

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

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ-1) и Т-лимфотропный вирус человека первого типа (HTLV-1) относятся к семейству ретровирусов и являются патогенными для человека. Для лечения ВИЧ-инфекции разработан широкий спектр лекарственных препаратов, позволяющих контролировать вирусную репликацию и предотвращать развитие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Однако особенности репликации ретровирусов, например, отсутствие редактирующей активности у обратной транскриптазы, приводят к появлению в организме пациентов резистентных штаммов вируса, поэтому актуальной остается задача поиска альтернативных мишеней для создания антиретровирусных препаратов. В случае HTLV-1 на сегодняшний день не существует специфичной терапии. Все осложняется особым способом передачи HTLV-1: заражение новых клеток происходит исключительно за счет межклеточной передачи вируса, а не свободными вирусными частицами.

Несмотря на существование целого ряда клеточных факторов рестрикции, противодействующих ВИЧ-1 и HTLV-1 на разных этапах их репликации, вирусы, тем не менее, успешно реплицируются в клетках в связи с экспрессией вспомогательных вирусных белков, блокирующих действие факторов рестрикции. При этом эффективность клеточной рестрикции зависит от способа передачи вируса. Изучение механизмов клеточного ответа на проникновение ВИЧ-1 и HTLV-1, а также механизмов вирусного противодействия им может способствовать созданию лекарств, направленных на новые клеточные мишени.

Актуальность работы А.А. Зотовой определяется как раз тем, что в ней подробно исследованы роли известных факторов рестрикции ВИЧ-1 в условиях межклеточной инфекции и инфекции свободным вирусом, а также были определены новые факторы репликации ВИЧ-1 и, что особенно интересно, HTLV-1. Получение подобного рода принципиально новых научных результатов во многом стало возможным благодаря тому, что А.А. Зотова разработала скрининговый тест для поиска факторов репликации ВИЧ-1 и HTLV-1 с помощью библиотеки нокаутов GeCKO.

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые были получены усовершенствованные интрон-регулируемые векторы, позволяющие с высокой чувствительностью измерять уровень межклеточной инфекции ВИЧ-1 и HTLV-1, не отделяя клетки-продуценты от клеток-мишеней. Эти векторы, кодирующие белки GFP_{rt} и mCherry, позволили автору впервые продемонстрировать, что поверхностный белок BST2 повышает инфекционность ВИЧ-1 при межклеточной передаче и увеличивает вероятность инфицирования клеток-мишеней двумя и более вирусными частицами. Также А.А. Зотова провела сравнительный анализ репликации ВИЧ-1, дефектного по одному из вспомогательных белков, в условиях межклеточного контакта и инфекции свободным вирусом. В работе с помощью скринингового протокола также выявлены некоторые интересные гены-кандидаты, важные для репликации ВИЧ-1 и HTLV-1, роль которых в биологии данного вируса ранее не была установлена.

Диссертационная работа дополняет знания о молекулярных механизмах взаимодействия ретровирусов человека с клетками хозяина и открывают новые пути лекарственного воздействия на репликацию вируса. Помимо решения важных фундаментальных вопросов, работа А.А. Зотовой решает и практические задачи. Так, в ходе выполнения диссертационного исследования, разработан и валидирован метод определения специфичности моноклонального антитела с помощью

библиотеки нокаутов GeCKO, что может быть использовано для решения широкого спектра биотехнологических задач.

Диссертация А.А. Зотовой построена по стандартному принципу и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы и список литературы, включающий 238 источников. Содержание диссертации полностью соответствует специальности. Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методологические подходы реализации проекта, а также сформулированы цели и задачи диссертационной работы. В обзоре литературы приведены общие сведения о биологии ВИЧ-1 и HTLV-1. Описаны известные на данный момент клеточные факторы рестрикции и репликации этих вирусов, а также механизмы противодействия вирусов клеточной защите. Показана значимость способа передачи вируса от клетки к клетке для эффективности борьбы с ретровирусной инфекцией. Представлены способы идентификации новых факторов рестрикции и репликации, в том числе, приведены сведения о библиотеке нокаутов GeCKO, применявшейся в скрининге факторов репликации в данной работе.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание материалов и характеристику методов исследования. Этот раздел написан достаточно подробно с указанием всех необходимых шагов, что позволяет читателю, при желании, воспроизвести описанные в диссертации эксперименты.

