

Заключение диссертационного совета МГУ.015.4

по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

Решение диссертационного совета от «06» февраля 2025 г. №1.

О присуждении Костюшеву Дмитрию Сергеевичу, гражданину РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Принципы полной элиминации вируса гепатита В» по специальности 1.5.10 - вирусология принята к защите диссертационным советом МГУ.015.4 от 31.10.2024, протокол № 11.

Соискатель Костюшев Дмитрий Сергеевич, 1991 года рождения, в 2019 году защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Разработка подходов к разрушению кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9» в диссертационном совете 21.1.018.02, созданном на базе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи». Соискатель работает в должности заведующего лабораторией генетических технологий в создании лекарственных средств, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Диссертация выполнена в лаборатории генетических технологий в создании лекарственных средств Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Научный консультант – доктор медицинских наук, доцент **Чуланов Владимир Петрович**, заместитель директора по научной работе и инновационному развитию ФГБУ «НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Михайлов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов федерального бюджетного учреждения науки «центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора;

Нетёсов Сергей Викторович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биотехнологии, микробиологии и вирусологии, факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет

Морозов Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского;

дали положительные отзывы на диссертацию.

Выбор официальных оппонентов обосновывался компетентностью в соответствующей отрасли науки и наличием публикаций в соответствующей сфере исследования.

Соискатель имеет 113 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 25 работ, из них 25 статей, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10. – вирусология.

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. Brezgin S, Kostyusheva A, Bayurova E, Gordeychuk I, Isaguliants M, Goptar I, Nikiforova A, Smirnov V, Volchkova E, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Replenishment of Hepatitis B Virus cccDNA Pool Is Restricted by Baseline Expression of Host Restriction Factors *In Vitro* // *Microorganisms*. 2019. 7(11):533. (SJR – 4.8; Q2). Доля участия=30%. 0,92 п.л.
2. Kostyusheva A, Brezgin S, Bayurova E, Gordeychuk I, Isaguliants M, Goptar I, Urusov F, Nikiforova A, Volchkova E, **Kostyushev D**, Chulanov V. ATM and ATR Expression Potentiates HBV Replication and Contributes to Reactivation of ВГВ Infection upon DNA Damage // *Viruses*. 2019. 11(11):997. (SJR – 4.8; Q1). Доля участия=40%. 0,98 п.л.
3. Костюшева А.П., **Костюшев Д.С.**, Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Низкомолекулярные ингибиторы путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК усиливают противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на моделях вируса гепатита В
// *Молекулярная Биология*. 2019. Т.53. №1. С.1-13. (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=40%. 0,75 п.л.
[Kostyusheva AP, **Kostyushev DS**, Brezgin SA, Zarifyan DN, Volchkova EV, Chulanov VP. [Small Molecular Inhibitors of DNA Double Strand Break Repair Pathways Increase the ANTI-HBV Activity of CRISPR/Cas9] // *Molecular Biology (Moskva)*. 2019. 53(2):311-323. Russian. doi: 10.1134/S0026898419010075. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=40%. 0,75 п.л.
4. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Zarifyan D, Utkina A, Goptar I, Chulanov V.

Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9 // *Scientific Reports*. 2019. 9(1):1847. (SJR – 4.6, Q1). Доля участия=60%. 0,63 п.л.

5. Костюшева А.П., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Чистяков Д.С., Гегечкори В.И., Баюрова Е.О., Волчкова Е.В., **Костюшев Д.С.**, Чуланов В.П. Вирус гепатита В и сайт-специфические нуклеазы: влияние генетических модификаций CRISPR/Cas9 на противовирусную активность // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9, No 2. С. 279–287. (ИФ РИНЦ = 0.647). Доля участия=20%. 0,46 п.л.

[Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Chistyakov D.S., Gegechkory V.I., Bayurova E.O., Volchkova E.V., **Kostyushev D.S.**, Chulanov V.P. Hepatitis B virus and site-specific nucleases: effects of genetic modifications in CRISPR/Cas9 on antiviral activity// *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2019. 9(2): 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-28. (SJR – 0,17, Q4)]. Доля участия=20%. 0,46 п.л.

6. Брезгин С.А., Костюшева А.П., Смирский В.Н., Волчкова Е.В., Чистяков Д.С., **Костюшев Д.С.**, Чуланов В.П. Подавление цикла вируса гепатита В под действием нуклеолитических систем CRISPR/Cas9 и белка HBx // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9, No 3–4. С. 476–484. (ИФ РИНЦ = 0.647). Доля участия=20%. 0,46 п.л.

[Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Simirsky V.N.c, Volchkova E.V., Chistyakov D.S., **Kostyushev D.S.**, Chulanov V.P. Suppression of hepatitis B virus by a combined activity of CRISPR/Cas9 and HBx proteins // *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2019. 9(3–4): 476–484. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484. (SJR – 0,17, Q4)]. Доля участия=20%. 0,46 п.л.

7. Bayurova E, Jansons J, Skrastina D, Smirnova O, Mezale D, Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Petkov S, Podschwadt P, Valuev-Elliston V, Sasinovich S, Korolev S, Warholm P, Latanova A, Starodubova E, Tukhvatulin A, Latyshev O, Selimov R, Metalnikov P, Komarov A, Ivanova O, Gorodnicheva T, Kochetkov S, Gottikh M, Strumfa I, Ivanov A, Gordeychuk I, Isaguliants M. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-Dependent Upregulation of Twist // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. 6016278. (SJR – 7.3, Q1). Доля участия=20%. 1,61 п.л.

8. Brezgin S, Kostyusheva A, Ponomareva N, Volia V, Goptar I, Nikiforova A, Shilovskiy I, Smirnov V, **Kostyushev D**, Chulanov V. Clearing of Foreign Episomal DNA from Human Cells by CRISPRa-Mediated Activation of Cytidine Deaminases // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21(18):6865. (SJR – 6.208, Q1). Доля участия=40%. 0,98 п.л.

9. Jansons J, Bayurova E, Skrastina D, Kurlanda A, Fridrihsone I, **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Artyuhov A, Dashinimaev E, Avdoshina D, Kondrashova A, Valuev-Elliston V, Latyshev O, Eliseeva O, Petkov S, Abakumov M, Hippe L, Kholodnyuk I, Starodubova E, Gorodnicheva T, Ivanov A, Gordeychuk I, Isaguliants M. Expression of the Reverse Transcriptase Domain of Telomerase Reverse Transcriptase Induces Lytic Cellular Response in DNA-Immunized Mice and Limits Tumorigenic and Metastatic Potential of Murine Adenocarcinoma 4T1 Cells // *Vaccines (Basel)*. 2020. 8(2):318. (SJR – 7.8, Q1). Доля участия=20%. 2,42 п.л.

10. Batskikh S, Morozov S, Vinnitskaya E, Sbikina E, Borunova Z, Dorofeev A, Sandler Y, Saliev K, **Kostyushev D**, Brezgin S, Kostyusheva A, Chulanov V. May Previous Hepatitis B Virus Infection Be Involved in Etiology and Pathogenesis of Autoimmune Liver Diseases? // *Advances in Therapy*. 2022. 39(1):430-440. (SJR – 4.6, Q1). Доля участия=60%. 0,92 п.л.

11. А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, Н.И. Пономарева, И.А. Гоптарь, А.В. Никифорова, В.И. Гегечкори, В.Б. Полэуктова, К.А. Туркадзе, А.Е. Судьина, В.П. Чуланов, **Д.С. Костюшев**. Противовирусное действие рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В *in vivo* // *Молекулярная Биология*. Том 56(2022) №6 стр. 884-891; (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=40%. 0,40 п.л.

[Kostyusheva AP, Brezgin SA, Ponomareva NI, Goptar IA, Nikiforova AV, Gegechkori VI, Poluektova VB, Turkadze KA, Sudina AE, Chulanov VP, **Kostyushev DS**. Antiviral Activity of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes on a Hepatitis B Virus Model In Vivo]. *Molecular Biology (Moskva)*. 2022. 56(6):884-891. Russian. doi: 10.31857/S002689842206012X. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=40%. 0,40 п.л.

12. С.А. Брезгин, А.П. Костюшева, Н.И. Пономарева, В.И. Гегечкори, Н.П. Кирдяшкина, С.Р. Айвазян, Л.Н. Дмитриева, Л.Н. Кокорева, В.П. Чуланов, **Д.С. Костюшев**. Белок НВх потенцирует реактивацию вируса гепатита В // *Молекулярная Биология*. 2022. Т. 56. №5 стр. 783-794; (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=50%. 0,63 п.л.

