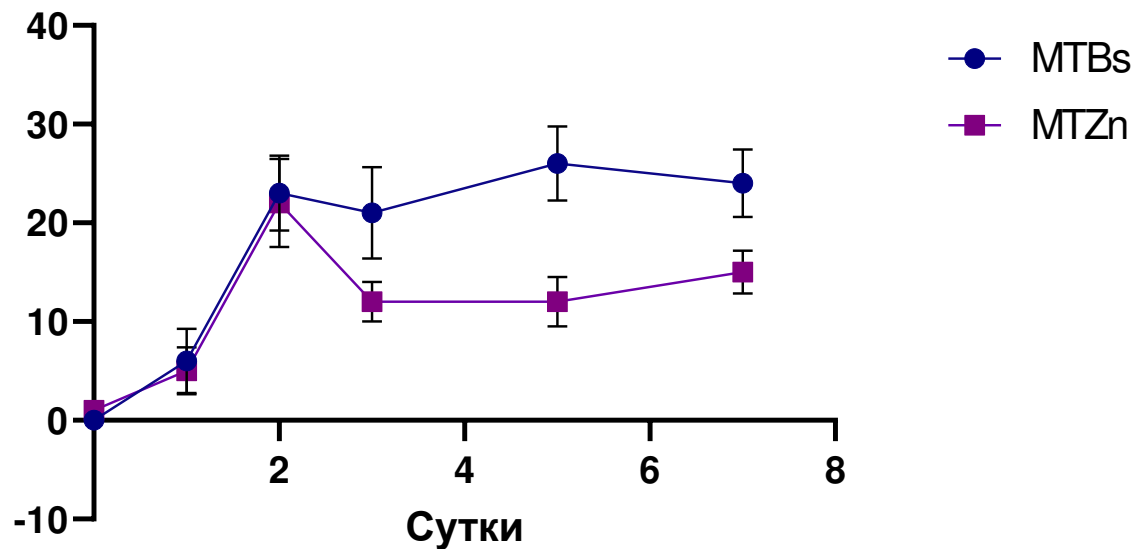
Выбранные штаммы ВИЧ-1 обладают сродством к CXCR4 корецептору и культивировались на клеточной линии MT-4.

Перед культивированием все штаммы ВИЧ-1 были нормированы по концентрации вирусного белка p24.

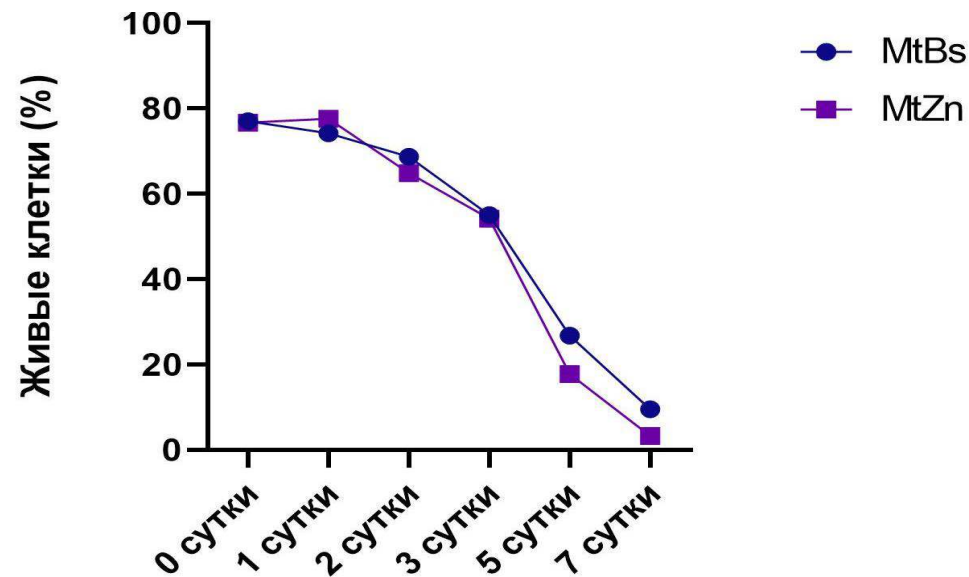
Данные по накоплению белка p24 ВИЧ-1 в процессе длительного культивирования

MtBs (ВИЧ-1/CRF63_02A) и MtZn (ВИЧ-1/субтип А6)

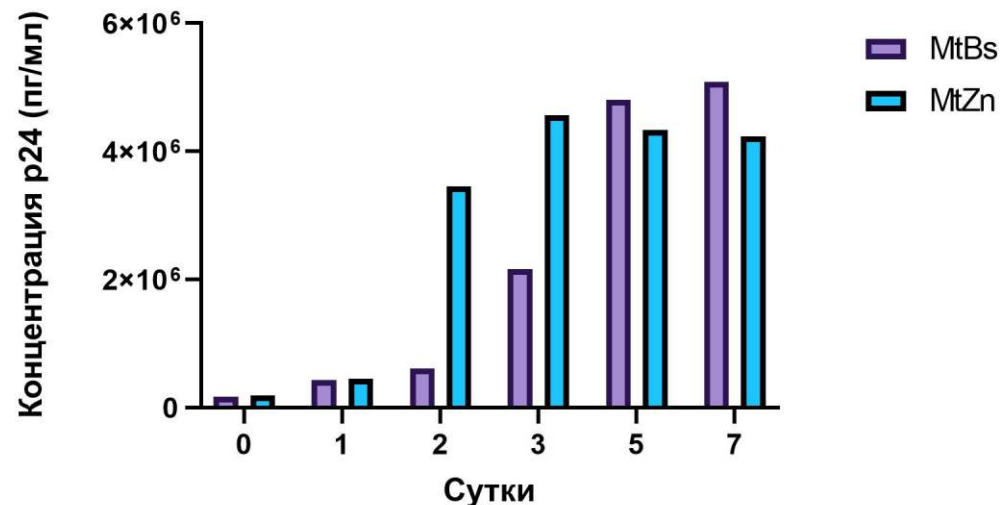
Количество провирусов на клетку



Изменение среднего количества копий провируса ВИЧ-1 на клетку в течение культивирования

