ОТЗЫВ

научного руководителя о Прохоровой Дарье Вадимовне, представившей диссертацию «Влияние модифицированных нуклеотидов в составе направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9» на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности

1.5.4 – биохимия

Прохорова Дарья Вадимовна закончила химическое отделение факультета естественных наук Новосибирского государственного университета на кафедре молекулярной биологии в 2018 г. (магистр), затем поступила в аспирантуру НГУ и закончила ее в 2022 г. С августа 2018 года Дарья работает в Лаборатории геномного редактирования Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Диссертационная работа Прохоровой Д.В. посвящена исследованию влияния модифицированных нуклеотидов в структуре направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9. В качестве объектов исследования были выбраны модифицированные направляющие РНК, содержащие N6-метиладенозин (m6A), псевдоуридин (Ψ), 5-метилцитидин (m5C) и N1-метилпсевдоуридин (m1Ψ), а также химерные sgРНК, содержащие фосфорилгуанидиновые (ФГ) группы. Ранее не было изучено влияние выбранных модификаций на активность системы CRISPR/Cas9. В то же время известно, что модификации позволяют придать РНК новые желаемые свойства, в частности, снижение иммуностимулирующей и цитотоксической активности. При этом сама система CRISPR/Cas9 характеризуется неабсолютной точностью, что препятствует ее внедрению в практику. В рамках работы впервые была показана возможность формирования каталитически активных комплексов белка Cas9 как с модифицированными m6A, Ψ, m5C и m1Ψ sgРНК, так и с химерными sgРНК, содержащими ФГ-модификации. Кроме того, было определено, что наиболее критичными областями включения модификаций m6A, Ψ, m5C и m1Ψ в sgРНК является PAM-проксимальная область спейсера, а при включении ФГ групп в химерные sgРНК – четвертое положение с 5'-конца химерной sgРНК. В результате исследования была показана возможность увеличения специфичности системы CRISPR/Cas9 при использовании модифицированных направляющих РНК *in vitro*, что стало основным наиболее перспективным результатом работы. Так, введение m1Ψ в sgРНК в сравнении с другими модифицированными нуклеотидными остатками позволяет значительно снизить нецелевые эффекты, а включение ФГ модификаций в химерные sgРНК по сравнению с широко известными аналогами - тиофосфатными и 2'-F группами значительно увеличивает точность расщепления ДНК-субстратов белком Cas9.

Стоит отметить, что за время выполнения работы Дарья Вадимовна овладела широким спектром методов и продемонстрировала готовность самостоятельно решать задачи по постановке методик, планированию экспериментов и анализу полученных

данных. В ходе работы был разработан оригинальный протокол оценки эффективности гидролиза ДНК-субстрата с применением стадии выделения на автоматической станции и последующим капиллярным гель-электрофорезом на автоматическом генном анализаторе. Для оценки активности РНП белка Cas9 с модифицированными РНК на клетках человека был адаптирован метод цифровой ПЦР.

За время выполнения исследовательской работы Дарья Вадимовна проявила себя очень ответственным, целеустремленным, самостоятельным и настойчивым исследователем, заинтересованным в качественном результате экспериментальной работы. Исследование, выполненное в рамках представленной работы, является частью научного проекта, поддержанного Российским научным фондом по программе развития генетических технологий. Высокий уровень выполнения экспериментов и всестороннее обсуждение полученных данных позволили опубликовать результаты работы в высокорейтинговых журналах из списка Q1 CRISPR journal, ACS Chemical Biology и International Journal of Molecular Sciences. Результаты работы были неоднократно представлены в докладах на российских и зарубежных международных конференциях. Во время написания диссертации Дарья Вадимовна проявила самостоятельность и умение грамотно и последовательно описывать полученные результаты

Диссертационная работа Прохоровой Д.В. представляет собой завершенное исследование и отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Научный руководитель к.х.н.

Степанов Г.А.

Подпись Степанова Г.А. заверяю
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
к.б.н.

Логашенко Е.Б.