

О результатах публичной защиты диссертации

ЖИТКЕВИЧ Аллы Сергеевны

диссертация на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на опухолевый потенциал клеток эпителиального происхождения», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Диссертационный совет 24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) принял решение о присуждении ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10. Вирусология ЖИТКЕВИЧ Алле Сергеевне (Протокол № 29 от 20 декабря 2024 года).

Присутствовали: Ткаченко Е.А. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Белякова А.В. к.б.н. (1.5.10. Вирусология), Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Еровиченков А.А. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Борисевич И.В. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Бутенко А.М. профессор, д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Васин А.В. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Никитин Н.А. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Тикунова Н.В. д.б.н., доцент (1.5.10. Вирусология)

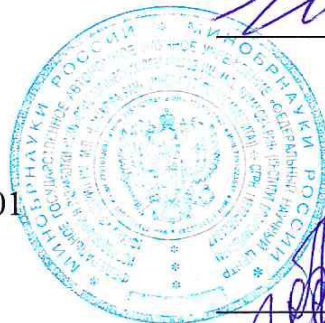
Заместитель председателя
диссертационного совета 24.1.255.01
профессор, доктор медицинских наук


Е.А. Ткаченко

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.255.01
кандидат биологических наук


А.В. Белякова


2024 г.



ПРОТОКОЛ № 29

заседания совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, соискание ученой степени кандидата наук
24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)

от 20 декабря 2024 года
11:00 час. МСК.

По списку членов диссертационного совета – 22 чел.

Присутствовало на заседании – 16 чел.

Председатель (заместитель председателя)
диссертационного совета

– профессор, д.м.н. Ткаченко Е.А.

Заместитель председателя

– профессор, д.м.н. Еровиченков

Ученый секретарь
диссертационного совета

– к.б.н. Белякова А.В.

Присутствовали члены диссертационного совета:

Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Борисевич И.В. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Бутенко А.М. профессор, д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Васин А.В. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Никитин Н.А. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Тикунова Н.В. д.б.н., доцент (1.5.10. Вирусология).

ПОВЕСТКА ЗАСЕДАНИЯ:

1. Защита диссертации ЖИТКЕВИЧ Аллы Сергеевны на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на опухолевый потенциал клеток эпителиального происхождения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология. Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный руководитель: Гордейчук Илья Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Официальные оппоненты:

Бобкова Марина Ридовна – доктор биологических наук, главный специалист лаборатории биологии лентивирусов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе Федерального

государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Липатова Анастасия Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории пролиферации клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

СЛУШАЛИ: доклад по диссертации ЖИТКЕВИЧ А.С. на тему: «Механизмы влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Актуальность темы исследования

В настоящее время инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), продолжает представлять собой глобальную проблему общественного здравоохранения. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на 2023 год число ВИЧ-инфицированных лиц составило примерно 39,9 млн человек, при этом выявлено 1,3 млн новых случаев заражения ВИЧ-1 и 630 тыс. смертей. По итогам 2021 года в Российской Федерации (РФ) насчитывалось 1,137 млн ВИЧ-инфицированных, что составляет 1,5% взрослого населения. Кроме того, по данным Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (ЕЦПКЗ) и ВОЗ, в РФ на конец 2021 года наблюдался самый высокий уровень впервые выявленных случаев ВИЧ-инфекции в европейском регионе – 40,2 на 100 000 населения. Несмотря на то, что доля ВИЧ-инфицированных, получающих антиретровирусную терапию (АРТ), в РФ выросла с 43% в 2016 году до 93% в 2022 году, во всех федеральных округах РФ сохраняется тенденция роста распространения ВИЧ-1, что может быть связано с увеличением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных (с 31 года в 2011 году до 41 года в 2022 году).

