

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Костюшевой Анастасии Павловны «Влияние модуляции путей репарации нуклеолитических разрывов в геноме вируса гепатита В на противовирусное действие CRISPR/Cas9», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы исследования

Тема хронического гепатита В актуальна и для нашей страны, и для всего мира, в особенности Азиатского и Тихоокеанского региона, где число заболевших исчисляется сотнями миллионов человек. Существующие в настоящее время терапевтические подходы не позволяют полностью вылечить хронический гепатит В и добиться элиминации вируса гепатита В из организма. В редких случаях удается достичь функционального излечения. Одной из наиболее перспективных технологий, которая может действовать напрямую на причину хронического гепатита В, кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, является система нуклеаз CRISPR/Cas9. Тем не менее, для эффективного использования систем CRISPR/Cas9 необходим поиск оптимальной конфигурации системы. Кроме того, особенности жизненного цикла вируса могут снижать эффективность расщепления системами сайт-специфических нуклеаз. Поскольку кольцевая ковалентно замкнутая ДНК представляет из себя эписому, упакованную в гистоновые и негистоновые белки клетки, она использует клеточные механизмы регуляции. Двухцепочечные разрывы, вносимые в кольцевую ковалентно замкнутую ДНК системами сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9, репарируются системами клетки. Одним из потенциальных способов воздействия на эффективность сайт-специфических нуклеаз является модуляция путей репарации двухцепочечных разрывов NHEJ/HR. Эти пути репарации являются основными сигнальными путями, которые активируются в клетке в ответ на двухцепочечные разрывы ДНК. Путь HR обеспечивает бесшовную репарацию,

тогда как путь NHEJ приводит к возникновению мутаций в репарируемой матрице.

В данной диссертационной работе изучено влияние факторов, модулирующих активность путей репарации, на противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на модели инфекции вируса гепатита В в культуре клеток.

Научная новизна исследования

В ходе работы впервые был произведен анализ нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 на цикл вируса гепатита В в комбинации с факторами, действующими на активность путей репарации NHEJ/HR. Кроме того, были проанализированы исходы репарации двуцепочечных разрывов в кольцевой ковалентно замкнутой ДНК после расщепления сайт-специфическими нуклеазами CRISPR/Cas9. Впервые было показано, что большая часть матриц кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса гепатита В может подвергаться деградации после внесения разрывов в целевом регионе с помощью нуклеаз CRISPR/Cas9. Это особенно важно, поскольку изначально противовирусное действие CRISPR/Cas9 связывали в большей степени с накоплением мутаций в ккзДНК вируса в сайтах разрывов, сдвигах рамок считывания и, таким образом, подавлением репликации, но не с прямой деградацией ккзДНК. Также автором было доказано, что использование ингибитора NHEJ, низкомолекулярного соединения NU7026, препятствует разрушению ккзДНК и вызывает образование многочисленных форм ккзДНК с делециями нуклеотидов в сайте нуклеолитического разрыва.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне, полученные результаты достоверны и статистически обоснованы. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с полученными результатами и соответствуют поставленным при проведении исследования задачам. Результаты диссертационной работы Костюшевой А.П. представлены в статьях, опубликованных в

высокорейтинговых иностранных и отечественных журналах, получен патент. Материалы диссертации докладывались на международных научных конференциях, о чем говорят публикации тезисов устных и постерных докладов.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 98 страницах машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 131 источник, из которых 130 источников зарубежной литературы и 1 источник отечественной литературы.

В главе «Введение» автором сформулированы актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна полученных результатов. Обзор литературы состоит из 3 разделов. В первом разделе автор подробно рассматривает аспекты жизненного цикла вируса гепатита В, описывает механизм хронизации инфекции и особенности строения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. Во втором разделе рассматриваются возможности современной и экспериментальной терапии инфекции вирусом гепатита В, описываются особенности функционирования и использования систем CRISPR/Cas9 и попытки создать на их основе инструменты для терапии хронического гепатита В. В третьем разделе автор описывает пути репарации двуцепочечных разрывов NHEJ/HR и способы изменения их активности с помощью низкомолекулярных соединений.

