

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Костюшева Дмитрия Сергеевича «Принципы
полной элиминации вируса гепатита В»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.10 – Вирусология**

Хронический гепатит В является одной из самых распространенных вирусных инфекций в мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, более 250 миллионов человек живут с хронической инфекцией гепатитом В. Это создает значительную нагрузку на систему здравоохранения и требует эффективных методов лечения. Хронический гепатит В может привести к серьезным осложнениям, таким как цирроз печени и рак печени. Эти состояния представляют собой угрозу для жизни и требуют сложного и дорогостоящего лечения, что подчеркивает необходимость разработки эффективной терапии для предотвращения прогрессирования заболевания. Несмотря на успешный контроль течения хронического гепатита В при использовании тенофовира и энтекавира – аналогов нуклеоз(т)идов последнего поколения – полное излечение хронической инфекции в клинической практике является недостижимым из-за персистенции кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК ВГВ) в зараженных гепатоцитах. Ряд противовирусных препаратов с инновационными принципами действия в настоящий момент проходят клинические исследования (ингибиторы сборки капсида, препараты на основе малых интерферирующих РНК и другие). Однако, данные препараты также действуют на промежуточные этапы репликации вируса и не действуют на ккзДНК. Прекращение приема подобных препаратов обычно приводит к восстановлению вирусной репликации.

Диссертационная работа Костюшева Д.С. посвящена выявлению ключевых компонентов жизненного цикла вируса гепатита В, которые играют важную роль в вирусной персистенции, репликации и реактивации инфекции. На основе полученных данных разрабатываются принципы полной элиминации вируса гепатита В из инфицированных клеток человека с помощью систем CRISPR/Cas9.

При выполнении диссертационного исследования было показано, что основная форма генома вируса гепатита В, представляющая собой кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, в основном подвергается разрушению, а не мутагенезу под воздействием сайт-специфических комплексов нуклеаз CRISPR/Cas9. При этом реимпорт кольцевой частично-двуцепочечной ДНК вируса гепатита В из цитоплазмы в ядро клеток способствует персистенции вируса и хронизации инфекции, даже при внутриядерного пула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. При подавлении синтеза кольцевой частично-двуцепочечной ДНК за счет аналогов нуклеотидов происходит полное удаление вируса из инфицированных клеток с помощью систем CRISPR/Cas9. При этом эпигенетические модификации, в частности, метилирование генома вируса гепатита В препятствуют расщеплению вирусной ДНК сайт-направленными нуклеазами CRISPR/Cas9. Исследована роль внутриклеточного ответа на повреждение ДНК на репликацию вируса. Показано, что факторы ATM и ATR, являющиеся ключевыми элементами клеточного ответа на повреждение ДНК, усиливают репликацию и способствуют реактивации инфекции вирусом гепатита В при воздействии лекарственных препаратов, вызывающих повреждение ДНК. При этом вирусный белок HBx способен активировать транскрипционно-инактивированный геном вируса, восстанавливая и усиливая репликацию вируса гепатита В. Внутриклеточные цитидин-дезаминазы на уровне базальной экспрессии ограничивают пополнение пула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса из предшествующего генома. При гиперэкспрессии цитидин-дезаминаз APOBEC/AID происходит разрушение и гипермутация кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В, а также возникают мутации в геноме человека, что сопровождается снижением вирусной нагрузки в инфицированных клетках. Противовирусная активность сохраняется при снижении уровней гиперэкспрессии APOBEC3A/3B, при этом дезаминирование генома клеток человека не происходит.

На основе материалов диссертации было опубликовано 16 оригинальных и 9 обзорных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах,

индексируемых в системах Web of Science, Scopus и РИНЦ. Материалы диссертации были представлены на различных российских и международных научных конференциях.

Диссертационная работа структурирована по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, выводы, список использованных сокращений и литературы. Объем работы составляет 289 страниц машинописного текста, она иллюстрирована 118 рисунками и 3 таблицами. Список литературы насчитывает 503 источника. В разделе «Введение» автором сформулированы актуальность работы, цель и задачи исследования, а также научная новизна и значимость полученных результатов. Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе рассматриваются эпидемиологические особенности, жизненный цикл вируса гепатита В и современные методы лечения. Во втором и третьем разделах обсуждаются подходы к изменению транскрипции с помощью систем CRISPR, а также представлены данные о номенклатуре и особенностях различных систем CRISPR/Cas. Четвертый раздел посвящен взаимодействию вируса с инфицированной клеткой. В главе «Материалы и методы» подробно описаны экспериментальные методы и статистический анализ, используемые в работе. Примененные подходы соответствуют поставленным задачам. Глава «Результаты и обсуждение» включает четыре основных раздела. В первом разделе описан метод разрушения основной формы генома вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9. Исследованы клеточные пути репарации, активируемые для восстановления генома вируса. Предложен метод оценки эффективности CRISPR/Cas9 в отношении генома вируса гепатита В с использованием соединения NU7026. Показано, что матрицы кольцевой ковалентно замкнутой ДНК разрушаются под воздействием нуклеолитических систем. Во втором разделе рассматривается персистенция вируса гепатита В за счет реимпорта кольцевой частично-двуцепочечной ДНК в условиях элиминации кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. С помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 удалось удалить большинство матриц кольцевой ковалентно

