

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Шадриной Ольги Алексеевны «Роль клеточных белков Ku и SFPQ в транскрипции ВИЧ-1», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – молекулярная биология

Актуальность исследования

Диссертационная работа Шадриной О.А. посвящена изучению роли некоторых клеточных белков в транскрипции ВИЧ-1. Пандемия ВИЧ-1 существенным образом повлияла на жизнь миллионов людей по всему земному шару, что делает крайне актуальным исследование тонких механизмов регуляции всех стадий жизненного цикла этого вируса. Именно успехи в этой области позволили предложить и постоянно совершенствовать методы антиретровирусной терапии, которые снижают уровень вирусной нагрузки и продлевают жизнь ВИЧ-инфицированных людей. Однако полное излечение возможно только в случае полного удаления или инактивации вируса, что в настоящее время сделать невозможно. Лучшее понимание процессов транскрипции ВИЧ-1 может позволить разработать методы такой терапии. Хорошо известно, что транскрипция ВИЧ-1 зависит не только от вирусных белков (прежде всего – Tat), но и от множества клеточных белков. В представленной диссертации внимание сосредоточено на анализе нескольких белков. Также в работе предпринята попытка выявить посредники Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1. Все полученные данные являются новыми и актуальными для развития молекулярной биологии и ее практических применений.

Структура и объем диссертации

Диссертация Шадриной О.А. изложена на 135 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы, Дополнительные материалы. Диссертация содержит 37 рисунков и 8 таблиц. Список литературы включает 181 источник. Раздел Обзор литературы содержит общую характеристику ВИЧ-1 и подробное описание белков, которые являются предметом изучения в диссертации. Раздел завершается небольшим Заключением, которое удачно описывает проблемы, которые не могут быть решены на основе опубликованных данных, и которые являлись предметом изучения в диссертации. Экспериментальный материал изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют друг друга. Иллюстративный материал очень высокого уровня, подписи к рисункам русифицированы.

Диссертационная работа носит полноценный и заверченный характер, как в научном плане, так и в оформлении. В диссертации приведена информация об апробации работы на восьми конференциях, а также список из пяти статей в рецензируемых журналах, опубликованных по теме работы (в двух из них Шадрина О.А. занимает в списке авторов первое место). Автореферат

позволяет составить представление как о содержании диссертации, так и о выполнении всех формальных требований к тексту.

Основные результаты работы

Первая часть работы посвящена выявлению влияния белка параспеклов SFPQ на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Получены данные в пользу того, что этот белок может участвовать в регуляции транскрипции (его гиперэкспрессия ведет к повышению эффективности транскрипции). Показано, что SFPQ взаимодействует с U3 регионом длинного концевой повтора ВИЧ-1, выявлен сайт посадки SFPQ внутри U3 региона.

Вторая часть работы посвящена изучению влияния субъединиц комплекса DNA-РК на транскрипцию ВИЧ-1. Установлено, что Ku присутствует на промоторе ВИЧ-1 и положительно влияет на инициацию транскрипции с него. Напротив, каталитическая субъединица DNA-РКcs не оказывает влияния на транскрипцию с промотора ВИЧ-1. Далее, очень детально охарактеризованы РНК-связывающие свойства гетеродимера Ku человека (для выполнения этой части диссертации был разработан новый метод получения рекомбинантного His-Ku70/Ku80). Показано, что Ku предпочтительно связывается со шпилечными РНК, имеющими выпетливание рядом с терминальной петлей. Интересно, что эффект Ku на транскрипцию ВИЧ-1 не был связан с взаимодействием с TAR РНК. Это противоречие (взаимодействие есть, функциональной значимости выявить не удалось) в диссертации отмечается, но не обсуждается, хотя оно кажется достаточно интересным.

Затем было изучено взаимодействие Ku с 7SK РНК и с белками комплекса 7SK (HEXIM1 и Cdk9). Этот комплекс играет важную роль в регуляции Tat-зависимой транскрипции ВИЧ-1. Показано, что Ku прямо взаимодействует с Cdk9 и с 7SK РНК.

