

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»

Хотя с момента выделения лентивируса HIV-1 (ВИЧ-1) прошло около 40 лет, до сих пор задача полного излечения инфицированных людей не решена. Несмотря на постоянные усилия сотрудников многих исследовательских центров во всем мире эффективная анти-ВИЧ вакцина еще не создана. Разработаны терапевтические препараты, позволяющие перевести развитие болезни, синдрома приобретенного иммунодефицита, вызываемой ВИЧ-1, из острой формы в хроническую при постоянном приеме коктейля лекарств, которые почти полностью подавляют репликацию вируса. Это значительно продлевает жизнь пациентов и улучшает ее качество, позволяя ощущать себя полноценным членом общества. Однако основной проблемой в борьбе с ВИЧ-инфекцией является наличие в организме клеток, которые содержат интегрированный, но транскрипционно-неактивный ДНК-провирус ВИЧ-1. Наличие резервуаров латентно инфицированных клеток делает невозможным полное излечение от ВИЧ-инфекции и не позволяет отменить постоянное применение антивирусной терапии, что, как правило, приводит к вспышке репродукции ВИЧ-1 за счет перехода латентного вируса в активный репликационно-компетентный инфекционный вирус.

Для эффективного осуществления стратегий по борьбе с латентным провирусом необходимы глубокие фундаментальные знания регуляции транскрипции ВИЧ-1, поддержания латентности и выхода из нее.

Работа Ольги Алексеевны Шадриной посвящена исследованию регуляции транскрипции провируса ВИЧ-1 белками Ku и SFPQ инфицированной клетки. Поэтому тема диссертационной работы Шадриной О.А., безусловно, является интересной и актуальной.

Диссертация написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и дополнительных материалов. Работа изложена на 135 страницах, содержит 8 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает ссылки на 181 источник.

Обзор литературы дает полную картину современного состояния проблемы, материал изложен доступно, с необходимыми деталями и иллюстрациями. Обзор начинается с небольшого раздела, посвященного характеристике стадий жизненного цикла вируса, который необходим и полезен для понимания следующих разделов обзора литературы и проведенного исследования. Основная часть обзора литературы посвящена анализу существующих исследований роли белков Ku и SFPQ в репликации ВИЧ-1. Примечательно, что автор пытается систематизировать данные столь разнонаправленных исследований не только описанием в тексте, но также таблицей и схемой с основными характеристиками существующих данных, что очень удобно и показательно и демонстрирует компетентность автора в данной теме. Обзор литературы подтверждает актуальность исследования: зачастую противоречивая информация о роли белков Ku и SFPQ в репликации ВИЧ-1 свидетельствует о недостаточном исследовании этой темы, с одной стороны, и интересе исследователей из разных групп к ней, с другой. Важно, что Обзор позволяет заинтересованному читателю достаточно быстро войти в круг обсуждаемых проблем.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание арсенала современных молекулярно-биологических и биохимических методов, которые были использованы автором для выполнения диссертационной работы. Необходимо сразу отметить, что Шадрина О.А. умело использовала широкий спектр самых современных физико-химических, биохимических, молекулярно-биологических и генно-инженерных методов, необходимых для получения очищенных рекомбинантных белков и исследования их взаимодействия, создания

необходимых плазмидных конструкций, культивирования про- и эукариотических клеток, оценки уровня экспрессии репортерных белков, иммунопреципитации, а также методов работы с различными базами данных.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно изложены результаты исследования, которые логично вытекают один из другого. Эксперименты хорошо описаны, диссертант объясняет необходимость тех или иных экспериментов, подробно описывает сам эксперимент и его результат, проиллюстрированный рисунками. Полученные результаты Шадрина О.А. сравнивает с опубликованными данными, делает выводы и предлагает возможные объяснения. Необходимо подчеркнуть, что в своей работе диссертант не использовал вирус или псевдовирусные частицы, поскольку в этом случае крайне сложно отделить влияние белков на стадию транскрипции от их воздействия на другие стадии репликативного цикла вируса. Шадрина О.А. использовала более простые системы: вектора, кодирующие репортерный белок под контролем промотора ВИЧ-1 и интегрированный провирус, - которые позволили четко идентифицировать влияние белков Ku и SFPQ именно на стадию вирусной транскрипции. В тоже время следует иметь в виду, что *in vivo* в процессах транскрипции могут участвовать и другие клеточные компоненты, не выявляемые в описанных системах, что, в прочем, нисколько не умаляет значимости полученных результатов.

В работе Шадриной О.А. впервые исследовано влияние белка SFPQ на экспрессию с промотора ВИЧ-1. Установлено, что суперэкспрессия SFPQ оказывает небольшое положительное влияние как на уровень репортерного белка, так и его мРНК. Исследовано взаимодействие рекомбинантного препарата белка SFPQ с ДНК вирусного длинного концевой повтора, в состав которого входит вирусный промотор, обнаружен сайт связывания SFPQ в U3 участке. Показано, что наблюдаемый эффект белка на экспрессию вызван взаимодействием SFPQ с этой последовательностью.