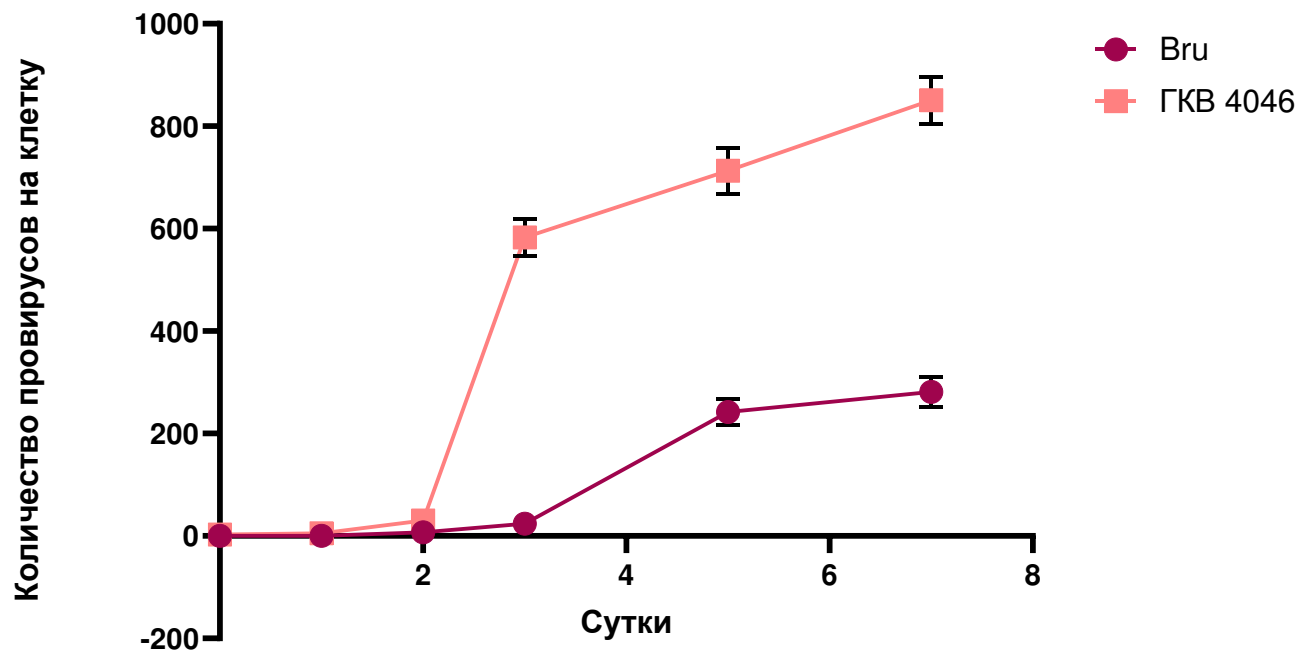


Изменение жизнеспособности культуры клеток MT-4 в ходе культивирования

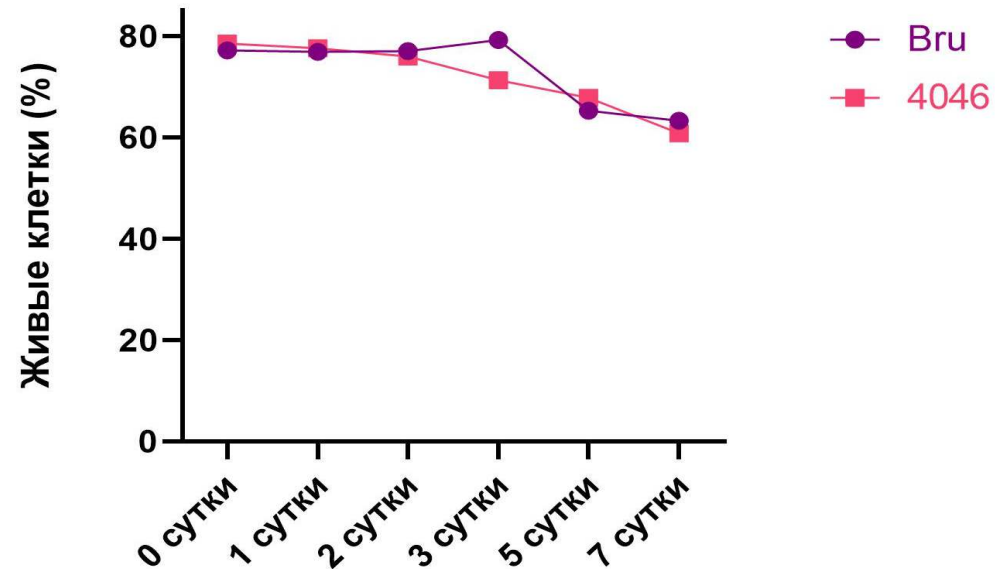


Динамика накопления белка p24 ВИЧ-1 в ходе культивирования

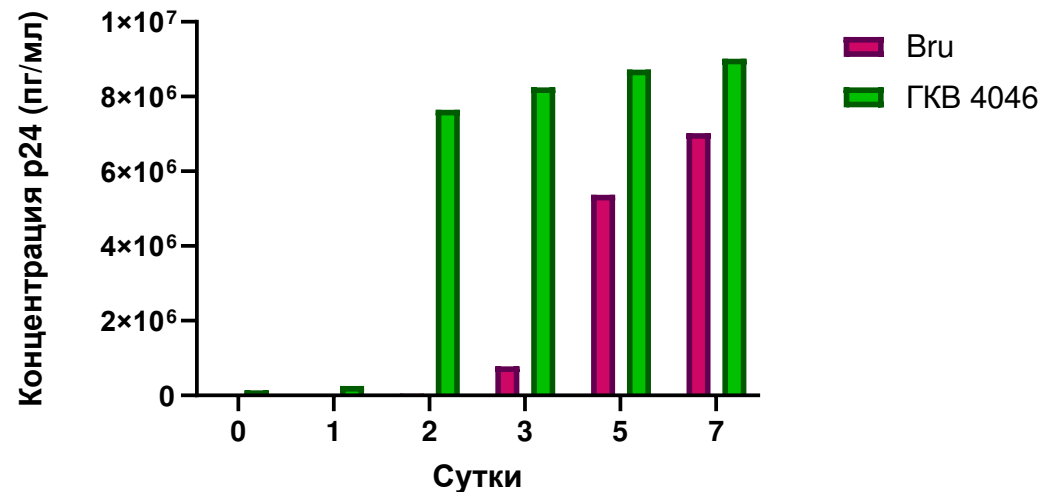
Bru и ГКВ 4046(ВИЧ-1, субтип В)



Изменение среднего количества копий провируса ВИЧ-1 на клетку в течение культивирования

