

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шадриной Ольги Алексеевны
на тему: «Роль клеточных белков Ku и SFPQ в транскрипции ВИЧ-1»
по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Диссертационная работа О.А. Шадриной посвящена изучению влияния двух клеточных белков, Ku и SFPQ, на транскрипцию с промотора вируса иммунодефицита человека. Транскрипция вирусных генов сразу после инфицирования клетки ВИЧ-1 – довольно хорошо изученный процесс, однако протекание транскрипции в латентном состоянии вируса и особенно ее активация при выходе из латентности еще недостаточно исследованы. В частности, важной проблемой молекулярной биологии и вирусологии является выяснение роли конкретных клеточных белков в этих процессах. Для белка SFPQ ранее не было описано влияние на транскрипцию ВИЧ-1, хотя имеются данные о его участии в репликации этого вируса. Для белка Ku существует ряд исследований, указывающих на его участие в транскрипции ВИЧ-1, однако, результаты этих исследований достаточно противоречивы. Безусловно, изучение новых механизмов регуляции транскрипции ВИЧ-1 является актуальной задачей, поскольку может привести к созданию новых подходов к терапии ВИЧ-1, основанных на поддержании латентного состояния или выхода из него.

В своей работе для изучения влияния белков SFPQ и Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 Шадрина О.А. предложила две системы, имитирующие как раз латентное состояние вируса: вектора, кодирующие репортерный белок под контролем промотора ВИЧ-1 и интегрированный провирус. В работе впервые показано, что суперэкспрессия SFPQ приводит к повышению уровня транскрипции с промотора ВИЧ-1 и установлен сайт связывания белка SFPQ в составе длинных концевых повторов (LTR). Однако, основное внимание Шадрина О.А. уделила гетеродимерному белку

Ku, основная функция которого в клетке – участие в репарации двуцепочечных разрывов по механизму негомологичного соединения концов. Помимо этого, Ku участвует еще в большом количестве клеточных процессов, среди которых репарация AP-сайтов в ДНК, V(D)J recombination, поддержание длины теломер. В своей работе Шадрина О.А. показала, что белок Ku присутствует на LTR и является положительным фактором инициации транскрипции с промотора ВИЧ-1. С целью изучения возможного механизма влияния Ku на транскрипцию в работе проведено исследование РНК-связывающих свойств препарата рекомбинантного белка Ku. Впервые показано, что Ku взаимодействует с малым ядерным 7SK рибонуклеопротеидом – важным регулятором транскрипции ВИЧ-1. Безусловно, полученные в работе результаты являются новыми и вносят важный вклад в решение фундаментальных вопросов регуляции транскрипции ВИЧ-1.

Диссертация Шадриной О.А. построена по общепринятому плану, изложена на 135 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и дополнительные материалы. Работа содержит 8 таблиц, 37 рисунков, 181 цитируемый источник, а также 1 приложение в разделе дополнительные материалы.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность работы, определяет цели и задачи, описывает новизну полученных данных. Также в этом разделе описаны основные подходы, которые были применены при выполнении диссертационного исследования и которые позволяют сформировать представление о нем.

Раздел «Обзор литературы» посвящен роли белков Ku, SFPQ и NONO, а также длинной некодирующей РНК NEAT1 в жизненном цикле ВИЧ-1. В первом подразделе кратко описан жизненный цикл вируса. Во втором подразделе приведены результаты исследований о влиянии белка Ku на транскрипцию ВИЧ-1. Несмотря на то, что большая часть диссертационной

работы посвящена изучению роли Ku в транскрипции ВИЧ-1, в обзоре литературы дана минимальная характеристика белка Ku и его основных клеточных функций и кратко изложены существующие на данный момент данные, свидетельствующие об участии Ku в транскрипции ВИЧ-1. Тем не менее, приведённая информация хорошо систематизирована, выявлены существующие противоречия и сделано заключение о том, каких данных не хватает для понимания роли Ku в транскрипции ВИЧ-1. Третий и четвертый подразделы обзора литературы посвящены белкам SFPQ и NONO и длинной некодирующей РНК NEAT1, которые вместе формируют параспекли. В них довольно подробно изложен материал про строение и функций SFPQ, NONO, NEAT1 и параспеклей в целом. Наибольший интерес представляет подраздел, посвященный описанию роли SFPQ, NONO и NEAT1 в жизненном цикле ВИЧ-1. Несмотря на то, что существующие данные достаточно противоречивы и не позволяют сформировать полную картину участия SFPQ, NONO и NEAT1 в репликации вируса, Шадринной О.А. удалось эти данные обобщить и найти некоторые новые закономерности.

