

**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**

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), обуславливающий развитие СПИДа, остаётся и в наше время крайне опасным патогеном, поскольку он лишает организм способности противостоять инфекциям, в том числе оппортунистическим. Подробное изучение молекулярных основ этапов развития и размножения ВИЧ позволило создать широкий спектр противовирусных препаратов. Основу современных препаратов антиретровирусной терапии (АРТ) составляют комбинации ингибиторов вирусных ферментов, а именно, обратной транскриптазы, интегразы и протеазы. Благодаря наличию широкого спектра препаратов АРТ данное заболевание перешло из категории смертельно опасных в хронические инфекции.

Несмотря на значительные успехи АРТ, проблема ВИЧ-инфекции ещё очень далека от решения. Основные проблемы – это быстрое развитие лекарственной устойчивости, необходимость пожизненного приема препаратов и отсутствие средств, полностью освобождающих организм от вируса. В этой связи создание новых классов и типов ингибиторов репликации вируса является актуальной и стратегически важной задачей, однако, её решение невозможно без углубления нашего понимания процессов, которые лежат в основе репликации вируса и участия в них компонентов зараженных клеток.

Диссертация А.Н. Анисенко посвящена одному из наименее изученных этапов жизненного цикла ВИЧ-1 – постинтеграционной репарации, которая завершает встраивание ДНК-копии вирусного генома в ДНК клетки-хозяина. Работа лежит на стыке молекулярной вирусологии, молекулярной биологии и химической биологии. Её цель заключается не только в изучении фундаментальных основ механизмов постинтеграционной репарации ВИЧ-1, но и в создании ингибиторов этого процесса. Безусловно, такая постановка вопроса

соответствует мировому тренду поиска новых групп ингибиторов и является высоко актуальной.

Известно, при интеграции ДНК-копии генома ВИЧ-1 в клеточную ДНК формируется повреждение с уникальной ДНК-структурой: по обоим краям от встроенной вирусной ДНК формируются пятинуклеотидные одностранные участки клеточной ДНК и неспаренные АС-динуклеотиды на 5'-концах вирусной ДНК. Репарация такого повреждения предшествует дальнейшим событиям жизненного цикла ВИЧ-1. Долгое время господствовала точка зрения, что указанные повреждения напрямую узнаются и исправляются репаративными системами клетки без участия белков вируса. Отсутствие адекватных методов оценки эффективности постинтеграционной репарации (ПИР) не позволяло детально изучить механизм этого процесса, хотя и высказывались определенные предположения о возможных клеточных участниках этого процесса.

Работа А.Н. Анисенко является глубоким многоплановым и цельным экспериментальным исследованием молекулярных основ процесса постинтеграционной репарации ВИЧ-1, что позволило предложить оригинальные ингибиторы репликации вируса. Прежде всего в работе А.Н. Анисенко был разработан и успешно применен метод оценки эффективности ПИР, что легло в основу детального изучения участия клеточных факторов в процессе постинтеграционной репарации. Это определяет научную новизну и оригинальность диссертационной работы А.Н. Анисенко, а также свидетельствует об уникальной способности диссертанта использовать арсенал разнообразных методов из сопредельных областей.

Диссертационная работа А.Н. Анисенко построена по традиционной схеме и включает в себя: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, включающий 411 источников. Диссертационная работа изложена на 204 страницах, содержит 64 рисунка и 5 таблиц.

Обзор литературы посвящен подходам к ингибированию репликации ВИЧ-1. Он построен логично, скрупулезно написан, органично связан с темой

диссертационной работы и состоит из четырех больших частей. В первой части автор рассматривает многообразие классических ингибиторов репликации ВИЧ-1, включая ингибиторы обратной транскриптазы, интегразы и протеазы, в том числе и те, которые применяются в настоящее время в медицинской практике. Вторая часть описывает ингибиторы вирусной репликации, в основе действия которых лежит нарушение взаимодействия вирусных и клеточных белков. В третьей части рассматриваются антиретровирусные препараты длительного действия, применение которых позволяет существенно снизить кратность приема терапии, а в четвертой – принципиально новые экспериментальные подходы по элиминации вируса из инфицированного организма, которые находятся лишь на стадии разработки. Поскольку в своей работе А.Н. Анисенко не только исследует механизм постинтеграционной репарации, но и разрабатывает ингибитор(ы) этого процесса, именно информация о существующих и новых стратегиях борьбы с ВИЧ-инфекцией позволяет максимально полно оценить значимость разработок автора.

Диссертационную работу А.Н. Анисенко отличает четко выдержанное направление повествования – от описания участия двух протеинкиназ из систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК (DNA-РК и АТМ) в постинтеграционной репарации ВИЧ-1 в качестве инициаторов этого процесса, механизма их привлечения к местам интеграции и активации, которое в условиях отсутствия двуцепочечных разрывов ДНК происходит за счет взаимодействия интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70, до погружения в детали дальнейших событий постинтеграционной репарации. В завершение, автор переходит к разработке ингибиторов постинтеграционной репарации ВИЧ-1, нарушающих взаимодействие интегразы и белка Ku70.

Уже на начальных этапах исследования автору удалось изучить ранние события постинтеграционной репарации ВИЧ-1, а также показать, что активация АТМ и DNA-РК на интеграционном интермедиате ВИЧ-1 в столь необычном контексте приводит к фосфорилированию мишеней этих киназ, которые, обычно, модифицируются лишь при возникновении двуцепочечных разрывов

ДНК. Таким образом, как минимум на ранних этапах постинтеграционная репарация похожа на репарацию двуцепочечных разрывов ДНК, но этот процесс запускается лишь в том случае, если интегразы взаимодействует с Ku70-субъединицей DNA-РК. Введение мутаций в состав интегразы, нарушающих взаимодействие двух белков, препятствует привлечению и активации этих киназ, и, как следствие, нарушает дальнейшую передачу сигналов. Это свидетельствует о потенциальной возможности таргетного воздействия на эту мишень.