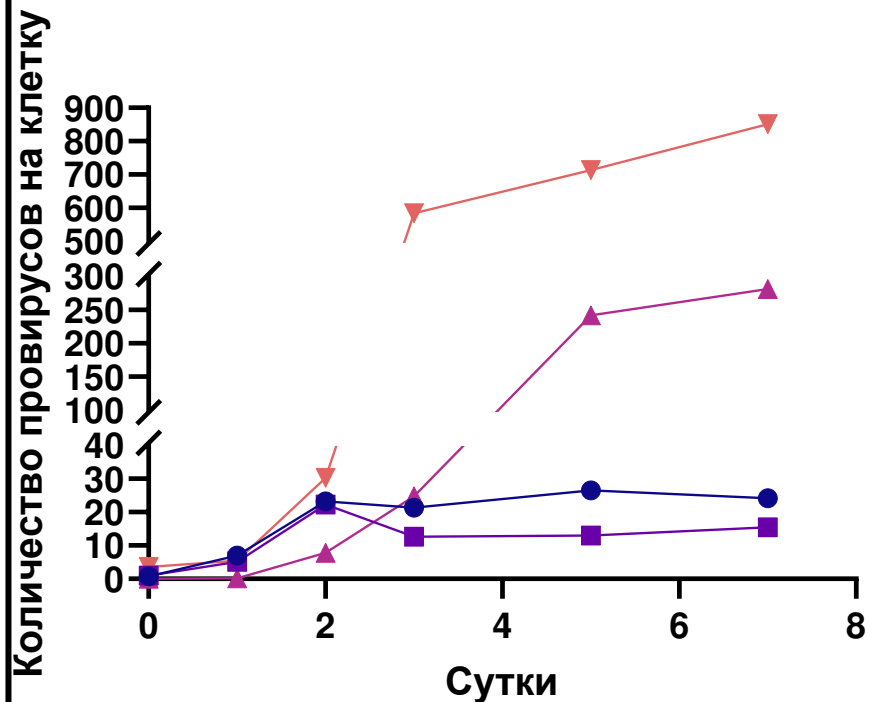


Изменение жизнеспособности культуры клеток МТ-4 в ходе культивирования

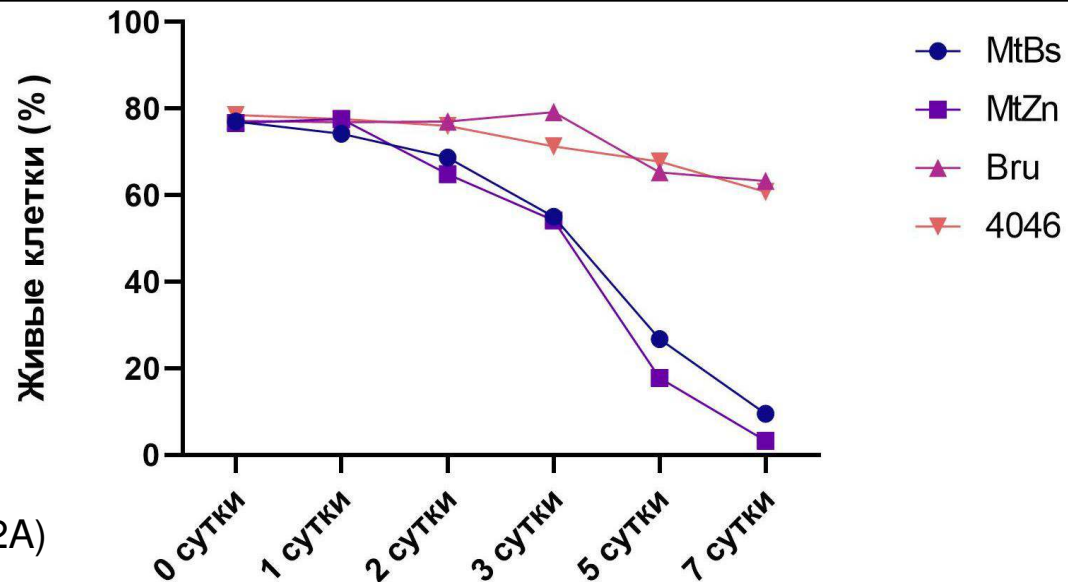


Динамика накопления белка p24 ВИЧ-1 в ходе культивирования

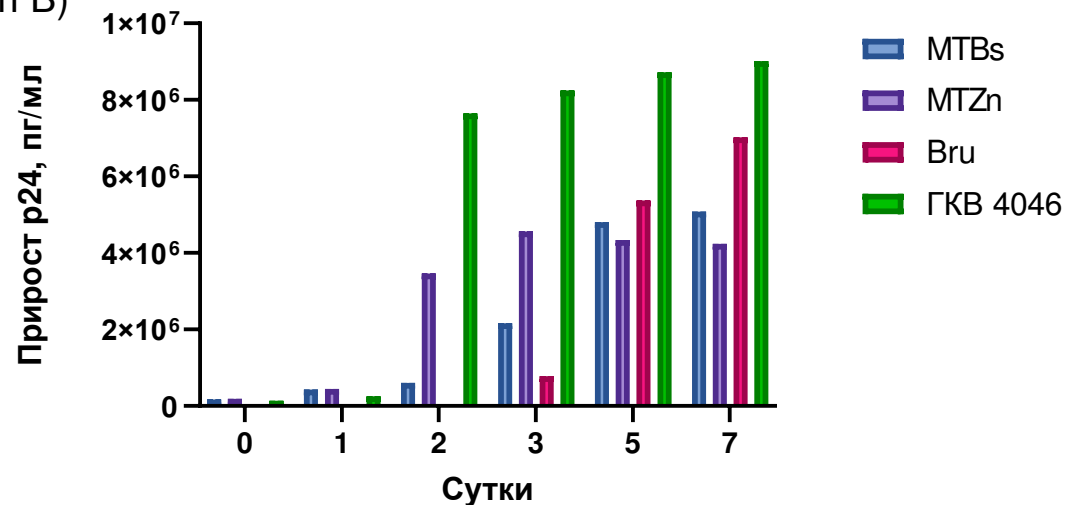
Сравнение показателей штаммов А, В и CRF63_02А ВИЧ-1



Изменение среднего количества копий провируса ВИЧ-1 на клетку в течение культивирования



Изменение жизнеспособности культуры клеток МТ-4 в ходе культивирования



Динамика накопления белка p24 ВИЧ-1 в ходе культивирования

Заключение

В работе предпринята попытка использования возможностей метода ddПЦР для изучения копийности внедрения ДНК ВИЧ-1 в геном клетки человека для основных российских геновариантов ВИЧ-1 субтипов А, В и CRF63_02А.

Результаты, полученные в рамках исследования, указывают на существенные различия параметра копийности вставки провируса в геном клетки-хозяина для изучаемых генетических вариантов ВИЧ-1.

Выполняемая работа является актуальной в рамках решения глобальной задачи по удалению ВИЧ из клеток человека.

Выводы

1. Анализ генетического разнообразия депонированных в GenBank и изученных нами российских ВИЧ-1 показал, что доминирующую роль в развитии современной эпидемии ВИЧ-инфекции в стране играют геноварианты A6, CRF63_02A и B ВИЧ-1, что является обоснованием для их углубленного изучения.

