

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Зотовой (Шунаевой) Анастасии
Андреевны на тему: «Факторы рестрикции и репликации ВИЧ-1 и
HTLV-1 в условиях межклеточной трансмиссии»
по специальности 03.03.03 – «Иммунология»

Актуальность темы исследования.

Объектами исследования в диссертационной работе Зотовой (Шунаевой) А.А. являются два вируса, относящихся к семейству ретровирусов - вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1). Оба этих вируса являются патогенными для человека. Так, ВИЧ-1 инфицированы около 37 миллионов человек по всему миру, включая 1,8 миллионов детей (World Health Organization, 2018). Инфицирование этими вирусами приводит к развитию противоположных иммунопатологических процессов. Мишенью инфекции являются CD4 Т-лимфоциты, при заражении которых ВИЧ-1 развивается синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД), а инфекция HTLV-1, напротив, после долгого латентного периода вызывает бесконтрольную пролиферацию зараженных Т-лимфоцитов и развитие острого Т-клеточного лейкоза.

На сегодняшний день, антиретровирусная терапия позволяет лишь контролировать титр вируса и не способна полностью элиминировать вирус из организма пациента. Это происходит из-за интеграции провирусной ДНК в геном человека и развития латентной инфекции. Для разработки новых лекарств необходимо понимание того, как клетка отвечает на проникновение ВИЧ и HTLV-1, какие клеточные белки, так или иначе, участвуют в этом.

Целью диссертационной работы являлось изучение факторов рестрикции ВИЧ-1 в условиях межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, а также разработка скринингового теста для поиска

факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокауты GeCKO.

Как известно, факторы рестрикции представляют собой клеточные белки, способные подавлять вирусную репликацию. Известно несколько таких факторов, однако ВИЧ успешно реплицируется в клетках. В отличие от факторов рестрикции, факторы репликации обеспечивают пермиссивность клетки для размножения вируса. С развитием омиксных технологий, геномного редактирования и высокопроизводительного скрининга стала возможной идентификация новых белков, играющих важную роль в репликации ВИЧ.

С этой точки зрения, данная диссертационная работа, является, безусловно, актуальной и направлена на поиск новых клеточных мишеней для поиска современных антиретровирусных средств.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.

Диссертационная работа Зотовой (Шунаевой) А.А. характеризуется последовательностью изложения, обоснованным выбором цели, постановкой конкретных задач для достижения этой цели. Достоверность результатов подтверждается фактическими экспериментальными данными, их воспроизводимостью и статистической обработкой.

На основании проведенной исследовательской работы автором сделаны выводы, которые логично следуют из полученных результатов и полностью отражают спектр поставленных задач. Все эксперименты проведены автором на высочайшем методическом уровне, что явилось залогом успеха диссертационной работы.

Основные результаты исследований апробированы и представлены на российских и зарубежных конференциях и опубликованы в журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.

Таким образом, достоверность результатов и выводов диссертационной работы Зотовой (Шунаевой) А.А. не вызывает сомнений.

Научная значимость, теоретическая и практическая ценность исследования.

Количественный анализ межклеточной инфекции представляет собой непростую задачу, прежде всего, из-за того, что клетки-продуценты вирусных частиц и инфицированные клетки-мишени трудно различить при совместном культивировании. В представленной работе получены оригинальные усовершенствованные интрон-регулируемые векторы, позволяющие измерять уровень межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1, не отделяя клетки-продуценты от клеток-мишеней. Созданные рекомбинантные векторы на основе флуоресцентных белков GFPt и mCherry позволили впервые оценить множественность инфицирования ВИЧ-1 в условиях межклеточной трансмиссии вируса. Что касается факторов рестрикции, то было показано, что при межклеточной трансмиссии BST2 (который снижает инфекцию ВИЧ-1 при заражении вирусными частицами), наоборот, способствует усилению репликации ВИЧ-1. Более того, он увеличивает вероятность множественного инфицирования клеток-мишеней.

Оригинальности и новизны работе придает использование библиотеки нокаутов GeCKO (genome-scale CRISPR knockout), которая содержит последовательности гидовых РНК для нокаутирования генов всего экзота человека. С помощью этой библиотеки были выявлены кандидатные гены, важные для репликации HTLV-1, ранее не описанные.

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты, кроме теоретической ценности, безусловно, имеют практическую значимость. Новые знания о взаимодействии ретровирусов с клетками человека позволят разработать оригинальные способы терапии. В работе высказывается предположение, что межклеточная трансмиссия может являться источником новых рекомбинантных форм ВИЧ, также это может объяснить и возникновение дополнительной резистентности вируса к лекарствам. Автором были получены усовершенствованные векторы для детекции репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 в условиях сокультивирования

клеток, разработаны скрининговые инфекционные тесты для поиска факторов репликации ретровирусов человека с использованием библиотеки геномных нокаутов GeCKO. Все это может стать методической базой по работе с нокаутными библиотеками CRISPR/Cas9 в ретровирусологии.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации.

Диссертационная работа построена по традиционному типу, изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы, благодарности. Список литературы содержит 238 источников. Диссертация иллюстрирована 41 рисунком и 4 таблицами.

Во введении автор раскрывает актуальность темы исследования, научную новизну и практическую значимость диссертационной работы.