замкнутой ДНК при одновременном применении, однако было показано, что цикл восстанавливается из-за сохраненных предшественников генома. Использование аналогов нуклеотидов устраняет возможность восстановления вирусной репликации после разрушения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК системами CRISPR/Cas9. Третий раздел посвящен влиянию метилирования ДНК вируса гепатита В и белка HBx на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции. Установлено, что метилирование ДНК вируса нарушает противовирусное действие систем CRISPR/Cas9, причем ключевую роль играют как расположение сайта посадки гидовой РНК, так и обогащенность CpG-островками. Предложено использовать высокие дозы рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 для преодоления эффектов метилирования кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В. Выявлена ведущая роль факторов повреждения генома ATM и ATR в усилении вирусной репликации при использовании ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов и генотоксических агентов. Впервые была обнаружена возможность активации репликации вируса гепатита В при гиперметилированном состоянии кольцевой ковалентно замкнутой ДНК благодаря активности белка HBx.

Четвертый раздел описывает влияние факторов APOBEC/AID на репликацию вируса гепатита В и клетки человека. Разработан метод кратковременной активации экспрессии цитидин-дезаминаз из семейства APOBEC/AID, проведен анализ их воздействия на вирусную репликацию, мутации вирусных геномов, а также на цитотоксические и генотоксические эффекты. Предложен способ регулирования уровней активации APOBEC/AID с использованием аттенуированных РНК-проводников, которые позволяют точно контролировать активацию целевых генов, сохраняя противовирусные свойства и минимизируя побочные эффекты.

По ходу ознакомления с диссертационным исследованием возникли следующие замечания и вопросы:

1. На стр. 17 в пункте 1 автор не совсем корректно указал, что основной формой генома вируса гепатита В является гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК. В данном случае скорее подходит определение этой формы генома как основного внутриклеточного интермедиата репликации вируса. В случае ретроидных вирусов основной формой генома является вирионная кольцевая частично-двуцепочечная ДНК.
2. Автор исследовал только особенности кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. Однако известно, что при инфекции вирусом гепатита В происходит также встраивание двуцепочечной линейной ДНК в геном клетки. Что будет происходить с этими встройками под воздействием систем CRISPR, и какую роль интеграции ДНК вируса могут играть в персистенции вируса?
3. Следует пояснить почему автор изучал только роль факторов ATM и ATR, а не целого сигнального пути ответа на двуцепочечные повреждения в клетке.
4. Насколько распространено метилирование ДНК вируса и, в особенности, ккзДНК в инфицированных клетках?
5. Можно ли использовать схожие принципы элиминации вируса гепатита В для других вирусных инфекций?
6. Автором не рассмотрен этап собственно инфекции и ре-инфекции в персистенции вируса – с чем это связано, и какое значение эти процессы могут иметь для достижения элиминации инфекции?

В заключение следует отметить, что диссертационная работа Костюшева Д.С. является законченным исследованием, посвященным решению глобальной проблемы – удалению вируса гепатита В из организма. В работе определены практически значимые, важные этапы репликации вируса, и предложены действенные способы для элиминации инфекции. Предложенные методы не только могут стать основой для создания препаратов полного излечения хронического гепатита В, но также важны в разработке новых и коррекции

существующих подходов по лечению подобных пациентов. Особенно значимо, что в работе помимо перспективных подходов на основе CRISPR-нуклеаз и CRISPR-активации, использованы уже внедренные в практику препараты на основе аналогов нуклеотидов, химиопрепараты и препараты таргетной терапии.

Указанные выше 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 1.5.10. – вирусология (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 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 Костюшев Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.10. – вирусология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

МОРОЗОВ Сергей Юрьевич

подпись

16.01.2025

Контактные данные:

+7(495)9393198

morozov@genebee.msu.su

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация:

03.00.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО

«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тел.: +7(495)9393198; e-mail: morozov@genebee.msu.su

Подпись сотрудника НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Морозова С.Ю. удостоверяю:

кадровый работник

И.О. Фамилия