С целью выяснения механизма привлечения белка Ku к промотору проведено исследование его РНК-связывающих свойств. Для этого была отработана методика экспрессии белка Ku в бактериальной системе и исследовано взаимодействие рекомбинантного белка с набором РНК различной структуры. Диссертантом обнаружено, что Ku взаимодействует только с РНК, обладающими шпильчатой структурой с выпетливанием около терминальной петли, содержащей G-богатую последовательность. Такой структурой обладает TAR РНК ВИЧ-1, а также консервативная первая петля 7SK РНК, которая является важным регулятором элонгации транскрипции ВИЧ-1. Шадриной О.А. впервые показано взаимодействие рекомбинантного белка Ku с 7SK РНК и определен сайт связывания в структуре этой РНК. Впервые также обнаружена ассоциация эндогенного Ku с 7SK РНК и белками комплекса 7SK мРНК: HEXIM1 и Cdk9, - в клетках HEK 293T. На основании этих результатов диссертант логично предположил, что Ku может влиять на транскрипцию ВИЧ-1 за счет взаимодействия с TAR РНК или 7SK мРНК, которые регулируют элонгацию транскрипции. Это предположение Шадриной О.А. было проверено и было установлено, что положительный эффект Ku наблюдается, главным образом, на стадии инициации транскрипции. Показано также, что влияние Ku на транскрипцию не зависит от наличия в составе промотора участка, кодирующего TAR РНК. Тем не менее, все полученные данные не противоречат предположению, что Ku привлекается к промотору в составе комплекса с 7SK РНК.

Основное направление диссертационной работы посвящено изучению непосредственного влияния Ku на транскрипцию ВИЧ-1. Тем не менее, Шадрина О.А. не исключает возможности опосредованного влияния, для выяснения которого ею проведен поиск факторов транскрипции, зависящих от уровня Ku в клетке. Эта часть работы биоинформатического характера не была подтверждена экспериментальными данными, тем не менее она позволила предложить 5 возможных кандидатов. Их проверка значительно

бы дополнила проведенную работу, хотя и без этого диссертационное исследование является объемным и интересным.

По содержанию диссертационной работы есть следующие замечания и вопросы:

1. В работе не обосновано использование клеточной линии НЕК 293Т. Все основные данные получены в работе с использованием этих клеток, которые, однако, не являются мишенями вируса иммунодефицита. Стоит заметить, что в работе есть эксперимент на линии микроглиальных клеток НС69.5, несущих интегрированный геном ВИЧ-1, которые являются мишенями ВИЧ-1 в мозге. Возможно, сделанные в работе выводы можно было бы проверить, по крайней мере, на них?

2. В работе присутствуют расхождения обозначений на рисунках и в тексте. Например, на рис. 22, иллюстрирующем выделение рекомбинантного белка Ku80, и в подписи к нему белок Ku80 с 6-гистидиновой меткой обозначен по-разному: 6xHis-Ku80 и Ku80-6xHis, соответственно. Также на рис. 24 выделенный гетеродимер Ku обозначен как His-Ku70/Ku80, хотя в тексте фигурирует 6xHis-Ku70/Ku80.

3. В части работы, посвященной анализу данных транскриптома и протеома, проводится поиск транскрипционного фактора, участвующего в регуляции транскрипции ВИЧ-1. При поиске такого фактора в протеомах клеток дикого типа и с нокаутом Ku70 диссертант использует базу данных взаимосвязей клеточных и вирусных белков и ищет среди них белки с измененным уровнем в данных протеомного исследования. Однако, как пишет сама Шадрина О.А., база включает лишь данные публикаций до 2017г. и, соответственно, самые новые данные там отсутствуют. Возможно, такой подход ограничивает количество возможных мишеней. Кроме того, при анализе транскриптомных данных эта база вообще не использовалась, хотя задача была та же: автор сам проводил поиск публикаций по всем транскрипционным факторам с измененным уровнем мРНК в клетках с нокаутом Ku70 и Ku80. Чем обусловлены разные подходы к анализу данных?

4. В тексте диссертационной работы встречаются немногочисленные стилистические погрешности и неисправленные опечатки

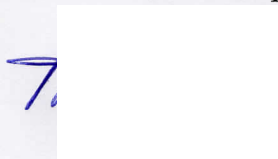
Эти недостатки, однако, не влияют на качество диссертации и не снижают ее оценки. Диссертационное исследование отличается очень большим объемом проделанной работы, широким набором использованных методов, понятным и подробным описанием теоретических основ, методов и результатов. Примечательно, что в работе последовательно описано выдвижение гипотез и их проверка, обсуждение полученного результата и построение новых концепций. Не все эксперименты заканчиваются предполагаемым автором результатом, но на их основе автор развивает новые идеи. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, полученные выводы обоснованы и логично вытекают из полученных результатов. Содержание работы нашло отражение в пяти научных статьях, Шадрина О.А. является первым автором в двух из них. Также результаты работы были доложены на 8 международных конференциях. Автореферат полностью соотносится с написанной диссертацией и передает основное содержание работы.

Диссертация Шадриной О.А. «Роль клеточных белков Ku и SFPQ в транскрипции ВИЧ-1» является целостной научно-квалификационной работой, выполненной на хорошем теоретическом и экспериментальном уровне. 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.

Не вызывает сомнений, что Шадрина О.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор
главный научный сотрудник лаборатории клеточных основ
развития злокачественных заболеваний
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН
Прасолов Владимир Сергеевич



10.03.2021

Контактные данные:

тел.: 8(499)135-23-11, e-mail: prassolov45@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН
Тел.: 8(499)135-23-11, e-mail: prassolov45@mail.ru

Подпись сотрудника ФГБУН «Институт молекулярной
биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН Прасолова В.С.
удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБУН «Институт молекулярной
биологии им. В.А.Энгельгардта» РАН

к.в.н. А.А.Бочаров

11.03.2021.