В главе 1 («Обзор литературы») очень хорошим языком и стилем изложены современные основы биологии ретровирусов ВИЧ-1 и HTLV-1. Также в литературном обзоре много внимания уделено факторам рестрикции и репликации этих вирусов. Литературный обзор четко структурирован и полностью раскрывает современное состояние исследуемой проблемы.

В главе 2 («Материалы и методы исследования») автор показал себя зрелым исследователем, способным к адекватному выбору методов для решения поставленных задач. Материалы и методы изложены подробно, их описание позволит без затруднений воспроизвести используемые в работе методики. Автор широко использует самые современные методы иммунологии, молекулярной и клеточной биологии, вирусологии. Стоит отметить, что в ходе выполнения работы автором самостоятельно было написано нескольких программ на языке программирования Python.

В главе 3 («Результаты и их обсуждение») автор описывает методику усовершенствования интрон-содержащих векторов для оценки уровня межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1. Путем модификации интрона

последовательностью интрон-специфичных shRNA были получены векторы, отличающиеся высоким уровнем сплайсированной РНК в вирионах.

Известно, что функцией вспомогательных белков ВИЧ-1 является противодействие факторам рестрикции. Автор предположил, что мутировав каждый из вспомогательных генов ВИЧ-1, возможно идентифицировать факторы рестрикции клетки, которые активируются и подавляют репликацию дефектного вируса. В результате оказалось, что в лимфоидных клетках делеция в любом из вспомогательных генов ВИЧ-1 приводит к снижению инфекции свободным вирусом в 2.5-10 раз и к повышению межклеточной инфекции в 1.5 раза в случае делеции в гене *vpr*.

Далее, учитывая, что вспомогательный белок Vpr вируса противодействует клеточному фактору рестрикции BST2, автор логично поставил задачу сравнить инфекцию Vpr-дефектным вирусом на лимфоидных клетках дикого типа и нокаутных по BST2. С помощью технологии геномного редактирования была получена клеточная линия Jurkat с нокаутом по гену, кодирующему BST2. Оказалось, что Vpr-дефектный вирус более эффективно реплицируется при межклеточной трансмиссии, чем вирус без мутации. В отсутствие Vpr клеточный фактор рестрикции BST2, как известно, удерживает частицы у поверхности клеток-продуцентов. Это, по-видимому, способствует более эффективному заражению клеток-мишеней.

На мой взгляд, успех работы во многом определил проведенный полногеномный скрининг библиотеки нокаутов GeCKO в целях поиска новых факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1. Были подобраны оптимальные алгоритмы обработки данных секвенирования. Выявлены потенциальные факторы репликации HTLV-1, гены *KPNA1* и *KPNA4* семейства импортинов, а также ряд генов, важных для репликации ВИЧ-1, среди которых особенный интерес представляют гены *GP340* и *SGK1*.

Работу, безусловно, украшает разработанный метод SORTS, который позволяет с помощью клеточного сортера проводить быструю селекцию пула клеток, в которых произошел биаллельный нокаут по генам, кодирующим внутриклеточные или секретируемые белки. С помощью этого метода получен и верифицирован нокаут по гену *KPNA1* в клетках HEK 293T.

Экспериментальные данные подтверждены правильно выбранными статистическими методами анализа, достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Описание результатов выполнено чрезвычайно подробно, оформлено наглядно и логично структурировано.

В разделе «Заключение» глубоко проанализированы результаты собственных исследований, выделены наиболее значимые и важные.

Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, базируются на результатах работы, аргументированы, обоснованы и достоверны.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 7 тезисов.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Автореферат хорошо иллюстрирован, логично оформлен и дает полное представление о проделанной работе и ее отдельных этапах.

Существенные недостатки у диссертационной работы отсутствуют, имеются лишь отдельные замечания, которые не снижают общей положительной оценки работы.

1. Стр. 13. «В центре вириона находится конусообразный капсид, в котором содержится геномная РНК». Скорее всего, речь идет о нуклеокапсиде.
2. Не понятно, почему в работе отсутствует список сокращений. Так, например, на стр. 35 говорится о IGS. При этом, в тексте не удалось найти расшифровку этой аббревиатуры.

3. Стр. 42. На мой взгляд, обзор литературы можно было закончить кратким резюме всего написанного, а не обрывать его путем констатации факта, что «tat-специфичные shRNA на 80% более эффективно подавляют репликацию вируса, будучи процессированными с pre-miRNA предшественника».
4. Стр. 43. Мне не удалось найти информацию о штамме *E.coli* под названием Lucigen. Возможно имелся ввиду какой-то конкретный штамм производства компании Lucigen?
5. Стр. 81. Рис. 25. Какой статистический критерий использовался? На диаграмме В, на первый взгляд, отличия статистически недостоверны.
6. Стр. 83. Таблица 3. Не понятно значение цифр в таблице. Если это относительная экспрессия, то относительно чего?
7. Хотя и довольно редко, но в тексте встречаются жаргонизмы, например, «разрезали», «затупляли» и т.д.

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 03.03.03 – «Иммунология» (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 Зотова (Шунаева) Анастасия Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.03 – «Иммунология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,

заведующий отделом клеточной биологии,

заведующий лабораторией генной инженерии

Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства"

Лазарев Василий Николаевич

10.09.2019 г.

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – «Молекулярная биология»

Адрес места работы:

119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а,
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства" (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)
Тел.: 7 (499) 246-7721; e-mail: info@rcpcm.org

Подпись сотрудника Лазарева Василия Николаевича удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Е.С.Кострюкова

10.09.2019 г.

