

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Ким Дарьи Вячеславовны «Получение и характеристика линий клеток человека, дефицитных по генам эксцизионной репарации оснований, с помощью системы CRISPR/Cas9», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Эксцизионная репарация оснований ДНК (BER) является ключевым механизмом защиты генома от повреждений, вызванных окислением, дезаминированием и действием других генотоксических агентов. Процесс BER включает в себя несколько этапов: удаление поврежденного основания, расщепление цепи ДНК, включение неповрежденного нуклеотида и лигирование ДНК. Дефицит в системе BER приводит к серьезным заболеваниям, включая рак и нейродегенеративные расстройства.

Диссертационная работа Дарьи Вячеславовны посвящена решению актуальных вопросов в области BER. Работа базируется на полученных с помощью геномного редактирования клеточных линий человека с нокаутами ключевых генов репарационных путей, таких как APEX1, POLB, OGG1 и MUTYH. Стоит подчеркнуть, что полученная в работе панель изогенных клеточных линий, дефицитных по генам, ключевым участникам BER представляет особую ценность, как для научных исследований, так и для биофармацевтической поиска перспективных препаратов. Эти клетки могут быть использованы для скрининга и оценки генотоксичности новых химических соединений и лекарственных препаратов.

Помимо интересных научных результатов о участии отдельных ферментов BER в репарации поврежденных нуклеотидов, также отмечу что в работе были разработаны новые генетические сенсоры на основе EGFP. Показано, что полученные сенсоры можно использовать для решения широкого круга смежных задач в области BER.

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты и их обсуждение", "Заключение" и "Выводы".

Во “Введении” кратко обосновывается актуальность работы, формулируются цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также приводятся положения, выносимые на защиту. Этот раздел хорошо написан и позволяет получить первое представление об области исследования, масштабах проделанной работы и важности полученных результатов.

В главе Обзор литературы проводится анализ публикаций по теме исследования. Этот раздел хорошо структурирован и логично скомпонован. В разделе кратко описан механизм BER, а затем детально разобраны вопросы, непосредственно касающиеся предмета исследования диссертационной работы. В частности, отдельно разбирается роль ключевых ферментов участвующих в BER. Подробно анализируются имеющиеся сведения клеточных моделях дефицитных по факторам репарации BER. Несомненным достоинством главы является раздел Заключение, в котором тезисно сформулированы основные имеющиеся в литературе данные, непосредственно касающиеся темы исследования и полученных в работе результатов. Также хочу подчеркнуть достаточность Обзора литературы - в нем есть все, что нужно для понимания места диссертационной работы в мировой науке.

Глава “Материалы и методы” написана с детализацией, достаточной для понимания технических тонкостей проведенных работ и воспроизведения основных экспериментов.

Глава “Результаты и их обсуждение” начинается с описания создания клеточных линий нокаутных по выбранным ферментам участвующим в BER. Выбранный уровень детализации этого этапа работ, а также стереотипное описание получения нокаутных линий позволяют сформировать представление о характеристике каждой из полученных в работе линий клеток. В этом разделе приводятся генетические доказательства нокаута выбранных генов, а также, для некоторых из них, приводятся результаты иммуноблоттинга свидетельствующие о потере белка.

Важным этапом для проведения исследований явилось создание новых сенсоров транскрипционного мутагенеза на основе белка EGFP. В этой части работы подробно со схемами, описывается очень элегантный и остроумный способ скрининга возможных вариантов замен в гене EGFP которые в итоге и позволили создать новые сенсоры ТМ. Особо подчеркну продуманность и информативность схем описывающих

методику получения результатов. Без этих схем, на мой взгляд, невозможно было бы понять сложный дизайн выполненного эксперимента.

В заключительной части раздела на основе полученных клеточных линий и сконструированных сенсоров транскрипционного мутагенеза производится оценка функциональных последствий нокаута генов BER. Из созданных в работе клеток подробнее всего охарактеризованы линии с нокаутом гена APEX1. Подтверждено отсутствие способности экстрактов из таких клеток расщеплять альдегидный АП-сайт и его тетрагидрофурановый аналог (ТНФ) и инициировать цикл BER *in vitro*, повышенная чувствительность к алкилирующему агенту метиламетансульфонату и повышенный уровень спонтанно образующихся АП-сайтов в геномной ДНК. Кроме того показано, что такие клетки были способны эффективно репарировать как ТНФ, так и АП-сайты, возникающие при удалении урацила внутри клетки. Это говорит о существовании дублирующих путей, позволяющих обойти APEX1, несмотря на его ключевую роль в пути BER.

На основании полученных результатов в диссертации сформулированы пять выводов. Выводы являются обоснованными, в полной мере отражают выявленные закономерности и полностью соответствуют полученным результатам.

В целом, диссертация хорошо написана, работа оставляет впечатление качественно выполненной и законченной. Тем не менее, имеется ряд замечаний и вопросов, которые приведены ниже.

1. Клон APEX1 2A9 по результатам TIDE содержал делеции и инсерции, а при клонировании ПЦР продуктов обнаружилась только инсерция +1. Клон APEX2 1A4 тоже репертуар в TIDE и клонировании не совпадает. Следует обсудить недостатки этих методов и обозначить какой из них дает результат ближе к истине.
2. Автор обнаружил увеличение экспрессии OGG и MUTYH, NEIL2 у клонов с нокаутом APEX1. Однако, мне кажется, это чересчур оптимистичная интерпретация полученного результата. Поскольку на выборке из двух моноклонов адекватно оценить дисперсию активности этих генов возникающую при моноклонировании не получится.

3. Для нокаутных линий по генам APEX2 и OGG1 нет иммуноблоттинга доказывающего потерю белка, поэтому остается гипотетическая возможность что в клетках остаются функциональные копии генов. Например из-за потери сайта посадки праймеров. Такие случаи описаны в литературе, и довольно часто встречаются в практике получения нокаутных линий с помощью CRISPR/Cas9. Поэтому надо с осторожностью интерпретировать результаты полученные на этих линиях. Например в работе упомянуто, что клетки с двойным нокаутом по APEX1 и APEX2 не отличаются по активности BER от нокаутов по APEX1. Из чего делается заключение, что APEX2 не вносит существенного вклада. Мне кажется это утверждение стоит смягчить и в явном виде указать ограничения связанные с отсутствием доказательств потери APEX2 в клетках.
4. Из текста диссертации не ясно воспроизводился ли результат скрининга влияния мисматчей в кодирующей части EGFP на уровень флуоресценции клеток (Рисунок 58). Поэтому непонятно насколько надежны приведенные количественные оценки, или же их следует интерпретировать скорее как качественные?

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают моей высокой оценки работы Д.В. Ким, а замечания носят рекомендательный характер. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Работа представляет значительный вклад в понимание механизмов эксцизионной репарации оснований ДНК и ее роли в поддержании геномной стабильности, а также в разработке новых подходов для оценки генотоксичности и поиска новых лекарственных средств. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

**Заключение.** Диссертационная работа на тему «Получение и характеристика линий клеток человека, дефицитных по генам эксцизионной репарации оснований, с помощью системы CRISPR/Cas9» соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемых к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Таким образом, соискатель Ким Дарья Вячеславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией генетики развития,  
ФИЦ ИЦиГ СО РАН, кандидат биологических наук  
Н.Р. Баттулин



02.02.2024

Адрес места работы:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10  
Для телеграмм: Новосибирск 90, ЦИТОЛОГИЯ  
Телефон: +7(383) 363-49-80  
Факс: +7(383) 333-12-78  
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись Баттулина Н.Р. заверяю:

ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.,

Орлова Г.В.



02.02.2024