

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора,
заведующего Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и
вирусологии**

**Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»**

Нетёсова Сергея Викторовича

**на диссертационную работу Костюшева Дмитрия Сергеевича
«Разработка подходов к разрушению кольцевой ковалентно замкнутой
ДНК вируса гепатита В с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.02.02 – вирусология**

Актуальность темы исследования

Хронический гепатит В является практически неизлечимым заболеванием печени, смертность от прямых последствий которого превышает 1 миллион человек в год. Диссертация Костюшева Д.С. посвящена разработке новых подходов для лечения хронического гепатита В путем разрушения непосредственно в организме человека ДНК вируса гепатита В с помощью систем нуклеаз CRISPR/Cas9. При этом компоненты этих систем специфическим образом связываются с заданными участками генома вируса гепатита В за счет направляющих РНК-проводников, после чего вносят двуцепочечный разрыв в ДНК. К сожалению, наиболее часто используемые системы редактирования генома CRISPR/Cas9 характеризуются низкой эффективностью действия и высокой частотой внецелевых эффектов, то есть эффектов, связанных с разрезанием не только мишени в геноме вируса, но и участков генома человека. Несмотря на то, что системы нуклеаз CRISPR/Cas9 обладают большим потенциалом для создания на их основе противовирусных препаратов, такие побочные эффекты функционирования CRISPR/Cas9 систем являются серьезным препятствием для их безопасного и эффективного использования.

В работе Костюшева Д.С. проведено исследование различных вариантов систем CRISPR/Cas9 и дополнительный скрининг различных РНК-

проводников, направленных на консервативные участки генома вируса гепатита В. Особо стоит отметить, что использование трех видов систем CRISPR/Cas9 (от организмов *Streptococcus thermophilus*, *Neisseria meningitidis* и *Francisella novicida*) на моделях вируса гепатита В впервые описано в работе Костюшева Д.С. В результате выявлено, что система CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* обладает высокой эффективностью действия, снижая транскрипцию генома вируса на 99%, а также высокой специфичностью действия и не вносит разрывы в геном человека. По результатам скрининга выявлены эффективные РНК-проводники, мишенью которых являются высококонсервативные регионы генома вируса гепатита В. Следовательно, данные РНК-проводники можно использовать для разрушения генома вируса гепатита В практически любого генотипа.

Тема исследования является актуальной, поскольку на сегодняшний день отсутствуют противовирусные препараты, способные разрушать геномы вируса гепатита В и полностью элиминировать вирус из организма. Показано также, что некоторые варианты системы CRISPR/Cas9 являются перспективными для создания на их основе противовирусных препаратов нового поколения.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В процессе работы Костюшевым Д.С. были разработаны РНК-проводники, пригодные для разрушения геномов вируса гепатита В практически любого генотипа. Исследования проводились на нескольких моделях вируса гепатита В, которые воспроизводят вирусный цикл. В результате некоторые варианты систем CRISPR/Cas9 полностью прерывали либо значительно снижали продукцию вирусных белков, подавляли транскрипцию вируса до уровня 1%, разрушали геномы вируса гепатита В или вызывали образование мутаций в целевых участках его генома. Также проведено изучение свойств системы CRISPR/Cas9 в варианте с организмом

Streptococcus thermophilus, а именно - способность игнорировать несовпадения нуклеотидов между последовательностями РНК-проводников и мишенью в геноме вирусов. Выявлено, что однонуклеотидные замены не оказывают влияния на противовирусную и нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9, в то время как наличие двух и более несовпадений блокирует противовирусную активность и значительно снижает либо отменяет нуклеолитическое разрезание мишени.

Таким образом, результаты проведенной работы могут лечь в основу новых препаратов для лечения хронического гепатита В. А в случае успеха этого подхода он может быть применен и для элиминации других хронических инфекций, таких как ВИЧ, герпесвирусы, вирусы папилломы человека и т.д.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Полученные Костюшевым Д.С. результаты имеют большое фундаментальное значение для области генетического редактирования, области вирусологии и гепатологии. Автором работы впервые охарактеризована система *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В, а также продемонстрировано влияние мутаций в геноме вируса гепатита В на эффективность противовирусного и нуклеолитического действия сайт-специфических нуклеаз. В практическом плане в диссертационной работе Костюшева Д.С. показано, что система CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* является оптимально для создания (в перспективе) противовирусных препаратов на ее основе, а также созданы РНК-проводники к высококонсервативным регионам генома вируса гепатита В, которые можно использовать для разрушения вируса практически любого генотипа.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Работа Костюшева Д.С. выполнена на высоком методическом уровне, использованы современные методы вирусологии, молекулярной и клеточной биологии. Результаты исследований получены на современном оборудовании, результаты задокументированы и подвергнуты статистической обработке. Достоверность данных не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и напрямую вытекают из полученных в ходе экспериментов результатов, соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых журналах и доложены на зарубежных и российских конференциях, получен патент на изобретение.

Структура работы

Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 139 страницах текста и проиллюстрирована 28 рисунками, 4 таблицами и 2 приложениями. Список литературы насчитывает 141 источник.