Завершающая часть работы посвящена поиску посредников Ku-зависимой регуляции транскрипции ВИЧ-1 с использованием методов транскриптомики и протеомики. Эту часть работы можно рассматривать в качестве хорошего задела на будущее, так как в результате выявлено несколько белков, которые могут быть вовлечены в такую регуляцию. Однако рамки диссертации явно не позволили провести даже самую простую проверку сделанных предсказаний.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Главная ценность диссертационной работы Шадринной О.А. состоит в крайне детальной молекулярно-биологической характеристике роли двух клеточных белков в регуляции транскрипции ВИЧ-1. Эти данные интересны заметно расширяют наши знания о роли компонентов клетки в регуляции жизненного цикла ВИЧ-1. При этом возникает вопрос о том, как эффекты разных белков интерферируют друг с другом, но это проблема, которая выходит за рамки диссертации. Знания о механизмах регуляции транскрипции ВИЧ-1 могут помочь в разработке новых способов терапии ВИЧ-1, поэтому потенциально работа имеет практическое значение.

Таким образом, проделанная работа и сделанные выводы имеют как теоретическую, так и практическую значимость.

Достоверность и обоснованность сделанных выводов

Проделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методическом уровне, материал изложен и проиллюстрирован крайне удачно. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических методов исследований. Выводы диссертационной работы основаны на полученных результатах и корректно сформулированы, содержание автореферата полностью отражает основные результаты и выводы диссертации.

В работе Шадринной О.А. не удалось обнаружить существенных недостатков. Из небольших недочетов можно упомянуть:

1. Текст написан крайне детально, в нем одинаково скрупулезно описываются как провалившиеся, так и успешные эксперименты. Это оправдано, если рассматривать диссертацию в качестве квалификационной работы, хотя создает некоторую сложность для анализа научной составляющей.

2. В диссертации не описаны статистические процедуры, поэтому не ясно, почему используется *t*-критерий Стьюдента, который требует выполнения некоторых условий (например, нормальное распределение выборки).

3. В работе описаны линии с моноаллельным нокаутом Ku80, Ku70 или DNA-PKcs. Не очень понятно, почему так определенно говорится об моноаллельном нокауте (линии были поликлональными). Это было показано только с помощью вестерн-блоттинга, что, вряд ли, может быть прямым подтверждением.

4. Мне не до конца понятен вывод 4 - *Впервые показано взаимодействие Ku в клетке с белками комплекса 7SK РНП HEXIM1 и Cdk9 – важными регуляторами транскрипции генов ВИЧ-1. Обнаружено непосредственное взаимодействие Ku с 7SK РНК и определен сайт связывания Ku в первой петле 7SK РНК.* В положениях, выносимых на защиту, это формулируется еще определеннее - *Обнаружено взаимодействие Ku с 7SK РНК и с белками комплекса 7SK РНП HEXIM1 и Cdk9.* Однако в тексте диссертации приводятся данные в пользу непосредственного взаимодействия Ku только с Cdk9. Для HEXIM1 делается вывод, что ассоциация с Ku происходит через 7SK РНК.

Отмеченные выше недостатки имеют отношение к тексту диссертации, а не к ее научному содержанию, т.е. не снижают общего положительного впечатления от диссертации. Самое большое сожаление вызывает, что в работе не анализировалась роль параспеклов в транскрипции ВИЧ-1. Сейчас публикуется много работ о роли биомолекулярных конденсатов в протекании различных биологических процессов, было бы интересно узнать, вовлечены ли эти структуры в регуляцию жизненного цикла ВИЧ-1. Но это не может быть замечанием, так как каждая хорошая

работа неизбежно открывает много неизвестного, а рамки диссертации не позволяют решить все возможные вопросы.

Заключение

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Шадриной Ольги Алексеевны «Роль клеточных белков Ku и SFPQ в транскрипции ВИЧ-1», 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, Шадрина Ольга Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

Шеваль Евгений Валерьевич,

Заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра

НИИ физико- химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор биологических наук

Е.В. Шеваль

16.03.2021

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: 8(495)939-55-28

E-mail: sheval_e@belozersky.msu.ru

Подпись д.б.н. Е.В. Шевалья

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

НИИ физико- химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор физико-математических наук



З.Г. Фетисова