

## Получение нокаутных клеточных линий по генам *GAPR-1* и *KPNA-4* методом SORTS

Научный руководитель – Мазуров Дмитрий Вячеславович

Комков Д.С.<sup>1</sup>, Грибалева Е.О.<sup>2</sup>, Атемасова А.А.<sup>3</sup>, Зотова А.А.<sup>4</sup>

1 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: dmitkomserg@gmail.com*; 2 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: lizagri@list.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия, *E-mail: justatemasova@gmail.com*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: ashunaeva@mail.ru*

Гены *GAPR-1* (**G**olgi-**A**ssociated **P**athogenesis **R**elated-1 protein) и *KPNA-4* (**K**aryo**P**herin**A**lpha 4) были обнаружены как потенциальные факторы репликации вируса HTLV-1 в трёх независимых скринингах библиотеки нокаутов GeCKO. *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 [1]. Ген *KPNA-4* кодирует белок импортин  $\alpha$ -3, участвующий в процессе транспорта белков в ядро клетки. Известно, что импортин  $\alpha$ -3 взаимодействует с интегразой ВИЧ-1 и способствует транслокации преинтеграционного комплекса вируса в ядро [2].

Ранее в нашей лаборатории был разработан метод SORTS (**S**urface **O**ligopeptide knock-in for **R**apid **T**arget **S**election) [3], который позволяет с высокой точностью и эффективностью получать нокауты генов, кодирующих внутриклеточные и секреторные белки. Метод основан на системе геномного редактирования CRISPR-Cas9. В дополнение к Cas9 и гидовой РНК клетки ко-трансфицируются донорскими конструкциями. Донорская ДНК содержит плечи гомологии в отношении целевого гена, а также последовательность эпитопного тага, экспрессирующегося на поверхности клетки. Интеграция этой последовательности в целевой ген происходит по механизму HDR (**H**omology **D**irected **R**epair). Сортировка нокаутных популяций проводится по экспрессии эпитопных тагов на поверхности трансфицированных клеток.

Нами был разработан дизайн специфических к *GAPR1* и *KPNA4* гидовых РНК и донорских ДНК, содержащих HA-таги. После ко-трансфекции клеток HEK293T данными генетическими конструкциями и плазмидой с Cas9 мы получили от 1,5 до 2,5% клеток, экспрессирующих HA-таг на поверхности. В результате серии последовательных сортировок клеток по HA-тагам удалось выделить популяции нокаутных по генам *GAPR1* и *KPNA4* клеток с высокой чистотой. На полученных нокаутных клетках планируется изучить роль *GAPR-1* и *KPNA-4* в ряде инфекционных тестов HTLV-1.

Верификация роли *GAPR-1* и *KPNA-4* в репликационном процессе T-лимфотропного вируса человека-1 открывает возможности для разработки ген-ориентированных терапевтических подходов в лечении заболеваний, ассоциированных с инфекцией HTLV-1, таких как тропический спастический парапарез и острый T-клеточный лейкоз взрослых.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00712 «Изучение роли *KPNA1*, *CD82* и ряда других белков в репликации HTLV-1, выявленных с помощью скрининга библиотеки нокаутов GeCKO»

*Авторы выражают благодарность к.м.н. Мазурову Д.В., под чьим руководством была проделана работа.*

### **Источники и литература**

- 1) Zhou Q. et al. The Golgi-Associated Plant Pathogenesis-Related Protein GAPR-1 Enhances Type I Interferon Signaling Pathway in Response to Toll-Like Receptor 4 // Inflammation. 2016. Apr; T. 39. №2. С. 706 - 717.
- 2) Ao Z et al. Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication // J Virol. 2010. Sep; T. 84 №17. С. 8650 - 8663
- 3) Zotova A. et al. Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycoposphatidylinositol-anchored epitope tags. // Sci Rep (in press)