С начала глобальной эпидемии ВИЧ-1 среди ВИЧ-инфицированных лиц наблюдается повышенный уровень заболеваемости злокачественными новообразованиями, в частности эпителиального происхождения. В эпоху АРТ резко снизилась частота возникновения злокачественных новообразований, ассоциированных с иммуносупрессией, но она все еще остается повышенной относительно общей популяции. Накопленные данные показывают, что отдельные вирусные белки могут напрямую способствовать канцерогенезу, в том числе в эпителиальных клетках. Белки ВИЧ-1 можно обнаружить в сыворотке/плазме крови пациентов даже если уровни РНК ВИЧ-1 находятся ниже предела детекции (не выявляются). Обратная транскриптаза и протеаза ВИЧ-1 являются наименее изученными вирусными белками в отношении влияния на онкогенные характеристики клеток эпителиального происхождения. Таким образом, важным вопросом как фундаментальной, так и прикладной науки является исследование механизмов влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения.

Степень разработанности темы исследования

Ранее показано, что продукция обратной транскриптазы (РТ) ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1uc2 приводила к увеличению продукции активных форм кислорода (АФК), перекисному окислению липидов, усилению подвижности

клеток в анализе заживления ран и повышению регуляции экспрессии *Vimentin* и *Twist*, последнее коррелировало с уровнями продукции RT. Кроме того, RT ВИЧ-1 в этих клетках приводила к усилению туморогенного и метастатического потенциала *in vitro* и *in vivo* по механизму, связанному со способностью RT индуцировать в клетках АФК. При этом именно свойство фермента RT эффективно индуцировать активацию *Twist*, чтобы препятствовать окислительному стрессу, приводило к усилению туморогенного и метастатического потенциала экспрессирующих RT клеток. Повышенная продукция АФК митохондриями является следствием нарушения интенсивности системы окислительного фосфорилирования. На настоящий момент отсутствуют данные о влиянии RT на метаболические характеристики эпителиальных клеток.

Данные о молекулярном взаимодействии ВИЧ-1/ВПЧ16 и/или их антигенами рассматривались независимо во множестве исследований. Однако, отсутствует обобщенный обзор механизмов, способствующих усилению туморогенного и миграционного потенциала ВПЧ16+ клеток под действием ВИЧ-1. Не продемонстрировано, может ли RT ВИЧ-1 модулировать фенотипические характеристики, метаболическую активность, характер экспрессии генов и туморогенность ВПЧ16+ эпителиальных клеток.

Показано, что продукция протеазы (PR) ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2 приводила к усилению туморогенного и метастатического потенциала при имплантации сингенным мышам. Однако, механизм, лежащий в основе этого наблюдения, не оценивался.

Целью настоящей работы являлось исследование механизмов влияния обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 на туморогенный потенциал клеток эпителиального происхождения.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи исследования:

1. оценить влияние продукции обратной транскриптазы (RT) ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2 на два ключевых метаболических процесса клеток: гликолиз и митохондриальное дыхание;
2. оценить влияние вариантов RT ВИЧ-1 на экспрессию онкогенов *E6/E7* ВПЧ16 на модели клеточной линии плоскоклеточного рака шейки матки человека Ca Ski с интегрированным геном ВПЧ16;
3. оценить фенотипические характеристики, метаболическую активность и характер экспрессии генов в субклонах линии Ca Ski, стабильно продуцирующих RT ВИЧ-1;
4. охарактеризовать туморогенный потенциал полученных субклонов линии Ca Ski, продуцирующих RT ВИЧ-1, в иммунодефицитных мышцах линии Nu/J;
5. оценить окислительно-восстановительный статус и миграционный потенциал в субклонах линии 4T1luc2, экспрессирующих протеазу (PR) ВИЧ-1.

