

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора химических наук Анисенко Андрея Николаевича
на тему: «Постинтеграционная репарация ВИЧ-1 и
ингибиторы этого процесса»
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Актуальность. С момента открытия вируса иммунодефицита человека прошло более сорока лет, за это время созданы препараты разных типов, ингибирующие как активность вирусных ферментов (обратная транскриптаза, интегразы и протеазы), так и процессы взаимодействия вируса с клеточными рецепторами и его слияния с клеткой. Современная антиретровирусная терапия обычно включает два или три препарата, что существенно продлевает жизнь пациентам с ВИЧ-инфекцией и замедляет ее переход в стадию СПИДа, однако полного выздоровления не происходит. Высокая изменчивость ВИЧ приводит к образованию резистентности к применяемым препаратам. В этих условиях поиск новых вирусных и клеточных мишеней, а также создание принципиально новых классов ингибиторов является не просто актуальной, а критически важной задачей. Диссертация А.Н. Анисенко посвящена детальному изучению наименее исследованного этапа жизненного цикла ВИЧ-1 – постинтеграционной репарации – и разработке на основе полученных фундаментальных знаний оригинальных ингибиторов, блокирующих взаимодействие вирусной интегразы с клеточным белком Ku70.

Научная новизна и общая характеристика работы. Представленная работа является примером того, как глубокое фундаментальное исследование молекулярного механизма процессов,

лежащих в основе вирусной репликации, ведёт к созданию прототипов новых лекарственных средств. Автором подробно изучен механизм постинтеграционной репарации ВИЧ-1, определена роль вирусных и клеточных белков в регуляции этого процесса, продемонстрировано, что, хотя весь каскад реакций, направленных на восстановление целостности интеграционного интермедиата, и осуществляется клеточными белками, инициация этого процесса напрямую зависит от способности вирусной интегразы взаимодействовать с клеточным белком Ku70. Именно это наблюдение и легло в основу идеи создания ингибиторов постинтеграционной репарации ВИЧ-1, действующих путем нарушения взаимодействия вирусной интегразы и клеточного белка Ku70.

Неоспоримым достоинством данной работы является использование широкого спектра современных молекулярно-биологических и вирусологических методик, включая оригинальные, разработанные или модифицированные автором диссертации для достижения цели исследования.

Структура и содержание диссертации. Диссертация изложена на 204 страницах, содержит 64 рисунка и 5 таблиц, построена по классическому принципу. Обзор литературы плавно подводит читателя к логическому обоснованию цели и задач работы. Автор не ограничивается рассмотрением классических антиретровирусных препаратов, а детально разбирает современные стратегии контроля над вирусной инфекцией и потенциальные подходы к полной элиминации вируса (блокаторы белок-белковых взаимодействий, препараты длительного действия, подходы «Shock and Kill» и «Block and Lock»). Это позволяет объективно оценить место данного исследования в общем ландшафте работ по созданию противовирусных препаратов.

Главы «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение» свидетельствуют о владении автором широким спектром методов – от молекулярного докинга и проверки идей *in vitro* до использования сложных клеточных моделей ВИЧ-инфекции и анализа отдельных этапов вирусной репликации в клетках. Экспериментальная часть содержит последовательное выдвижение и проверку гипотез о механизмах инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1, участниках ранних и поздних этапов постинтеграционной репарации ВИЧ-1, поиск новых потенциальных мишеней для подавления ВИЧ инфекции и алгоритм создания ингибиторов нового типа. Диссертационная работа А.Н. Анисенко представляет собой логично выстроенное и качественно проведенное исследование, где каждый новый раздел следует из предыдущего; написана хорошим научным языком.

Ключевые научные результаты и их интерпретация. В первом разделе автор сосредоточился на изучении механизмов инициации постинтеграционной репарации ВИЧ-1. Автор убедительно доказывает, что киназы DNA-PK и ATM, традиционно ассоциируемые с репарацией двуцепочечных разрывов, критически важны для постинтеграционной репарации, несмотря на отсутствие таких разрывов в интеграционном интермедиате. Ключевой вывод – их активация происходит последовательно сразу после интеграции вирусной ДНК и зависит от способности интегразы ВИЧ-1 взаимодействовать с Ku70-субъединицей DNA-PK. Будучи активированными они автофосфорилируются, а также фосфорилируют свои классические мишени H2AX и Chk2 по IN-Ku70-зависимому пути. Таким образом, автор демонстрирует, что ранние события постинтеграционной репарации ВИЧ-1 и репарации двуцепочечных разрывов ДНК во многом схожи, однако, отсутствие двуцепочечных разрывов ДНК в интеграционном интермедиате ВИЧ-1 делает

невозможным участие ферментов из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК на поздних этапах постинтеграционной репарации.