Раздел «Материалы и методы» содержит данные об использованных в работе реактивах, олигонуклеотидных праймерах, плазмидных конструкциях и многочисленных методах. Спектр использованных в работе методических приемов и технологий весьма широк, и все они отлично подходят для решения поставленных в работе задач. Совершенно очевидно, что Шадринна О.А. является квалифицированным специалистом, хорошо владеющим широким спектром современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и генной инженерии.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 4 частей. Первая часть посвящена изучению роли белка SFPQ в транскрипции ВИЧ-1. В работе используются репортерные вектора с геном люциферазы светлячка под контролем регуляторного участка генома ВИЧ-1 – длинного концевого повтора (LTR), содержащего вирусный промотор, или контрольного промотора цитомегаловируса (CMV). Показано, что суперэкспрессия белка

SFPQ приводит к повышению уровня экспрессии люциферазы с промотора LTR примерно на 30%, а с промотора CMV на 75%. Несмотря на сильный эффект SFPQ на экспрессию с промотора CMV, в работе далее исследуется влияние SFPQ на LTR, влияние на CMV отдельно не обсуждается. На основе анализа литературных данных автор предполагает наличие сайта связывания SFPQ в U3 регионе LTR. Это предположение подтверждено при анализе связывания рекомбинантного белка SFPQ с участком ДНК, соответствующим U3 региону LTR методом торможения в геле, а также с помощью футпринтинга ДНКазой I. Важность этого взаимодействия для транскрипции с промотора ВИЧ-1 проверена на культуре клеток: получен вариант репортерного вектора с делецией U3 региона в LTR и показано, что экспрессия репортера с него не зависит от уровня SFPQ.

Остальные части раздела «Результаты и обсуждение» посвящены изучению роли в транскрипции с промотора ВИЧ-1 субъединиц ДНК-зависимой протеинкиназы DNA-PK: гетеродимера Ku70/Ku80 и каталитической субъединицы DNA-PKcs. Шадриной О.А. показано, что транскрипция репортера с промотора ВИЧ-1 положительно регулируется обеими субъединицами гетеродимера Ku, а эффект DNA-PKcs негативный и очень незначительный. Очень важно, что негативный эффект DNA-PKcs на транскрипцию обнаружен и для промотора CMV, в то время как эффект Ku на CMV практически отсутствует. Соответственно, автор делает вывод о специфичности влияния только гетеродимера Ku, но не DNA-PKcs, на транскрипцию с промотора ВИЧ-1 и далее пытается установить механизм этого влияния.

Шадриной О.А. проведено исследование РНК-связывающих свойств гетеродимера Ku, для чего пришлось оптимизировать методику экспрессии и очистки рекомбинантного белка из клеток *E.coli*. В диссертационной работе описаны несколько подходов по выделению гетеродимера, и лишь один из них привел к получению препарата белка. Проведен анализ взаимодействия разных структур РНК с выделенным гетеродимером Ku, который позволил

заключить, что для связывания Ku с РНК в первую очередь важна пространственная структура РНК: Ku предпочтительно взаимодействует со шпильками, которые обладают выпетливанием вблизи терминальной петли. Показано, что Ku связывается с TAR РНК, которая является важным регулятором элонгации транскрипции ВИЧ-1. Помимо этого, проведен анализ данных из базы ENCODE по взаимодействию субъединицы Ku70 в клетках с РНК, которые подтверждают, что большинство РНК, взаимодействующих в клетке с Ku70, имеют шпилечную структуру с выпетливанием около терминальной петли. Автор обсуждает свои результаты, полученные для белка человека, и сравнивает их с опубликованными исследованиями РНК-связывающих свойств дрожжевого Ku.

На основании того, что Ku взаимодействует с TAR РНК *in vitro*, было проверено предположение о TAR-зависимом механизме влияния Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. С этой целью Шадрина О.А. получила репортерный вектор с делецией региона LTR, кодирующего TAR, и показала, что Ku влияет на транскрипцию с этого вектора также, как и с вектора с полноразмерным промотором. Таким образом, высказанная гипотеза не была подтверждена. Далее в работе исследуется взаимодействие Ku с малой ядерной 7SK РНК, которая является важным регулятором транскрипции ВИЧ-1. Шадриной О.А. показано, что 7SK РНК ко-иммунопреципитируется с суперэкспрессированным Ku70-Flag/Ku80-Flag из клеток НЕК 293Т. Кроме того, установлено, что рекомбинантный Ku непосредственно взаимодействует с *in vitro* транскрибированной 7SK РНК, а также установлен сайт связывания с ней. Автору удалось установить, что кроме 7SK РНК, Ku также соосаждается с белками ее комплекса: HEXIM1 и Cdk9, которые участвуют в регуляции транскрипции ВИЧ-1 на стадии элонгации. С целью проверить, что влияние Ku на транскрипцию ВИЧ-1 обусловлено его взаимодействием с комплексом 7SK РНП, в работе был проведен анализ стадии транскрипции, на которую влияет Ku. Анализ количества форм

вирусной РНК и иммунопреципитация хроматина за антитела к инициаторной и элонгационной формам РНК-полимеразы II в клетках дикого типа и клетках с нокаутом Ku70 показал, что недостаток Ku в клетке снижает эффективность стадии инициации транскрипции. Это позволило автору диссертации заключить, что ассоциация Ku с комплексом 7SK РНП не определяет влияние Ku на транскрипцию с промотора ВИЧ-1.