Научная новизна

В работе впервые продемонстрировано, что продукция обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках 4T1luc2 приводила к усилению митохондриального дыхания и повышению уровня продукции АТФ в клетке, при этом не влияя на процесс гликолиза и уровни субстратов, поступающих в цикл Кребса. Усиление митохондриального дыхания было связано с перестройкой митохондриальной сети, что выражалось в увеличении доли клеток с нитевидным фенотипом митохондрий, при индуцированном обратной транскриптазой снижении митохондриальной массы. В работе впервые были получены производные ВПЧ16-положительной клеточной линии плоскоклеточного рака шейки матки человека Ca Ski, экспрессирующие обратную транскриптазу ВИЧ-1 штамма FSU_A и зеленый флуоресцентный

белок (GFP) в качестве контроля. В работе впервые продемонстрировано, что экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 увеличивает уровень мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16, склоняет клетки к гибриднему эпителиально-мезенхимальному фенотипу, усиливает гликолиз и подавляет митохондриальное дыхание. Показано, что лентивирусная трансдукция и дальнейшая экспрессия клетками линии Ca Ski неонкогенного белка GFP, снижает их туморогенность, однако высокий уровень экспрессии обратной транскриптазы ВИЧ-1 предотвращает достоверное снижение туморогенной активности опухолевых клеток. Впервые показано, что протеаза ВИЧ-1 изменяет миграционную активность клеток аденокарциномы *in vitro* и *in vivo*, что связано не с индукцией окислительного стресса, а с ее ферментативной активностью.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящей работе показано, что механизмом индуцируемого обратной транскриптазой ВИЧ-1 увеличения продукции АФК, приводящего к усилению туморогенного и метастатического потенциала клеток аденокарциномы молочной железы *in vitro* и *in vivo*, является усиление митохондриального дыхания, связанное с перестройкой митохондриальной сети. Эти данные важны для понимания патогенеза инфекции ВИЧ-1, включая стимуляцию процесса образования и распространения ассоциированных с ВИЧ-1 злокачественных новообразований, а также указывают на необходимость скрининга злокачественных новообразований среди ВИЧ-инфицированных лиц, включая получающих АРТ. Рекомендовано проведение дальнейших исследований влияния уровня циркулирующей в крови обратной транскриптазы на частоту выявления злокачественных новообразований у пациентов, получающих эффективную АРТ, с целью определения оптимальной частоты мониторинга опухолей.

Полученные в работе данные подчеркивают сложные взаимодействия, возникающие в клетке при ко-инфекции ВИЧ-1 и ВПЧ16. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках, содержащих интегрированный геном ВПЧ16, приводит к изменению фенотипических особенностей этих клеток, влияя на их клоногенную активность и канцерогенный потенциал, предположительно за счет повышения уровня мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16 и/или усиленного гликолиза. Это позволяет предположить, что обратная транскриптаза ВИЧ-1 – многофункциональный белок, влияющий на индуцированный ВПЧ16 канцерогенез за счет модуляции экспрессии онкогена *E6*. Способность обратной транскриптазы ВИЧ-1 влиять на метаболизм опухолевых клеток может играть важную роль в патогенезе инфекции, тем самым объясняя феномен ВИЧ-1-ассоциированного канцерогенеза, не связанного с иммунной супрессией. Полученные в работе данные о механизмах канцерогенеза при ко-инфекции ВИЧ-1/ВПЧ16 могут быть использованы при модификации протоколов лечения. Полученные производные линии клеток Ca Ski могут быть использованы в качестве модели для оценки эффективности противовирусных препаратов и комбинированных протоколов лечения при ко-инфекции.

Положения, выносимые на защиту

1. Продукция обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2 приводит к усилению митохондриального дыхания и повышению уровня продукции АТФ в клетке, при этом не влияя на процесс гликолиза и уровни субстратов, поступающих в цикл Кребса. Усиление митохондриального дыхания связано с перестройкой митохондриальной сети при индуцированном обратной транскриптазой снижении митохондриальной массы.

2. Рекомбинантные обратные транскриптазы ВИЧ-1 могут увеличивать экспрессию *E6* ВПЧ16 в линии клеток плоскоклеточного рака шейки матки человека Ca Ski с

интегрированным геномом ВПЧ16 при добавлении в культуральную среду. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках Ca Ski увеличивает уровни мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16, усиливает гликолиз и подавляет митохондриальное дыхание, приводит к изменению фенотипических характеристик клеток, влияя на их клоногенную активность и туморогенный потенциал.