Раздел «Результаты и обсуждения» состоит из четырех смысловых частей. В первой части А.А. Зотова разрабатывает репортерные векторы на основе различных флуоресцентных белков, содержащие интрон в последовательности генов-репортеров. В результате подбора сайта встраивания интрона автору удалось подобрать конструкции, обеспечивающие высокие уровни продукции сплайсированной РНК,

являющейся геномом псевдовиральных частиц. А.А. Зотова продемонстрировала возможность использования разработанных ею векторов, кодирующих GFP и mCherry, для оценки заражения клеток двумя и более вирусными частицами, что особенно важно для изучения межклеточной передачи вируса.

Во второй смысловой части работы диссертант изучает эффекты «выключения» вспомогательных белков ВИЧ-1 на инфекционность вируса при межклеточной передаче вируса или заражении свободными вирусными частицами. Эти эксперименты были осуществлены как на модифицированной клеточной линии 293T/CD4/X4, так и на лимфоидной клеточной линии Raji/CD4. Использование последних продиктовано более низким уровнем экспрессии факторов рестрикции ВИЧ-1 в клетках 293T, что может искажать роль вспомогательных белков ВИЧ-1. А.А. Зотова, используя псевдовirus, дефектные по *vpr/vpu/vif/nef*, оценила эффект делеции вспомогательных белков на уровень множественной инфекции в лимфоидных культурах клеток. Данный показатель не менялся для Vpr-/Vif-/Nef-дефектного ВИЧ-1 в сравнении с контролем, тогда как делеция Vpu приводила к увеличению количества двойных позитивных клеток, т.е. клеток, инфицированных как минимум двумя вирусами одновременно. Также А.А. Зотова установила, что делеция Vpu приводит к удержанию вирусных частиц на поверхности клеток за счет фактора рестрикции BST2, что повышает вероятность инфицирования несколькими вирусными частицами при межклеточной передаче инфекции.

В третьей части работы диссертант применяет разработанный им подход, предполагающий использование библиотеки нокаутов GeCKO, для поиска новых факторов репликации HTLV-1. Использование данного подхода позволило выявить новые факторы, потенциально вовлеченные в репликацию HTLV-1.

В четвертой части работы А.А. Зотова применяет аналогичный подход для скринингового поиска факторов репликации ВИЧ-1. В результате этого

скрининга были идентифицированы 46 генов, среди которых как ранее описанные ко-факторы ВИЧ-1, так и новые гены, требующие дальнейшей проверки. Тот факт, что среди обнаруженных генов были ранее идентифицированные в альтернативных работах регуляторы ВИЧ-инфекции можно рассматривать в качестве работоспособности предложенного в диссертационной работе подхода.

Представленные в работе выводы логичны, обоснованы, соответствуют целям диссертационного исследования и полностью отражают результаты проведенной работы.

Автореферат диссертации полностью соответствует тексту диссертации и отражает все основные разделы работы, выводы и результаты. По теме диссертационного исследования опубликовано 12 работ, в том числе 5 статей в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены на российских и международных научных конференциях, симпозиумах и съездах.

В качестве замечаний можно отметить: 1) Отсутствие ссылок на опубликованные работы в разделе 1.1. в части, посвященной описанию общего строения вириона ВИЧ-1, а также его генома (страницы 13-14); 2) На странице 15 не совсем корректно описан процесс обратной транскрипции: «... после чего в РНК:ДНК дуплексе расщепляется РНК. ДНК мигрирует затем в ядро, где интегрируется в геном...»; 3) Из текста на странице 66 непонятно, с каким вектором сравнивали inRFpt-2: «Как показано на рисунке 13Б, конструкция inRFpt-2 лишь немного превосходила вектор inRFpt-2 по способности экспрессировать полноценный белок-репортер»; 4) Автор работы ссылается на 82 странице на рисунок 27, чтобы продемонстрировать экспрессию BST2 на поверхности клеток 293Т, хотя рисунок 27 не содержит подобных иллюстраций.

К соискателю возникло два вопроса. Во-первых, в каких единицах представлены данные по экспрессии известных факторов рестрикции в различных клеточных линиях (Таблица 3)? Во-вторых, возможно ли

применение предложенного в диссертационной работе метода для определения специфичности антитела для поиска антител к внутриклеточным белкам?

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

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,
научный сотрудник кафедры химии природных
соединений химического факультета
ФГБОУ высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Анисенко Андрей Николаевич

19 сентября 2019

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3,
химический факультет, ФГБОУ высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова».
Тел.: 7(495)9395407; e-mail: a_anisenco@kodomofbb.msu.ru.