2. Комплексный подход с анализом показателей репродукции ВИЧ, жизнеспособности клеток и применения ddPCR с мишенями для ВИЧ и генома клетки позволили впервые оценить копийность встраивания провирусной ДНК в геном клетки-хозяина и выявить субтип-специфические отличия в биологических особенностях исследованных геновариантов ВИЧ-1:

- впервые зарегистрированы существенные отличия цитотоксического действия на клетки человека ВИЧ-1 субтипа B и вирусов, относящихся к геновариантам субтипа A и CRF63_02A

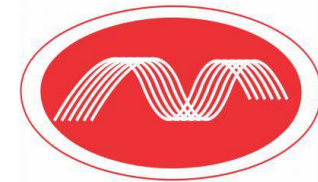
- доказано, что высокие репродуктивные показатели при ВИЧ-инфекции могут не коррелировать с развитием цитотоксичности и гибелью клеток

- для ВИЧ-1 субтипа A и CRF63_02A уже на 1 сутки культивирования регистрируется 5-9-кратное увеличение копийности детектируемой провирусной ДНК ВИЧ (соответственно), на 2-е сутки показатель копийности ДНК ВИЧ достигает максимальной величины 23 копии на клетку и выходит на плато; можно предположить, что прекращение роста копийности ДНК ВИЧ на клетку связана с цитотоксичностью вирусов и ограниченным количеством клеток, взятых для эксперимента при стандартизованных условиях культивирования