3. Экспрессия протеазы ВИЧ-1 в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1Luc2 влияет на миграционную активность клеток *in vitro* и *in vivo* по механизму, связанному не с индукцией окислительного стресса, а с ее ферментативной активностью.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 4, 6 паспорта специальности.

Публикации

Основные результаты исследования отражены в 3 научных публикациях: 1 статья - в рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК, 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных библиографических базах данных – Web of Science, Scopus, PubMed. Все три публикации соответствуют требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы результаты диссертационного исследования.

Выводы

1. Продукция обратной транскриптазы ВИЧ-1 приводит к усилению митохондриального дыхания и уровня продукции АТФ в клетках аденокарциномы молочной железы мыши 4T1Luc2, при этом не влияя на процесс гликолиза и уровни субстратов, поступающих в цикл Кребса. Усиление митохондриального дыхания связано с перестройкой митохондриальной сети при индуцированном обратной транскриптазой снижении митохондриальной массы.

2. Рекомбинантные обратные транскриптазы ВИЧ-1 усиливают экспрессию *E6* ВПЧ16 в линии клеток плоскоклеточного рака шейки матки человека Ca Ski, содержащей полноразмерный геном ВПЧ16, не влияя на экспрессию *E7* ВПЧ16.

3. Экспрессия обратной транскриптазы ВИЧ-1 в клетках Ca Ski увеличивает уровень мРНК изоформы *E6*I* ВПЧ16, модулирует экспрессию факторов эпителиально-мезенхимального перехода (*E-CADHERIN*, *VIMENTIN* и *N-CADHERIN*), усиливает гликолиз и ингибирует митохондриальное дыхание. Высокий уровень экспрессии обратной транскриптазы ВИЧ-1 способен компенсировать неблагоприятные эффекты лентивирусной трансдукции и/или (сверх)экспрессии зеленого флуоресцентного белка в клетках Ca Ski, восстанавливая клоногенную способность экспрессирующих обратную транскриптазу клеток до уровней, наблюдаемых в исходной клеточной линии.

4. Высокий уровень экспрессии обратной транскриптазы ВИЧ-1 предотвращает снижение туморогенного потенциала клеток линии Ca Ski, наблюдаемое при трансдукции данных клеток лентивирусом, кодирующим зеленый флуоресцентный белок.

5. Влияние протеазы ВИЧ-1 на миграционную активность клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1Luc2 связано не с индукцией окислительного стресса, а с ее ферментативной активностью, что подтверждается изменением подвижности клеток под действием как ингибиторов протеазы ВИЧ-1, так и антиоксиданта N-ацетилцистеина.

Официальные оппоненты - Бобкова М.Р. д.б.н., Липатова А.В. к.б.н. – *дали положительные отзывы на диссертацию.*

Ведущая организация – Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - *дала положительный отзыв на диссертацию.*

Счетная комиссия избрана в составе: председатель – д.б.н. Никитин Н.А., члены комиссии – д.б.н., профессор РАН Кюрегян К.К., д.м.н. Колясникова.

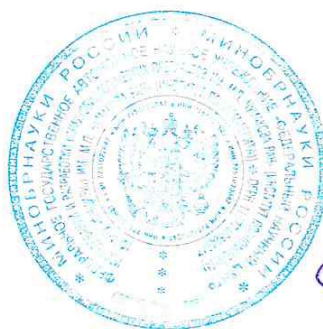
Результаты голосования: диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 15 докторов наук по специальности 1.5.10. Вирусология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – «16», против – «нет», недействительных бюллетеней – «нет».

Протокол тайного голосования утвержден открытым голосованием.


ПОСТАНОВИЛИ: основываясь на результатах тайного голосования присудить ЖИТКЕВИЧ Алле Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Заместитель председателя
диссертационного совета 24.1.255.01
профессор, доктор медицинских наук

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.255.01
кандидат биологических наук



 Е.А. Ткаченко

 А.В. Белякова

«10»  2024 г.