Во введении убедительно обоснована актуальность выбранной темы, четко определены задачи исследования, которые полностью отражают подходы для достижения поставленной цели. «Обзор литературы» включает описание жизненного цикла и патогенеза вируса гепатита В: подробно разобраны строение вируса гепатита В, структура его генома, приведены сведения об этапах жизненного цикла вируса, описаны механизмы регуляции транскрипции, репликации вируса и структура кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В. Существенная часть обзора посвящена функционированию систем CRISPR/Cas9: механизмы действия, строение, составляющие компоненты, целевая и внецелевая активности.

Вместе с этим Костюшев Д.С. подробно рассматривает известные данные по использованию CRISPR/Cas9 для внесения мутаций в кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В. В последней части обзора автор рассматривает CRISPR/Cas9 системы в качестве возможных противовирусных агентов.

В разделе «Материалы и методы» приведены все методы, использованные в работе. Методики описаны подробно, демонстрируют высокий экспериментальный уровень представленной работы и адекватны поставленным задачам.

В главе «Результаты и обсуждение» Костюшев Д.С. подробно описывает дизайн исследования, схемы экспериментов и их результаты. Для достоверного выявления противовирусного действия CRISPR/Cas9 систем работа была проведена на многочисленных моделях ВГВ-инфекции на культурах клеток, включая модель трансфекции плазмидой, кодирующей геном гепатита В, модель трансфекции рекомбинантной кольцевой ковалентно замкнутой ДНК, а также на моделях хронической репликации вируса.

Автором проведено сравнение эффективности противовирусного действия четырех систем CRISPR/Cas9, из которых системы от организмов *Neisseria meningitidis* и *Francisella novicida* не обладают выраженной противовирусной активностью, в то время как системы CRISPR/Cas9 от организмов *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus thermophilus* эффективно подавляют транскрипцию и репликацию вируса и элиминируют до 90% кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. Автором созданы РНК-проводники на консервативные участки генома вируса гепатита В, которые обеспечивали практически полное прекращение транскрипции и репликации вируса.

Впервые в данной работе описана система CRISPR/Cas9 с нуклеазой из организма *Streptococcus thermophilus*, оценено ее противовирусное действие, специфичность нуклеолитического разрезания и свойство игнорировать нуклеотидные несовпадения между РНК-проводниками и ДНК-мишенью.

Данная система обладает рядом преимуществ, таких как меньшая молекулярная масса в сравнении с наиболее часто используемой системой от организма *Streptococcus pyogenes*, более высокая специфичность действия и меньшая вероятность образования внецелевых разрывов в геноме человека.

В заключительном разделе представлены заключение и выводы, сделанные в результате работы. Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

1. Поскольку вариабельность в целевых регионах генома вируса гепатита В может не ограничиваться одно-, двух- и трехнуклеотидными несовпадениями, целесообразно рассмотреть также возможность разрезания системой CRISPR/Cas9 геномов со сложным профилем мутаций, например, выявленных у конкретных пациентов;
2. Оценку противовирусного действия стоит в дальнейших исследованиях оценить на моделях инфекции вирусом гепатита В, например, на модели первичных гепатоцитов либо модели HepG2-NTCP.

Замечания и вопросы по содержанию работы

1. Серьезные замечания к диссертационной работе отсутствуют, дальнейшие комментарии носят рекомендательный характер;
2. Интересно было бы оценить возможность иммунного ответа в ответ на белок StCas9 либо РНК-проводники. В частности, автор может создать генно-инженерный StCas9 белок, лишенный иммуногенных сайтов по аналогии с CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes*;
3. Рассмотрение внецелевого действия систем CRISPR/Cas9 с помощью полногеномного анализа также необходимо для убедительного доказательства отсутствия внецелевого действия нуклеаз и безопасности системы;

4. Существуют ли на данный момент модели вируса гепатита В *in vivo*, приближенные к человеку? Возможно ли проверить действие нуклеаз на данных моделях?

Заключение

В диссертационной работе была проведена разработка подхода по разрушению ДНК вируса гепатита В и элиминации вируса с помощью высокоспецифичной системы CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* с РНК-проводниками, пригодными для разрушения генома вируса гепатита В практически любого генотипа. Научная работа Костюшева Д.С. хорошо продумана, логически выстроена и заслуживает высокой оценки. Для выполнения поставленных задач был проделан большой объем работ с использованием самых современных методов. Результаты были доложены на международных и российских конференциях, представительно опубликованы в высокорейтинговых журналах, был получен патент. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а Костюшев Дмитрий Сергеевич несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - вирусология.

Работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года (с изменением Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Костюшев Дмитрий Сергеевич, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент,
Заведующий Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии Федерального государственного автономного образовательного

учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ), доктор биологических наук, профессор член-корреспондент РАН

С.В. Нетёсов

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:
Ученый секретарь НГУ, к.х.н.



Е.А.Тарабан

09 сентября 2019 года

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет». Тел (383) 363-43-33. <http://www.nsu.ru>

Нетёсов Сергей Викторович. Тел. (383) 363-4203; сот.: +7-913-910-0843.
Эл. почта svn15@hotmail.com и netesov.s@nsu.ru.