- для ВИЧ-1 субтипа B характерны более поздние сроки увеличения копийности встраивания провирусной ДНК ВИЧ в клетки – 2-е, 3-и сутки после заражения; при этом рост копийности продолжается до 7-х суток и достигает показателей 280 (для ВИЧ-1/Bru) и 850 (ВИЧ-1/ГКВ4046)

Спасибо за внимание

Исследования специфики и
множественности интеграционных
событий в геном клетки человека ВИЧ-1
для субтипов А6, В и CRF63_02А



Выполнила:

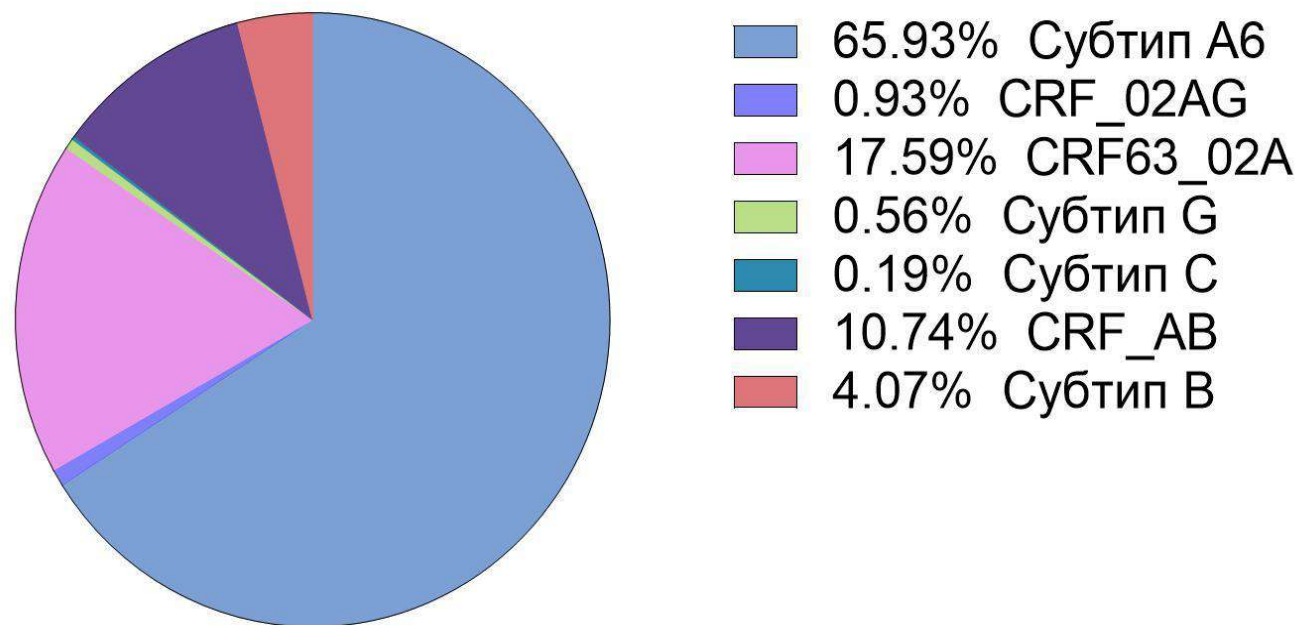
Нефедова Анастасия Александровна

Научное руководство:

**Гашникова Наталья Матвеевна, к.б.н.; зав.
отделом ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»**

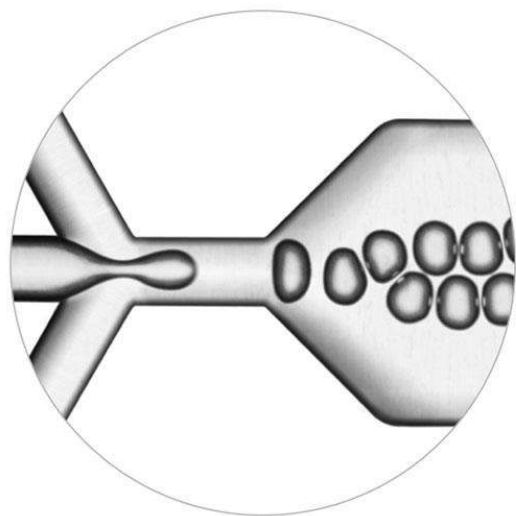
Результаты филогенетического анализа представленности геновариантов ВИЧ-1 в России

Всего в анализ было взято 540 последовательностей гена *pol* ВИЧ-1, полученных на территории России за 2016-2020 года и 220 полногеномных последовательностей, полученных на территории бывшего СССР.