[Brezgin SA, Kostyusheva AP, Ponomareva NI, Gegechkori VI, Kirdyashkina NP, Ayvasyan SR, Dmitrieva LN, Kokoreva LN, Chulanov VP, Kostyushev DS. [HBx Protein Potentiates Hepatitis B Virus Reactivation]. *Molecular Biology (Moskva)*. 2022. 56(5):783-794. Russian. doi: 10.31857/S0026898422050044. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=50%. 0,63 п.л.

13. Batskikh S, Morozov S, **Kostyushev D**. Hepatitis B virus markers in hepatitis B surface antigen negative patients with pancreatic cancer: Two case reports // *World Journal of*

Hepatology. 2022. 14(7):1512-1519. (SJR – 2.4, Q3). Доля участия=60%. 0,40 п.л.

14. Batskikh S, Morozov S, Dorofeev A, Borunova Z, **Kostyushev D**, Brezgin S, Kostyusheva A, Chulanov V. Previous hepatitis B viral infection-an underestimated cause of pancreatic cancer // World Journal of Gastroenterology. 2022. 28(33):4812-4822. (SJR – 4.3, Q1). Доля участия=40%. 0,58 п.л.

15. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Ponomareva N, Zakirova NF, Egorshina A, Yanvarev DV, Bayurova E, Sudina A, Goptar I, Nikiforova A, Dunaeva E, Lisitsa T, Abramov I, Frolova A, Lukashev A, Gordeychuk I, Zamyatnin AA Jr, Ivanov A, Chulanov V. Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9 // Molecular Therapy – Nucleic Acids. 2023. 31:482-493. (SJR – 8.8, Q1). Доля участия=60%. 0,63 п.л.

16. **Kostyushev Dmitry**, Brezgin Sergey, Kostyusheva Anastasiya, Ponomareva Natalia, Bayurova Ekaterina, Zakirova Natalia, Kondrashova Alla, Goptar Irina, Nikiforova Anastasiya, Sudina Anna, Babin Yurii, Gordeychuk Ilya, Lukashev Alexander, Zamyatnin Andrey A., Ivanov Alexander, Chulanov Vladimir. Transient and tunable CRISPRa regulation of APOBEC/AID genes for targeting hepatitis B virus // Molecular Therapy – Nucleic Acids. 2023. 32:478-493. (SJR – 8.8, Q1). Доля участия=50%. 0,86 п.л.

17. Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Brezgin S, Volchkova E, Chulanov V. Clinical Implications of Hepatitis B Virus RNA and Covalently Closed Circular DNA in Monitoring Patients with Chronic Hepatitis B Today with a Gaze into the Future: The Field Is Unprepared for a Sterilizing Cure // Genes (Basel). 2018. 9(10):483 (SJR – 3.5, Q1). Доля участия=40%. 1,38 п.л.

18. В.П. Чуланов, А.П. Зуева, **Д.С. Костюшев**, С.А. Брезгин, Е.В. Волчкова, В.В. Малеев. Гепатит С стал излечим. Гепатит В - следующий? // Терапевтический архив. 2017. Т.89. №11. С. 4-13. (ИФ РИНЦ = 0.45). Доля участия=30%. 0,52 п.л.

[Chulanov VP, Zueva AP, **Kostyushev DS**, Brezgin SA, Volchkova EV, Maleyev VV. Hepatit S stal izlechim. Hepatit V - sleduiushchiy? [Hepatitis C can be cured: will hepatitis B become next?]. Terapevticheskii arkhiv. 2017. 89(11):4-13. Russian. doi: 10.17116/terarkh201789114-13. (SJR – 0,17, Q2)]. Доля участия=30%. 0,52 п.л.

19. Brezgin S, Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Chulanov V. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications // International Journal of Molecular Sciences. 2019. 20(23):6041. (SJR - 6.208) Доля участия=60%. 1,50 п.л.

20. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Smirnov V, Volchkova E, Lukashev A, Chulanov

V. Gene Editing by Extracellular Vesicles // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21(19):7362. (SJR – 6.208, Q1). Доля участия=80%. 2,07 п.л.

21. Chulanov V, Kostyusheva A, Brezgin S, Ponomareva N, Gegechkori V, Volchkova E, Pimenov N, **Kostyushev D**. CRISPR Screening: Molecular Tools for Studying Virus-Host Interactions // *Viruses*. 2021. 13(11):2258. (SJR – 4.8, Q1). Доля участия=40%. 1,04 п.л.

22. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Ponomareva N, Brezgin S, Chulanov V. CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy: Technological Advances and Practical Barriers // *Nucleic Acids Therapeutics*. 2022. 32(1):14-28. (SJR – 4.0, Q1). Доля участия=90%. 0,81 п.л.

