

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертацию на соискание ученой
степени
кандидата химических наук Кихай Татьяны Фёдоровны
на тему: «Влияние клеточного белка SFPQ на репликацию вируса
иммунодефицита человека типа 1»
по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Кихай Т.Ф. затрагивает чрезвычайно актуальную тему поиска мишеней и создания принципиально новых лекарственных средств, обладающих противовирусной активностью. Несмотря на безусловные успехи в предотвращении (за счет создания более эффективных вакцин) и лечении заболеваний вирусной этиологии, быстрая эволюция вирусов, а особенно, ретровирусов, к которым относится вирус иммунодефицита человека 1 типа, приводит к быстрой адаптации вирусов к традиционным противовирусным препаратам – аналогам природных нуклеозидов. Принцип действия этих соединений основан на прекращении/угнетении репликации вирусных нуклеиновых кислот при включении неприродных нуклеозидов. В качестве мишеней могут рассматриваться также другие ферменты вируса, например, протеазы, отвечающие за расщепление полипротеинов, образующихся при трансляции вирусных РНК. Мишени вирусного происхождения, на которые направлены существующие препараты, в принципе, морально устарели, так как не позволяют решить проблему резистентности вируса к препаратам.

В данной квалификационной работе использован совершенно другой подход, который, вполне возможно, позволит изменить принципы поиска лекарств против ВИЧ-1. Он направлен на изучение механизмов взаимодействия репликационного аппарата и компонентов интегразного комплекса с клеточными белками, которые могут ингибировать или

наоборот, способствовать реализации заложенной в вирусе патологической программы. Автором диссертации было предложено на основании функциональных тестов сфокусироваться на взаимодействиях белка SFPQ и его партнера, белка NONO с интегразой и обратной транскриптазой вируса, которое может усиливать интеграцию в геном хозяина вирусной ДНК и способствует пост-интеграционной репарации. Поскольку в случае белка SFPQ, действительно наблюдали увеличение числа инфицированных клеток и увеличенный выход вирусных РНК, то, по сути, в экспериментах по прямому связыванию было показано, что образующийся с интегразой, но не с обратной транскриптазой, комплекс обладает повышенной способностью встраивать вирусную ДНК в геном клеток. Таким образом, был установлен новый механизм эксплуатации вирусом клеточных белков для повышения вирулентности, что позволило доказать перспективность создания новых препаратов, направленных на нарушение взаимодействия белка SFPQ с интегразой ВИЧ. Эти, безусловно ценные и актуальные результаты имеют высокое теоретическое и практическое значение, поскольку приближают нас к созданию принципиально нового класса антиретровирусных препаратов.

Научная новизна результатов исследования.

Научная новизна работы, в значительной степени, определена использованием методического подхода с использованием репортерной вирусной системы, которая позволяет заражать клетки НЕК293Т репликационно дефектным вирусом ВИЧ, несущим в геноме последовательность, кодирующую люциферазу. Данная система отлично подходит для изучения ранних событий инфекции, в том числе, интеграцию в геном и транскрипцию вируса. Использование данной системы позволило количественно оценить позитивное влияние белка SFPQ на интеграцию и транскрипцию репортерного вируса. С другой стороны, был получен важный негативный результат, определивший, что белок NONO не влияет

на встраивание в геном вируса, так как не связан с интегразой. Было создано семейство конструкций, кодирующих интегразу, обратную транскриптазу, белки NONO и SFPQ в виде химер с аффинными тэгами, что позволяет очистить белки в индивидуальном виде, провести прямые эксперименты по связыванию *in vitro*, а также совместному выделению белков. Эти новые результаты предоставляют прямые доказательства взаимодействия между интегразой ВИЧ и SFPQ, а также отбрасывают версию участия NONO в ранних стадиях инфицирования клеток.

Более того, оригинальный подход пептидного «фишинга» с использованием масс-спектрометрии позволил локализовать области SFPQ и интегразы, необходимые для связывания, а затем провести направленный точечный мутагенез для определения остатков аминокислот участвующих в связывании белков друг с другом. В результате было определено, что существуют два независимых механизма влияния белка SFPQ на интеграцию в геном и постинтеграционную репарацию. Первый зависит от связывания с интегразой, поскольку мутанты со сниженным связыванием интегразы характеризует сильно сниженная эффективность встраивания в геном. Второй механизм, а именно, пост-интеграционная репарация не зависит от интегразы. Кроме этого, были проведены тесты на влияние SFPQ на эффективность работы системы NHEJ, а также в экспериментах по образованию комплексов с ДНК продемонстрированы эффекты мутаций в SFPQ и интегразе на способность связывать ДНК. Полученные в ходе работы результаты позволяют уточнить структурные данные о связывании SFPQ и интегразы, а также более полно понять, за счет какого механизма белок SFPQ может способствовать интеграции и транскрипции ВИЧ.

Научно-практическая и теоретическая значимость.

Научно-практическая ценность работы заключается в находке новой потенциальной мишени – интерфейса связывания обратной транскриптазы ВИЧ и белка SFPQ человека – которая может быть использована для

создания блокаторов этого взаимодействия. Потенциально, понимание структурных основ этого взаимодействия, вероятно, позволит создать новые таргетные препараты – ингибиторы интеграции ВИЧ. Теоретическая значимость заключается в существенном увеличении наших знаний о взаимодействии белков клетки с интеграционным аппаратом ВИЧ.

Степень обоснованности и достоверности положений и выводов.