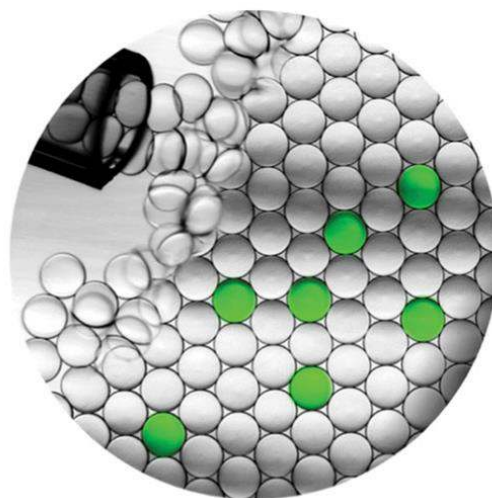


Total=540

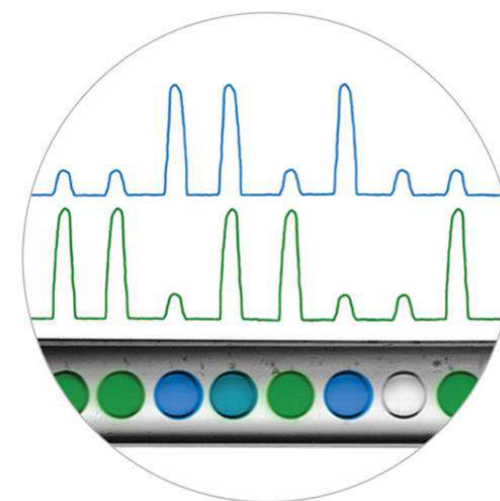
Digital Drop PCR



Генерація капель

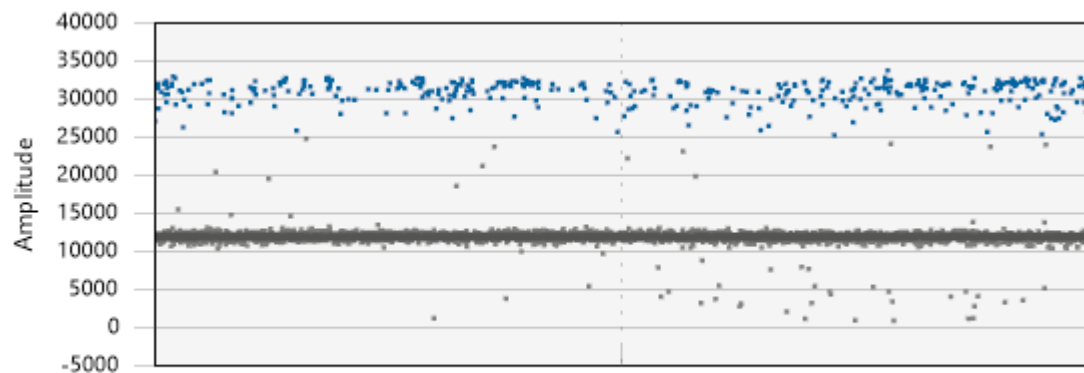


Постановка ПЦР

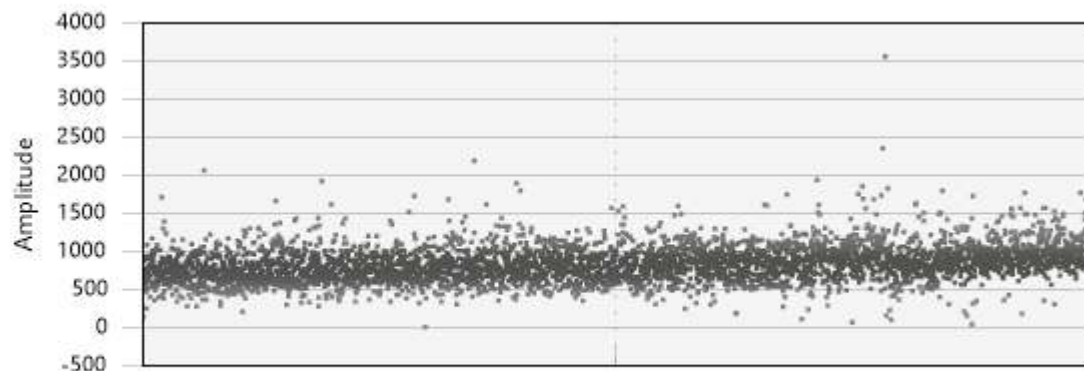


Считывание и анализ результатов

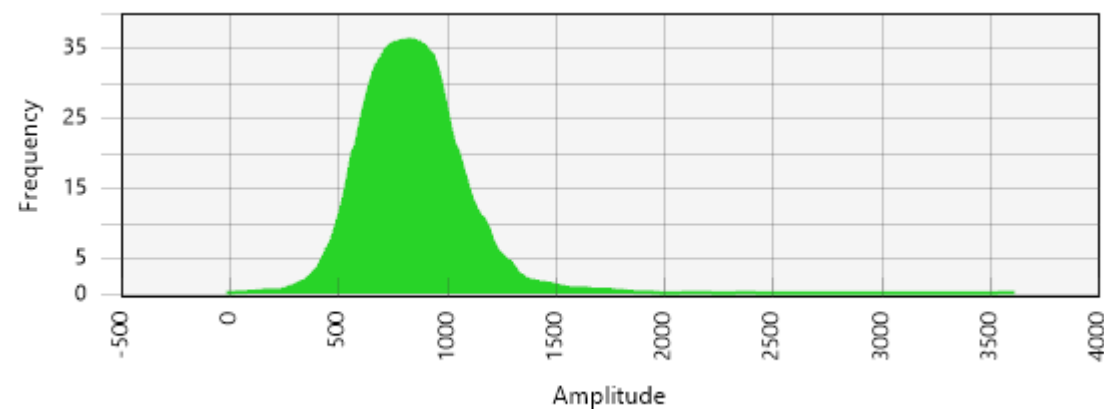
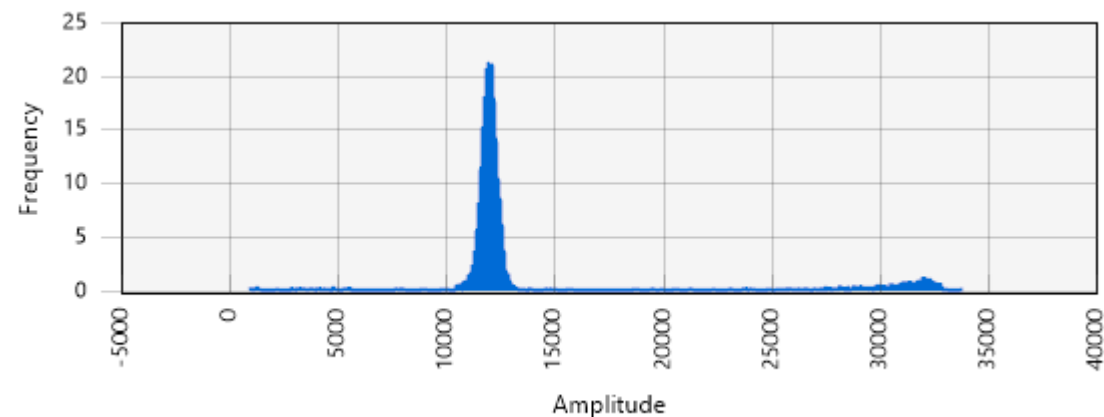
Mt4 (отрицательный контроль)



