

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Прохоровой Дарьи Вадимовны «Влияние модифицированных нуклеотидов в составе направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Диссертационное исследование Д.В. Прохоровой посвящено оценке влияния введения модифицированных нуклеотидов в состав направляющих РНК на активность системы CRISPR/Cas9. В диссертации подробно рассматривается влияние введения четырех природных модификаций азотистых оснований m6A, m5C, Ψ и m1Ψ, а также введение фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов в направляющие РНК. Рассматривается влияние модификаций на эффективность разрезания целевой последовательности, а также влияние на специфичность разрезания, то есть способность разрезать похожую последовательность ДНК. Поскольку введение модифицированных нуклеотидов не только меняет эффективность и специфичность системы CRISPR/Cas9, но также сказывается на активизации врожденного иммунитета клеток к экзогенным молекулам РНК, поэтому представленная работа имеет не только фундаментальное академическое значение, но и явным образом, нацелена на решение практических вопросов геномного редактирования.

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы "Введение", "Обзор литературы", "Экспериментальная часть", "Результаты и 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 дается очень

подробный обзор работ направленных на модификацию систем редактирования генома. Надо сказать, что это очень сложная для анализа область науки, потому что в CRISPR/Cas системах очень большой потенциал для изменения и белковой, и рнквой частей системы. Поэтому работ очень много, но благодаря четкому структурированию "Обзора литературы" весь этот вал работ складывается в единую картину. 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. Также стоит отметить избыточность - в обзоре нет лишних деталей и освещения соседних областей, не связанных непосредственно с полученными результатами.

Глава "Экспериментальная часть" написана с детализацией, достаточной для понимания технических тонкостей проведенных работ и воспроизведения основных экспериментов.

Глава "Результаты и обсуждение" содержит описание экспериментов и основных полученных результатов. В диссертационной работе можно выделить два больших блока экспериментов. Первый посвящен исследованию влияния введения природных модификаций m6A, m5C, Ψ и m1Ψ в направляющие РНК. Второй - использованию фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов. Дарья Вадимовна аккуратно оценивает влияние этих модификаций на эффективность разрезания целевой ДНК, а также исследует изменения кинетики этого процесса. В элегантном подходе с использованием набора олигонуклеотидов с мисс матчами оценивает специфичность разрезания CRISPR/Cas9. Кроме тестов *in vitro*, были проведены эксперименты на культуре клеток человека HEK293, показавшие принципиальную возможность использования рассмотренных модификаций для редактирования генома клеток.

Мне хочется отдельно выделить очень интересный, но побочный результат который не отражен в выводах. Автор показывает, что кинетика расщепления нецелевой и целевой цепей ДНК-дуплексов отличается при введении модифицированных оснований в tracrRNA. По видимому это отражает молекулярные особенности механизма работы Cas9, что, в свою очередь, дает возможность изучать работу обоих нуклеазных доменов Cas9 по отдельности.

Хочу подчеркнуть, что все эксперименты имеют хорошо продуманный дизайн и все необходимые контроли, что позволяет качественно интерпретировать полученные результаты.

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

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

1. В Обзоре литературы автор пишет, что “Диким типом белка Cas9 является белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9).” Мне кажется, здесь неправильно используется генетический термин “дикий тип”, удачнее было бы писать, что SpCas9 наиболее распространен в лабораториях.
2. В экспериментах с введением природных модификаций в tracrRNA на эффективность расщепления флуоресцентно-меченных ДНК-дуплексов, из-за статистического введения оснований нельзя понять есть ли критические и некритические позиции для модификации. Можно ли побороться с негативным эффектом от введения m6A и m1Ψ, не модифицируя критические позиции в последовательности.
3. Рисунок 35. А подписи ФГ и РНК перепутаны местами.
4. В главе “3.1.4. Оценка влияния модифицированных нуклеотидных остатков в sgRNA на активность системы CRISPR/Cas9 в клетках” на рисунке 29 Б представлены результаты оценки доли отредактированных аллелей в клетках. Автор называет эту метрику “% отредактированных клеток”, что неверно, так как использованная методика не позволяет оценивать аллели одной клетки, а оценивает именно долю молекул геномной ДНК, с инделами и без инделов, во всей популяции клеток из которой выделялась геномная ДНК. Кроме того мне неясно почему в этом эксперименте получилась такая маленькая дисперсия между результатами “трех независимых экспериментов”. Что являлось независимым экспериментом в данном случае?



5. В работе два раза используется тестирование эффективности геномного редактирования на клетках. При этом эти эксперименты значительно отличаются по эффективности немодифицированной направляющей РНК. В первом случае (рисунок 29 Б) эффективность около 75%, во втором - около 25% (рисунок 41 В). С чем связана такая разница?
6. В диссертации несколько раз подчеркивается, что введение модифицированных нуклеотидов позволяет модулировать иммунный ответ клетки на экзогенную РНК. Как влияет глубина модификации молекул РНК на иммунный ответ клетки? Каким тестом этот ответ можно было бы оценить?
7. Стоит подчеркнуть, что полученные в диссертации результаты сложно количественно соотнести с результатами других групп исследовавших иные модификации направляющих РНК. Это не проблема качества представленной диссертационной работы, она выполнена великолепно, но проблема всей этой области науки. Каждая научная группа использует свои наборы методов для оценки эффективности и специфичности разрезания системой CRISPR/Cas9. В итоге делается вывод, что эффективности и/или специфичность меняется относительно немодифицированной системы. Однако эти оценки, могут зависеть от последовательности спейсера и многих других параметров эксперимента. Мне кажется что в этой области назрела и перезрела необходимость создания стандартизированных тестов, позволяющих проводить бенчмаркинг различных модификаций системы CRISPR/Cas9.

Вместе с тем, отмеченные замечания не снижают моей высокой оценки работы Д.В. Прохоровой, а замечания носят рекомендательный характер. Работа выполнена на очень высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные, хорошо оформлена и легко читается. Полученные автором результаты, наряду с богатым справочным материалом, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся вопросами молекулярных механизмов геномного редактирования, а также при подготовке учебных курсов по молекулярной биологии и генетике. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Закключение. Диссертационная работа на тему «Влияние модифицированных нуклеотидов в составе направляющих РНК на активность 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 Прохорова Дарья Вадимовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

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



04.02.2025

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.



04.02.2025