Достоверность положений и выводов диссертационной работы Кихай Т.Ф. подтверждена публикациями в 4 высокорейтинговых рецензируемых изданиях, несомненным является большой вклад автора в получении результатов и написании статей.

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа Татьяны Фёдоровны Кихай изложена на 117 страницах, включает 6 таблиц и 23 рисунка, а также одно приложение. Текст диссертации содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Список цитированной литературы включает 179 источников.

В обзоре литературы подробно описаны жизненный цикл ВИЧ, в то же время ясно и довольно лаконично изложены основные молекулярные механизмы, отвечающие за слияние вируса с клеткой, обратную транскрипцию, встраивание в геном, транскрипцию и создание новых вирионов. Я получил большое удовольствие от чтения данного раздела. Следует особо отметить хорошо структурированный и написанный грамотным научным языком текст, который отлично проиллюстрирован. Обзор литературы позволяет вникнуть в тему работы даже малоподготовленному читателю, поскольку в конце содержит отдельный подраздел о функциях белков SFPQ и NONO, изучению которых посвящена работа.

Глава Материалы и методы содержит детальное описание методик, к которым прибегал автор в процессе выполнения работы. Внимание к мелочам и подробность изложения не вызывают сомнения в возможности воспроизведения экспериментов, осуществленных в соответствии с представленным набором методик.

Глава Результаты и обсуждение содержит основные результаты диссертационной работы и их обсуждение. Основные результаты представлены в списке положений, выносимых на защиту. Я не буду перечислять отдельные результаты, но отмечу, что во всей работе прослеживается четкая логика. Перед описанием экспериментов и их результатов неизменно сформулирована гипотеза или вопрос, на который пытаются найти ответ автор, при этом использование отдельных методик четко аргументировано. Между отдельными частями раздела расположены связующие части, которые прекрасно демонстрируют глубокое понимание автором целей, смысла отдельных экспериментов и возможных результатов. Раздел прекрасно проиллюстрирован, качество рисунков и данных, подписи к ним позволяют понять, что именно было сделано. Результаты подробно обсуждены автором, указаны ключевые аспекты проведенной работы и значимость результатов.

Заключение обобщает результаты и подводит итоги проведенных исследований.

Наконец, раздел Выводы состоит из 5 основных выводов, которые полностью соответствуют результатам экспериментов, представленных в работе Татьяны Фёдоровны Кихай.

Замечания по диссертации.

В работе, безусловно, встречаются неудачные выражения, опечатки, ошибки в пунктуации, однако их немного, и они не портят общего хорошего впечатления от работы. Вместе с тем, после прочтения у меня возник ряд вопросов, на которые было бы интересно получить ответы:

- 1) Результат о том, что NONO не связывает интегразу, несмотря на внушительное структурное сходство с SFPQ, наверное, заслуживает включения в название, поскольку результат этот, как минимум, неочевиден;
- 2) Хотелось бы услышать комментарии автора на тему пост-трансляционных модификаций в изучаемых белках. Могут ли они значимым образом влиять на связывание между ними. Ведь, если я правильно понимаю, размеры белков достаточно велики, и логично ожидать, что в них достаточно таких модификаций. В то же время, в используемых для экспериментов по связыванию белках-химерах модификации должны отсутствовать, поскольку их выделяли из кишечных палочек;
- 3) Интересно, каким образом NONO влияет на связывание SFPQ с интегразой. Делали ли эксперименты по связыванию комплекса NONO-SFPQ с интегразой? И наоборот, NONO с SFPQ-интегразой? Кто кого будет вытеснять из заранее сформированных двойных комплексов?
- 4) В одном из разделов автор утверждает, что некоторые мутантные формы не удалось выделить в очищенном виде? Хотелось бы услышать почему? Белки были вредными для бактерий? Не происходила продукция в клетках бактерий? Белки деградировали?
- 5) Интересно узнать, каким образом авторы контролировали правильность фолдинга рекомбинантных химерных белков, ведь это должно значимо влиять на результаты связывания. Я прекрасно понимаю, что эти данные были подтверждены в клетках млекопитающих на соответствующих мутантах и с помощью функциональных тестов, но всё же, было бы правильно методами ЯМР или другими структурными исследованиями подтвердить, что структура белков соответствует ожидаемой.

Данные комментарии, замечания, пожелания и вопросы ни в коей мере не отменяют достоинств работы и выполнившего ее автора.

Заключение.

Диссертация Кихай Т.Ф, представляет собой законченное научное исследование, которое имеет большую теоретическую, фундаментальную и практическую значимость. Эксперименты выполнены с помощью современных научных методов, а достоверность положений и выводов подтверждают 4 публикации на тему работы в высокорейтинговых научных журналах. Однозначно, проведенные исследования существенно дополняют наше понимание механизмов, реализуемых в ходе жизненного цикла ВИЧ, в том числе, использующих белки хозяина для встраивания в геном. Кроме того, полученные результаты могут помочь в создании новых препаратов с противовирусной активностью.

Считаю, что диссертация Кихай Татьяны Фёдоровны «Влияние клеточного белка SFPQ на репликацию вируса иммунодефицита человека типа 1», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия, является законченной научно-квалификационной работой, обладающей новизной, теоретической и практической значимостью, и которую, в совокупности, можно квалифицировать как научное достижение в области биоорганической химии.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.4.9. Биоорганическая химия (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, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кихай Татьяна Фёдоровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. Биоорганическая химия.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
главный научный сотрудник
лаборатории молекулярной вирусологии,
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН),
Рубцов Юрий Петрович

19.11.2025 года