Детекция в канале FAM (CCR5)

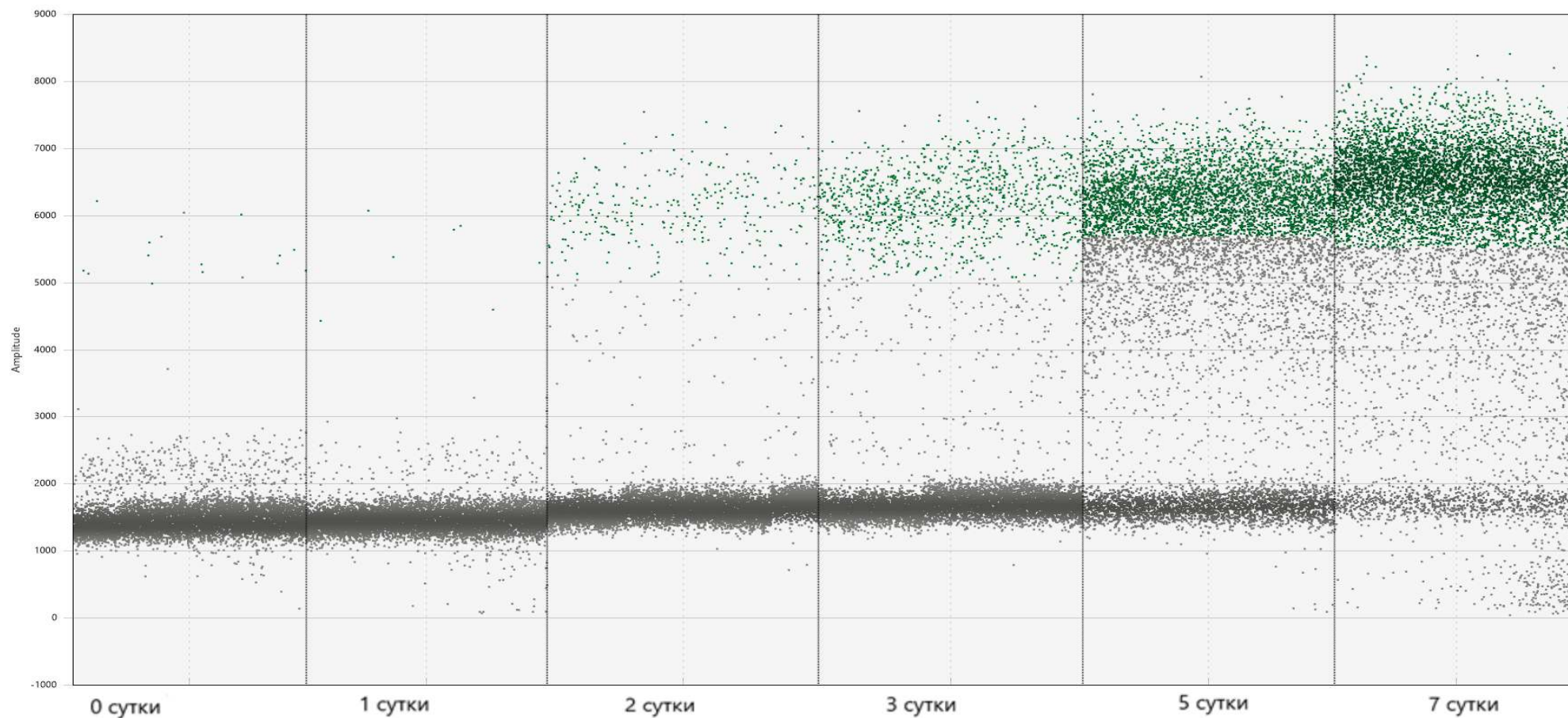


Детекция в канале HEX (LTR HIV)