В главе «Материалы и методы» описаны используемые в работе методы. Все применяемые автором методы описаны подробно и четко, с описанием каждого этапа исследования. Данные обработаны с использованием адекватных методов статистического анализа.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 5 больших разделов, посвященных разным этапам работы. В первом разделе автор приводит

полную характеристику клеточных линий, использованных в работе. Данные линии клеток способны воспроизводить полноценный инфекционный цикл вируса, включая образование ккзДНК, экспрессию РНК и секрецию вирусных частиц. Во втором разделе описывается влияние модуляторов путей репарации NHEJ/HR на транскрипцию и репликацию вируса гепатита В. Автор приводит использованные в работе модуляторы путей репарации, описывает механизм их действия и оценивает их влияние на цикл репликации вируса гепатита В. Было выяснено, что растворы низкомолекулярных соединений, модуляторов путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК NHEJ и HR, в выбранных концентрациях могут снижать транскрипцию вируса, не оказывают значительного влияния на уровни ккзДНК и репликацию вируса, при этом эффекты низкомолекулярных соединений могут во многом зависеть от используемых моделей вирусной инфекции. В следующем разделе проводятся измерения цито- и генотоксических эффектов выбранных концентраций соединений несколькими методами. Автором продемонстрировано, что в совокупности химическое соединение 3-aza оказывает токсическое действие на клетки при действии CRISPR/Cas9, в то время остальные использованные в работе низкомолекулярные соединения не изменяют жизнеспособности клеток. В следующем разделе автором проводится оценка влияния модуляции путей репарации на противовирусное действие систем CRISPR/Cas9. Автором показано, что системы CRISPR/Cas9 могут высокоэффективно подавлять транскрипцию и разрушать ккзДНК, ключевую форму генома вируса, при этом описанные энхансеры CRISPR/Cas9 и модуляторы активности NHEJ/HR не улучшают либо снижают противовирусное действие нуклеаз, а соединение NU7026 препятствует деградации ккзДНК. И, наконец, в последнем разделе, рассматривается судьба двуцепочечных разрывов, вносимых системами CRISPR/Cas9. Исходя из полученных результатов, автор делает вывод, что ккзДНК преимущественно разрушается под действием систем CRISPR/Cas9, ранее описанные как энхансеры CRISPR/Cas9 факторы не увеличивают

противовирусное действие системы, в то время как ингибирование пути NHEJ с помощью фактора NU7026 препятствует деградации ккзДНК и вызывает образование гипермутированных матриц ккзДНК с многочисленными делециями в сайтах разрезания нуклеазами.

Замечания и вопросы по содержанию работы

Принципиальных замечания к работе отсутствуют, в рамках работы проведена всесторонняя оценка полученных данных, приведены убедительные, научно-обоснованные, доказательства наблюдаемых явлений. Отмечу ряд вопросов и рекомендаций, которые адресую автору работы:

1. Как можно использовать результаты работы при практическом создании лекарственного препарата для лечения вирусного гепатита В?
2. Какие подходы, по мнению автора, должны использоваться для оценки безопасности системы CRISPR/Cas9 при доклинических и клинических испытаниях данного препарата?
3. По мнению автора, существуют ли другие перспективные направления в разработке препаратов для элиминации вируса гепатита В из организма?

Заключение

В диссертационной работе было изучено действие модуляторов путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК на противовирусное и нуклеолитическое действие систем нуклеаз CRISPR/Cas9 на моделях вирусного гепатита В. Был сделан ряд важных научных открытий, а именно впервые показано, что большая часть матриц ккзДНК вируса гепатита В деградирует при действии CRISPR/Cas9, а также выявлено, что ингибирование пути NHEJ препятствует деградации ккзДНК вируса гепатита В при действии нуклеаз, но вызывает образование многочисленных мутаций в сайтах разрезания. Научная работа Костюшевой А.П. выполнена на очень высоком научно-методическом уровне, результаты воспроизведены в многочисленных повторах и условиях, проведена разносторонняя оценка полученных данных с использованием самых современных методов.

Результаты были доложены на множестве конференций, как российских, так и международных, Костюшева А.П. является автором научных работ по теме диссертации, в том числе в ведущих мировых изданиях, получен патент на изобретение. Работа Костюшевой А.П. соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям, а Костюшева А.П., 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, Костюшева Анастасия Павловна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией вирусных гепатитов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
 Научный руководитель Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН

М.И. Михайлов

Подпись Заведующего лабораторией вирусных гепатитов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», д.м.н., проф., член-корреспондента РАН Михайлова М.И. заверяю, Учёный секретарь Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, кандидат медицинских наук



С.Н. Жирова

« 13 » декабря 2019