ОТЗЫВ

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», официального оппонента доктора биологических наук, профессора, заведующей лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» Каргановой Галины Григорьевны.

Хронический гепатит В (ХГВ) является одной из ключевых проблем мирового здравоохранения, совокупная смертность от исходов ХГВ составляет более 1 миллиона человек в год. Препараты аналогов нуклеотидов и нуклеозидов эффективно подавляют репликацию вируса, однако не элиминируют вирус из организма. Причина хронической инфекции – внутриклеточная форма генома вируса, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК). Разрушение ккзДНК открывает путь к полному излечению хронической инфекции и элиминации заболевания. Технологии сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 могут разрезать ДНК-мишени в заданных регионах, программируемых с помощью коротких последовательностей РНК (РНК-проводников). Следовательно, системы CRISPR/Cas9 являются перспективными инструментами для создания на их основе противовирусных подходов нового поколения.

Поскольку кольцевая ковалентно замкнутая ДНК представляет собой эписому, упакованную в гистоновые и негистоновые белки клетки, она использует клеточные механизмы регуляции. Двуцепочечные разрывы, вносимые в ккзДНК системами сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9, репарируются системами клетки. Одним из потенциальных способов повышения эффективности сайт-специфических нуклеаз является модуляция путей репарации двуцепочечных разрывов NHEJ/HR. Эти пути репарации являются основными сигнальными путями, которые активируются в клетке в ответ на двуцепочечные разрывы ДНК. Путь HR, или гомологичная

репарация, приводит к бесшовному восстановлению целостности ДНК, а путь NHEJ вызывает мутации в сайтах репарации.

Диссертационная работа Костюшевой А.П. посвящена проверке гипотезы о возможности повышения эффективности использования системы CRISPR/Cas9 для разрушения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В с помощью воздействия на систему репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Полученные автором данные показывают, что при высокой эффективности системы CRISPR/Cas9 дополнительные способы ее повышения не требуются и могут иметь даже отрицательный эффект. В ходе работы впервые был произведен анализ влияния факторов, модулирующих активность путей репарации ДНК, на репликацию вируса, а также на нуклеолитическое и противовирусное действие CRISPR/Cas9.

Диссертационное исследование выполнено на современном экспериментальном уровне, полученные результаты достоверны, о чем свидетельствует наличие многочисленных контролей, воспроизведение результатов в независимых экспериментах, на различных моделях, использование многочисленных методов анализа. Данные обоснованы статистически. 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 ведущих иностранных и отечественных журналах, по результатам исследования получен патент. Материалы диссертации докладывались на различных международных научных конференциях, в том числе с несколькими устными докладами.

Диссертационная работа построена по классической схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводы, список использованных сокращений и список использованной литературы. Работа изложена на 114 страницах

машинописного текста, иллюстрирована 27 рисунками и 7 таблицами. Список литературы включает 163 источник.

В главе «Введение» автором сформулированы актуальность работы, цель и задачи проводимого исследования, научная новизна и значимость полученных результатов. На мой взгляд, теоретическая значимость полученных результатов оценена недостаточно, поскольку представлена новая информация о процессах репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Обзор литературы состоит из 5 разделов. В первом разделе автор описывает биологию вируса гепатита В, механизмы хронизации инфекции и особенности строения кольцевой ковалентно замкнутой ДНК. Во втором разделе рассматриваются особенности вирусного цикла на различных моделях клеток in vitro. Третий раздел посвящен современным подходам к лечению хронической инфекции, в том числе с использованием CRISPR/Cas9. В четвертом разделе представлены механизмы репарации двуцепочечных разрывов ДНК по путям NHEJ/HR. В пятом разделе подробно описаны факторы (низкомолекулярные и белковые соединения), влияющие на активность путей репарации NHEJ/HR.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены используемые в работе экспериментальные методы и методы статистического анализа. Используемые подходы и методики соответствуют поставленным задачам. В этом разделе было бы хорошо привести информацию об источнике линий клеток HepG2-1.1merHBV, HepG2-1.5merHBV и HEK293T и низкомолекулярных соединений. Эти данные приведены в разделе «Результаты», но лучше их приводить в разделе «Материалы и методы».

Глава «Результаты и обсуждение» включает 5 больших разделов, посвященных разным этапам работы. В первом разделе автор приводит полную характеристику клеточных линий, имитирующих хроническую инфекцию вируса гепатита В. Данные линии клеток воспроизводят полноценный инфекционный цикл вируса, включая образование ккзДНК,

экспрессию РНК и секрецию частиц. Автор проводит сравнение линий клеток по различным параметрам цикла вируса, описывает особенности каждой из линий.

Во втором разделе рассматривается влияние различных модуляторов путей репарации NHEJ/HR на транскрипцию и репликацию вируса гепатита В. Автор описывает механизм действия модуляторов путей репарации и оценивает их влияние на цикл вируса. Было выяснено, что растворы низкомолекулярных соединений, модуляторов путей репарации двуцепочечных разрывов NHEJ и HR, в выбранных концентрациях могут снижать транскрипцию вируса, не оказывая при этом значительного влияния на уровни кольцевой ковалентно замкнутой ДНК 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 соединений несколькими методами, в том числе в динамике с измерениями на нескольких временных промежутках. Было показано, 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 влияют на жизнеспособность клеток.

Далее автором проводится оценка влияния модуляции путей репарации на противовирусное действие систем CRISPR/Cas9. Продемонстрировано, что системы CRISPR/Cas9 сами по себе высокоэффективно подавляют транскрипцию и разрушают кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, ключевую форму генома вируса, при этом описанные энхансеры CRISPR/Cas9 и модуляторы активности NHEJ/HR либо не улучшают, либо снижают противовирусное действие нуклеаз, а соединение NU7026 препятствует деградации кольцевой ковалентно замкнутой ДНК.

В последнем разделе рассматривается судьба двуцепочечных разрывов, вносимых системами CRISPR/Cas9. Исходя из полученных результатов, автор делает вывод, что кольцевая ковалентно замкнутая ДНК 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 нуклеаз.

В качестве замечаний хотелось бы отметить, что первый вывод написан, на мой взгляд, некорректно. Еще до автора было показано, что системы CRISPR/Cas9 могут разрушать ккзДНК ВГВ. В данной работе показано, что при использованных автором условиях, в первую очередь РНК-проводников, эффективность такого разрушения настолько высокая, что дополнительные способы ее повышения не нужны. Такая формулировка больше бы соответствовала полученным автором результатам и не вызывала бы ненужных вопросов.

Есть несколько общих замечаний по оформлению:

- при указании достоверности или недостоверности различий между данными следует указывать статистический критерий, который был использован в данном случае, хотя бы в подписях к рисункам.

- оформление автореферата значительно выиграло бы, если бы были использованы цветные рисунки.

Замечания не снижают значимости полученных результатов.

В целом, 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 Костюшева Анастасия

Павловна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «вирусология».

Отзыв составил:
Заведующая лабораторией
биологии арбовирусов
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
доктор биологических наук, профессор Г.Г. Карганова.
«___»_____ 2019 года

Подпись д.б.н., профессора Г.Г. Каргановой удостоверяю
Ученый секретарь ФГБНУ
«ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
кандидат биологических наук А.В. Белякова.
«___»_____ 2019 года

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»)
Адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819
Тел./факс (495) 841-90-02; (495) 549-67-60; (495) 841-93-21
E-mail: sue_polio@chumakovs.su
http://www.chumakovs.ru