Понимая это, Анисенко А.Н. предложил несколько подходов, для выявления других потенциальных участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1, включая те, которые могли бы завершать этот процесс. С использованием методов XL-MS и ChIP-MS автор продемонстрировал, что к сайтам интеграции вирусной кДНК рекрутируются не только белки из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК, но и ферменты эксцизионной репарации оснований (BER), которые, как раз и могли бы восстановить целостность интеграционного интермедиата. Участие компонентов BER-пути в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 автор подтверждает на примере белков PARP1/PARP2 и Fen1.

В финальной части работы А.Н. Анисенко переходит от изучения фундаментальных механизмов постинтеграционной репарации ВИЧ-1 к созданию ингибиторов этого процесса и экспериментальной проверке возможности подавления вирусной репликации путем воздействия на этот этап жизненного цикла. Поскольку инициация процесса постинтеграционной репарации строго зависит от способности вирусной интегразы формировать комплекс с Ku70, А.Н. Анисенко логично предполагает, что соединения, препятствующие взаимодействию исследуемых белков, могут выступать в качестве ингибиторов постинтеграционной репарации.

Картирование сайта связывания интегразы в составе Ku70 (остатки I72, S73, I76) позволило автору исследования провести таргетный поиск таких ингибиторов. Благодаря сочетанию *in silico* и *in vitro* подходов было обнаружено соединение s17, которое успешно блокирует взаимодействие исследуемых белков. С использованием безопасной модели ВИЧ-инфекции продемонстрирована принципиальная возможность подавления ранних этапов репликации ВИЧ-1 такими соединениями. Стоит

отметить, что s17 в такой системе нарушал именно этап постинтеграционной репарации, а не другие этапы вирусной репликации, что однозначно подтверждает исходную гипотезу автора.

К недостаткам работы можно отнести только несколько неточных формулировок и опечаток, перечисленных ниже.

В ОБЗОРЕ ЛИТЕРАТУРЫ:

- на рисунке 2 (стр 19) этапы транскрипции обозначены заглавными буквами, а в подписи к рисунку цифрами

- в последнем абзаце на стр 20 упомянуты « ... НИОТ – модифицированные аналоги различных гетероциклических оснований, которые имеют такой же механизм действия, как и АЗТ...», в то время как НИОТ (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) это аналоги нуклеозидов, в большинстве из которых модифицирован углеводный фрагмент, а не гетероциклическое основание

- на подписи к рисунку 4 (стр 22) и в описании этого рисунка в тексте сказано “тенофовир дизопроксил фумарат (TDF) и его депо-форма тенофовир алафенамид (TAF)”. На самом деле TAF не является депо-формой TDF, но обе представленные структуры являются депо-формами тенофовира

- в последнем абзаце на стр 27 вместо рисунка 8, обсуждаемого в тексте приведен номер несуществующего рисунка 5А

- в подписи к рисунку 11 (стр 36) упомянуты предшественники BSM-378806 и BSM-488043, которых на рисунке нет

- в последнем абзаце на стр 44 вместо рисунка 13, на котором показано соединение GS-9822, ошибочно приведен номер рисунка 15

- в слове эрадикация в первом абзаце раздела 2.4.2. две опечатки

В разделе МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- подраздел 3.1. фрагмент «PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit или PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, США)» повторяется в тексте два раза подряд.

В разделе РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:

- на мой взгляд рисунок 38 противоречит подтвержденной автором в разделе 4.1.5 гипотезе о последовательной активации DNA-PKcs и ATM

- неудачные предложения на стр 143 «Мы предложили использовать новый метод, представляющий собой синтез классического подхода по соосаждению белков на аффинном сорбенте, но для детекции как белка-мишени, так и целевого белка использовать генетически закодированные флуоресцентные метки, как в случае метода FluorIA.» и на стр 146 «Мы проверили, способны ли такие модифицированные белки GST-mCer-IN и His6-Ku70-tRFP классическим методом соосаждения белков.»

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 специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Анисенко Андрей Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений
ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

Хандажинская Анастасия Львовна

13 мая 2026

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.3. – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32

ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений

Тел.: 7(499)1356065; e-mail: isinfo@eimb.ru

Подпись сотрудника ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН

А.Л. Хандажинской удостоверяю:

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

к.ф.-м.н Коновалова Е.В.
13 мая 2026