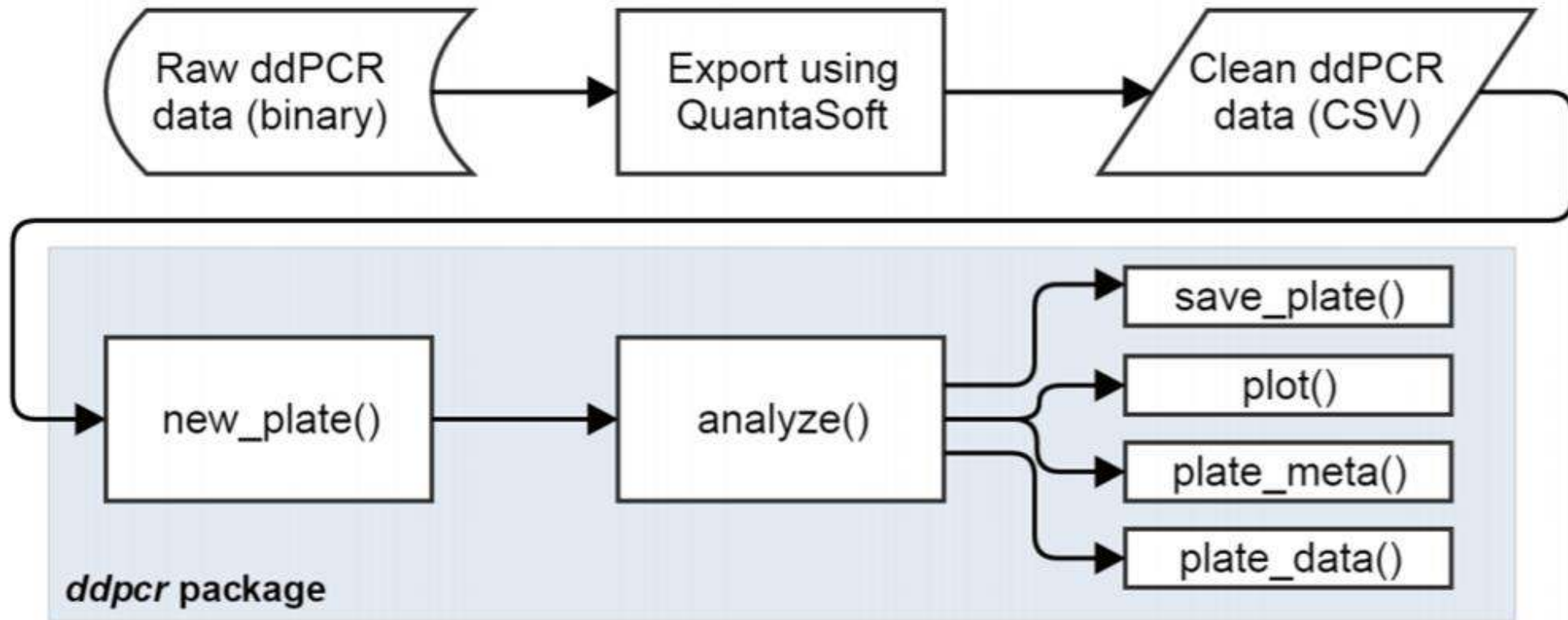


Проверка отсутствия ложноположительных сигналов для канала HEX

Результаты ddPCR для Вru(ВИЧ-1/субтип В)



Анализ результатов для ddPCR



Список литературы (1/2)

1. HIV sequence database (2017), 'HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)'
2. Yamaguchi, Julie, et al. "Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L." *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999) (2019).
3. Hemelaar, Joris. "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic." *Trends in molecular medicine* 18.3 (2012): 182-192.
4. Iwase, Saori C., et al. "HIV-1 DNA-capture-seq is a useful tool for the comprehensive characterization of HIV-1 provirus." *Scientific reports* 9.1 (2019): 1-12.
5. Darcis, Gilles, et al. "The Impact of HIV-1 Genetic Diversity on CRISPR-Cas9 Antiviral Activity and Viral Escape." *Viruses* 11.3 (2019): 255.
6. <https://www.who.int/gho/hiv/en/>
7. Wang, Gang, et al. "CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1." *Virus research* 244 (2018): 321-332.

Список литературы(2/2)

8. Mousseau, Guillaume, et al. "The Tat inhibitor didehydro-cortistatin A prevents HIV-1 reactivation from latency." *MBio* 6.4 (2015): e00465-15.
9. Ahlenstiel, Chantelle, et al. "Novel RNA duplex locks HIV-1 in a latent state via chromatin-mediated transcriptional silencing." *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 4 (2015): e261.
10. Marsden, Matthew D., et al. "Characterization of designed, synthetically accessible bryostatin analog HIV latency reversing agents." *Virology* 520 (2018): 83-93.
11. Hütter, Gero, et al. "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." *New England Journal of Medicine* 360.7 (2009): 692-698.
12. Rerks-Ngarm, Supachai, et al. "Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand." *New England Journal of Medicine* 361.23 (2009): 2209-2220.

Антиретровирусная терапия (АРТ)

Разработано множество препаратов, подавляющих вирус на разных этапах его жизненного цикла. Является основной терапевтической стратегией для инфицированных и снижает заболеваемость и смертность от заболеваний, связанных с ВИЧ. [3]

Стандартная АРТ состоит из комбинации по крайней мере трех антиретровирусных препаратов для максимального подавления вируса и остановки прогрессирования заболевания. [5]

В 2010 году ВОЗ и ЮНЭЙДС запустили стратегию «Treatment 2.0», которая способствует радикальному упрощению АРТ с ускоренным расширением масштабов лечения и полной интеграцией с профилактикой для обеспечения всеобщего доступа. [6]