Отдельный подраздел 4.4 главы «Результаты и обсуждение» посвящен аналитической работе с данными транскриптомного и протеомного исследований клеточных линий дикого типа и с нокаутом Ku. Шадрина О.А. предположила, что эффект Ku на транскрипцию может быть опосредован изменением уровня некоторого транскрипционного фактора, зависящего от уровня Ku в клетке. Поиск транскрипционного фактора, для которого, с одной стороны, известно участие в регуляции транскрипции ВИЧ-1, а с другой стороны есть значительное изменение уровня в клетках с нокаутом Ku, позволил выявить 5 генов, которые могут участвовать в Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1. Хотя в диссертационном исследовании содержится только аналитическая работа по поиску возможных посредников Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1, его результаты являются заделом для нового важного исследования.

Таким, образом, в диссертационной работе Шадриной О.А. показано влияние гетеродимера Ku на транскрипцию ВИЧ-1, установлена стадия транскрипции, на которую это влияние оказывается, предложено и проверено несколько возможных механизмов, которые могли бы объяснить наблюдаемый эффект Ku, хотя установить детальный механизм пока не удалось.

Диссертационная работа выполнена Шадриной О.А. на высоком уровне, использован широкий набор современных методов молекулярной биологии, проведены как биохимические, так и клеточные эксперименты. Основные результаты получены автором диссертации самостоятельно, в диссертации также приведено небольшое количество необходимых для

понимания полной картины исследования экспериментов, выполненных указанными в тексте коллегами Шадриной О.А. Выводы, сделанные в работе на основании анализа полученных результатов, основаны на большом объеме фактического материала. Достоверность положений и выводов подтверждена результатами статистической обработки экспериментальных данных. Основные результаты описаны в двух обзорах и трех экспериментальных статьях в рецензируемых журналах, а также представлены на международных конференциях. Диссертационная работа аккуратно оформлена, присутствуют необходимые рисунки, подкрепляющие сделанные выводы.

По содержанию диссертации принципиальных замечаний нет. Тем не менее, несколько моментов вызывают вопросы или замечания.

1. Обзор литературы посвящен белкам SFPQ, NONO и NEAT-1 РНК и их роли в репликации ВИЧ-1, однако, в диссертации исследуется только влияние белка SFPQ на транскрипцию, но не NONO. Учитывая, что SFPQ и NONO имеют схожую структуру и могут в клетке функционировать как гетеродимер, интересно было бы проверить, какой эффект на транскрипцию оказывает NONO.

2. Большая часть результатов и обсуждений посвящена изучению роли Ku в транскрипции ВИЧ-1, причем значительная часть исследования касается РНК-связывающих свойств гетеродимера. В обзоре литературы акцент делается на роли белков SFPQ, NONO и некодирующей РНК NEAT1 в репликации ВИЧ-1, а для Ku отводится небольшой раздел. Учитывая, что в работе активно обсуждаются имеющиеся данные о взаимодействии Ku с РНК, на мой взгляд, было бы логично расширить подраздел в обзоре литературы, посвященный Ku, сведениями об РНК-связывающих свойствах этого белка.

3. В работе описан эксперимент по соосаждению рекомбинантных белков Ku и HEXIM1, однако иллюстрации для него не приведено.

4. В работе использован рекомбинантный белок Ku, выделенный из *E. coli*. Однако известно, что функциональная активность эукариотических белков во многом определяется и регулируется посттрансляционными модификациями, которые отсутствуют в бактериальных клетках. Потенциально возможно влияние этих модификаций на обнаруженные закономерности.

5. Клеточные эксперименты проводились на линии НЕК293Т, характеризующейся высоким содержанием Ku. Будут ли закономерности, обнаруженные на этой линии, справедливы для клеток с меньшим содержанием белка Ku?

6. Текст диссертации содержит некоторые орфографические и стилистические ошибки и несогласованности.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шадрин О.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, академик РАН
заведующая лабораторией
биоорганической химии ферментов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН»
Лаврик Ольга Ивановна

Лав

22.03.2021

Контактные данные:

тел.: 7(383)-363-51-94, e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8,

ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН»

Тел.: 7(383)-363-51-94; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Подпись сотрудника

ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН»

Лаврик О. И. удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБУН

«Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН»

к.х.н. П.Е. Пестряков

