

Отзыв научного руководителя на диссертационную работу

Шадриной Ольги Алексеевны

«Роль клеточных белков Ku и SFPQ в транскрипции ВИЧ-1»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Шадрина Ольга Алексеевна поступила в аспирантуру факультета биоинженерии и биоинформатики ФГБОУ высшего образования "Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова" в 2015 г. после окончания этого факультета по программе подготовка специалиста. Прекрасная теоретическая и практическая подготовка позволила Ольге быстро освоить предложенную тему и получить значимые научные результаты.

Диссертационная работа Ольги посвящена исследованию роли двух клеточных белков, Ku и SFPQ, на транскрипцию интегрированного генома ВИЧ-1. Исследование молекулярных механизмов активации транскрипции и выяснение роли конкретных клеточных белков в этом процессе является важной проблемой молекулярной биологии и вирусологии. Дело в том, что существующая в настоящий момент антиретровирусная терапия (АРТ) не позволяет полностью удалить вирус из организма человека. Причиной этого является наличие семейств клеток, содержащих интегрированный провирус в транскрипционно-неактивном состоянии, на который не действуют компоненты АРТ. Одной из возможных стратегий ликвидации «молчащего» провируса является активация транскрипции, но реализация этой стратегии требует досконального знания молекулярных механизмов активации транскрипции с вирусного промотора. В активации транскрипции с промотора ВИЧ-1 при заражении клетки важную роль играет вирусный белок Tat, который привлекает к промотору клеточные белки, обеспечивающие фосфорилирование транскрипционных факторов и РНК-полимеразы II, необходимое для элонгации транскрипции. Однако в латентном состоянии вируса белок Tat в клетке не детектируется, и механизм процесса активации транскрипции «молчащего» интегрированного провируса плохо понятен. Выяснение этого механизма в перспективе позволит предложить новые мишени для АРТ, а также разработать подходы к активации транскрипции с промотора ВИЧ-1, для того, чтобы сделать клетки, содержащие «молчащий» провирус доступными для воздействия АРТ и действия иммунной системы организма.

Цель диссертационной работы О.А. Шадриной заключалась в изучении влияния двух клеточных белков, Ku и SFPQ, на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 и выяснение возможных механизмов этого влияния. Для обоих белков уже было показан их эффект на репликацию этого вируса, однако не были точно определены стадии, на которые они влияют. Помимо этого, было известно, что Ku и SFPQ могут влиять на транскрипцию некоторых клеточных генов, однако механизм этого влияния не до конца понятен. Соответственно, первая задача работы состояла в

том, чтобы определить, влияет ли белок SFPQ на экспрессию генов ВИЧ-1. Вторая задача заключалась в изучении влияния белка Ku и каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы, с которой Ku образует холофермент DNA-PK, на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 в единой тестовой системе; необходимо было также определить, на какую стадию транскрипции оказывается влияние. Третья задача заключалась в характеристике взаимодействия белка Ku с РНК и проверке предположения о связи влияния Ku на транскрипцию ВИЧ-1 с его взаимодействием с TAR РНК. Четвертая задача состояла в изучении взаимодействия Ku с рибонуклеопротеиновым комплексом 7SK РНП, который является важным регулятором транскрипции ВИЧ-1. Пятая задача заключалась в биоинформатическом анализе полученных данных об изменении экспрессии клеточных белков на уровне транскриптома и протеома при нокауте субъединиц Ku70, Ku80 и DNA-PKcs с целью выявления факторов, участвующих в регуляции транскрипции с промотора ВИЧ-1 и изменяющихся при снижении уровня Ku в клетке.

Шадрина Ольга Алексеевна успешно решила все поставленные перед ней задачи: впервые показала, что суперэкспрессия белка SFPQ приводит к повышению эффективности транскрипции с промотора ВИЧ-1 и идентифицировала сайт связывания белка SFPQ внутри U3 региона вирусного LTR; изучила влияние всех субъединиц ДНК-зависимой протеинкиназы на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 и обнаружила, что влияние оказывает только гетеродимер Ku, причем он присутствует на промоторе ВИЧ-1 и положительно влияет на инициацию транскрипции с него по TAR-независимому механизму; охарактеризовала взаимодействие рекомбинантного белка His-Ku70/Ku80 с РНК и установила, что Ku предпочтительно связывается со шпилечными РНК, имеющими выпетливание рядом с терминальной петлей, содержащей G-богатую последовательность; обнаружила взаимодействие Ku в клетке с 7SK РНК и белками HEXIM1 и Cdk9, входящими в состав комплекса 7SK РНП – важного регулятора транскрипции ВИЧ-1; провела анализ транскриптомных и протеомных данных для линии НЕК 293Т дикого типа и с пониженным уровнем Ku и предложила белки - новые возможные участники Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1, которые определяют влияние Ku на транскрипцию. В своей работе Ольга использовала большой набор генетических, молекулярно-биологических, клеточных, биохимических и биоинформатических методов. Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью.

За время работы Ольга показала себя очень серьезным, целеустремленным и вдумчивым работником, хорошо знающим литературу, касающуюся как механизма транскрипции, так и роли различных клеточных факторов в репликации ВИЧ-1. При выполнении диссертационной работы она проявила все качества блестящего экспериментатора, показала, что хорошо разбирается в предмете исследования, способна осмысливать получаемые результаты, делать правильные выводы,

предлагать необходимые дополнительные эксперименты. В результате Ольге удалось впервые показать, что белок SFPQ имеет сайт связывания в U3 фрагменте вирусного LTR участка и это, очевидно, определяет его положительное влияние на экспрессию с промотора ВИЧ-1 в клетках линии НЕК 293Т. Вторым важным достижением стало открытие способности белка Ku активировать транскрипцию ВИЧ-1 на стадии инициации, причем была предложена гипотеза о том, что наличие Ku на промоторе ВИЧ-1 обусловлено его участием в комплексе 7SK мРНК, который, по некоторым данным, привлекается к промотору ВИЧ-1 во время инициации транскрипции.

Основные положения и выводы диссертационного исследования в полной мере изложены в 5 научных работах, опубликованных Ольгой Алексеевной Шадриной, в том числе в 5 публикациях в рецензируемых научных изданиях, определенных в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова.

Диссертация соответствует критериям, определенным в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Вышесказанное позволяет рекомендовать О.А. Шадрину для присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник отдела
химии нуклеиновых кислот Научно-
исследовательского института физико-
химической биологии имени
А.Н.Белозерского ФГБОУ высшего
образования "Московский
государственный
университет имени М.В.Ломоносова"

/Готтих Марина Борисовна/