23. Kostyusheva A, Brezgin S, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Host-cell interactions in HBV infection and pathogenesis: the emerging role of m6A modification // *Emerging Microbes and Infections*. 2021. 10(1):2264-2275. (SJR – 12.19, Q1). Доля участия=50%. 0,63 п.л.

24. Brezgin S, Kostyusheva A, Bayurova E, Volchkova E, Gegechkori V, Gordeychuk I, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Immunity and Viral Infections: Modulating Antiviral Response via CRISPR/Cas Systems // *Viruses*. 2021. 13(7):1373. (SJR – 4.8, Q1). Доля участия=20%. 2,13 п.л.

25. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. CRISPR/Cas systems for diagnosing infectious diseases // *Methods*. 2022. 203:431-446. (SJR – 4.647, Q1). Доля участия=50%. 0,86 п.л.

Костюшев Д.С. внес решающий вклад в публикации по теме диссертации, планировании экспериментов, проведении экспериментальных работ, получении, анализе и интерпретации данных, подготовке и опубликовании статей. Основные результаты, представленные в перечисленных работах, получены самим автором.

На диссертацию и автореферат поступило 9 дополнительных отзывов, все положительные.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема – элиминация вируса гепатита В из клеток человека, изложены научно-обоснованные технические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны.

Значимость работы обусловлена разработкой комплексных подходов удаления вирусных геномов и прекращения вирусной репликации в клетках человека. Полученные результаты на различных моделях инфекции и репликации вируса гепатита В могут быть использованы в создании подходов и лекарственных препаратов для полной элиминации вируса гепатита В у пациентов с хроническим гепатитом В. В ходе работы было разработано два подхода – на основе нуклеаз CRISPR/Cas9 и систем CRISPR-активации транскрипции внутриклеточных противовирусных генов APOBEC/AID, которые показали возможность направленного удаления основной причины персистенции вируса гепатита В – кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК). Впервые была показана особая значимость кольцевой частично двуцепочечной ДНК вируса гепатита В в восстановлении пула персистирующего вирусного генома – ккзДНК, после разрушения последнего CRISPR/Cas комплексами. Разработаны принципы удаления вируса из инфицированных клеток и изучены особенности взаимодействия ккзДНК с сайт-направленными нуклеазами CRISPR/Cas и цитидин-деаминазами APOBEC/AID. Изучены особенности разрушения и мутирования вирусных геномов, влияние эпигенетических модификаций вирусных геномов, таких как метилирование ккзДНК, на действие противовирусных комплексов. Определены механизмы внутриклеточной реактивации вируса гепатита В, в том числе из транскрипционно инактивированного состояния, под действием химиотерапевтических препаратов и ДНК-повреждающих агентов. Показана роль вирусного белка HBx в потенцировании реактивации ДНК-повреждающими лекарственными препаратами

Всесторонне изучено токсическое и мутагенное действие APOBEC/AID дезаминаз, показана возможность мутагенного действия APOBEC/AID в клетках человека с низкой репликацией вируса гепатита В. Предложен способ снижения и устранения внецелевого дезаминирования генома человека на основе технологии CRISPR-активации и аттенуированных РНК-проводников.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Ре-импорт кольцевой частично-двуцепочечной ДНК вируса гепатита В из цитоплазмы в ядро клеток обеспечивает персистенцию вируса и хронизацию инфекции в условиях разрушения «депо» вируса в виде внутриядерного пула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В.

2. Истощение уровней кольцевой частично двуцепочечной ДНК аналогами нуклеот(з)идов перед разрушением кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В способствует полному удалению вируса из инфицированных клеток.

3. При гиперэкспрессии цитидин-дезаминазы АРОВЕС/АID разрушают и гипермутируют кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В и вызывают мутации в геноме человека при снижении вирусной нагрузки в инфицированных клетках.

4. Противовирусная активность сохраняется при снижении уровней гиперэкспрессии АРОВЕС3А/3В, при этом не происходит дезаминирования генома клеток человека.

На заседании 06 февраля 2025 года диссертационный совет принял решение присудить Костюшеву Д.С. ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 12 человек, из них 6 докторов наук по специальности - вирусология, участвовавших в заседании, из 17 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 12, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета МГУ.015.4,
д.б.н., профессор

Аграновский А.А.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.4,
д.б.н.

Комарова Т.В.

06.02.2025