На втором этапе исследования А.Н. Анисенко продолжил поиски дальнейших участников постинтеграционной репарации ВИЧ-1. С использованием метода иммунопреципитации хроматина с последующей идентификацией белков автору удалось показать, что к местам встраивания вирусной кДНК привлекается широкий спектр факторов репарации ДНК (53 белка). Среди них оказались как инициаторные и регуляторные белки систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК (Ku70, Ku80, DNA-РКcs, Mre11, Rad50), так и ферменты из эксцизионной репарации оснований — APEX1, Fen1, полимеразы β , лигаза III и PARP1. С использованием ингибитора парилирующей активности PARP1 и PARP2, а также путем нокдауна Fen1 автору удалось подтвердить участие ферментов из BER-пути в постинтеграционной репарации ВИЧ-1.

Более того, А.Н. Анисенко удалось сформулировать гипотезу о совместном участии факторов репарации двуцепочечных разрывов ДНК и компонентов BER-пути, которая логично объясняет столь сложный механизм постинтеграционной репарации: интеграционный интермедиат ВИЧ-1 сразу после встраивания вирусной кДНК стабилизирован и маскирован молекулами интегразы, что делает его недоступным для прямого узнавания ферментами эксцизионной репарации оснований. Поэтому сначала комплекс вирусной интегразы с клеточным белком Ku70 рекрутирует и активирует киназы DNA-РК и АТМ — ключевые факторы репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Эти киназы через фосфорилирование гистона H2AX и других мишеней запускают ремоделирование хроматина, что приводит к «демаскировке» повреждения.

После этого образовавшиеся одноцепочечные бреши и неспаренные динуклеотиды становятся доступными для ферментов BER-пути (Fen1, PARP1, ДНК-полимераза β , лигаза III), которые завершают репарацию.

В третьей части работы А.Н. Анисенко сконцентрировал свое внимание на поиске путей ингибирования постинтеграционной репарации ВИЧ-1, блокирующего взаимодействие интегразы ВИЧ-1 и клеточного белка Ku70. Принципиальная возможность блокировки данного взаимодействия была продемонстрирована с использованием конъюгатов олигонуклеотидов с эозином, которые, заякориваясь эозиновой частью в С-концевом домене интегразы, своей олигонуклеотидной частью дотягиваются до сайта связывания Ku70 и экранируют его. К сожалению, интеграза оказалась непригодна для создания низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия двух белков, поэтому автор работы переключился на разработку соединений, взаимодействующих с Ku70.

Для этого А.Н. Анисенко сначала детально охарактеризовал сайт связывания интегразы в Ku70, идентифицировав критически важные остатки I72, S73 и I76. Затем, используя итеративный молекулярный докинг и разработанный автором флуоресцентный скрининг, было отобрано низкомолекулярное соединение s17, которое связывается с Ku70 и блокирует его взаимодействие с IN с IC₅₀ 13 мкМ. Данное соединение подавляло ранние этапы репликации ВИЧ-1 (EC₅₀ ~12 мкМ), действуя на этап постинтеграционной репарации. Стоит отметить, что обнаруженное в работе соединение не влияло на каноническую функцию Ku70 – репарация двуцепочечных разрывов по NHEJ-пути. Наконец, проведя анализ структуры-активности, автор получил более стабильный и активный аналог benz17 (EC₅₀ 8 мкМ), что открывает перспективы для дальнейшей оптимизации ингибиторов.

Таким образом, данные, полученные в ходе выполнения настоящего диссертационного исследования, проливают свет на наименее изученный этап жизненного цикла ВИЧ – постинтеграционную репарацию, а также демонстрируют принципиальную возможность подавления репликации вируса

путем нарушения этого этапа. Эти результаты будут полезны для создания высокоэффективных ингибиторов нового типа для подавления репликации вируса. В исследовании использовали современные общепринятые методики измерений и оборудование, отвечающее международным стандартам, эксперименты выполнены не менее, чем в 3 повторах и статистически значимы. Положения, выносимые на защиту, полностью обоснованы, выводы достоверны и адекватно отражают решения поставленных задач.

Автореферат диссертации в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Для доказательства участия белков системы эксцизионной репарации оснований автор выбрал воздействие на FEN1 и PARP1. Непонятно, чем обусловлен выбор именно этих мишеней, а не, например, ДНК-полимеразы бета или ДНК-лигазы 3. Выбор PARP1 выглядит не самым логичным с учетом участия ее во множестве других клеточных процессов.

Следует отметить, что в целом диссертация написана хорошим русским языком и содержит приемлемое количество опечаток. В тоже время, автор использует написание “трансфЕцировать/трансфЕцированный” вместо закрепившегося “трансфИцировать/трансфИцированный” (видимо по аналогии с инфЕкция/инфИцировать).

На рис. 51 Диссертации и аналогичном рисунке 14 Автореферата в заголовке 3-его столбца пропущено “IC”.

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, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

Лаврик Ольга Ивановна

05.05.2026

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, проспект Акад. Лаврентьева, д.8,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, лаборатория биоорганической химии ферментов
Тел.: 7(383) 363-51-50; e-mail: niboch@1bio.ru

Подпись сотрудника ИХБФМ СО РАН Лаврик Ольги Ивановны
удостоверяю:

Ученый секретарь, к.б.н.

Е.Б. Логашенко

05.05.2026