

Отзыв официального оппонента

д.х.н. Готтих Марины Борисовны на диссертационную работу
Прохоровой Дарьи Вадимовны на тему:
«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»

Детальное изучение геномов живых организмов существенно расширило наше представление о функциональных взаимосвязях отдельных элементов геномов и их роли в формировании фенотипических признаков и патогенезе отдельных заболеваний. Однако для успешного применения полученных знаний в биотехнологии и медицине необходимо иметь методы, позволяющие манипулировать с геномами и управлять экспрессией генов и работой регуляторных элементов. Наиболее широко применяемый в настоящее время метод основан на использовании системы CRISPR/Cas (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats), узнавание и расщепление ДНК которой осуществляется за счёт комплементарного взаимодействия между целевой ДНК и некодирующей РНК, связанной с белком Cas, обладающим нуклеазной активностью. Эта система отличается относительной простотой конструирования и высокой эффективностью работы, что позволяет использовать ее для различных манипуляций с геномами, решая такие сложные задачи, как получение мутантных и трансгенных растений и животных, создание и исследование моделей заболеваний на основе культивируемых плюрипотентных клеток человека, проведения полногеномного скрининга и визуализации хромосом. Тем не менее, у этой системы существуют и некоторые недостатки, препятствующие ее более широкому внедрению в практику, одним из которых является возможность возникновения нецелевых эффектов при редактировании генома.

Таким образом, работа Прохоровой Д.В., посвященная анализу влияния модификаций в структуре направляющих РНК на активность и специфичность действия системы CRISPR/Cas9, является чрезвычайно актуальной.

Диссертационная работа Прохоровой Д.В. изложена на 138 страницах, включает 41 рисунок, 7 таблиц и 6 приложений. Работа построена по стандартному принципу и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложения. Содержание диссертации полностью соответствует специальности 1.5.4 - Биохимия.

Во введении четко обоснована актуальность исследования, его научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы её цели и задачи.

Обзор данных литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации, носит аналитический и целенаправленный характер и помогает читателю лучше

понять выбор направления исследований и значимость проделанной автором работы. Обзор литературы включает две части; в первой из них рассматриваются системы геномного редактирования CRISPR/Cas в целом, во второй варианты модификаций систем CRISPR/Cas второго класса. Обзор написан хорошим литературным языком, читается легко и с интересом, особенно вторая его часть, а вот в первой части хотелось бы видеть более четкое и детальное описание функционирования каждой из систем CRISPR/Cas. Обзор может быть интересен широкому кругу специалистов в области биохимии и молекулярной биологии, а также химии олигонуклеотидов и биоинженерии.

В разделе «Экспериментальная часть» с необходимыми подробностями описаны все используемые в работе Прохоровой Д.В. материалы и оборудование, а также методики синтеза направляющих РНК, оценки эффективности и специфичности работы системы CRISPR/Cas9 с исследуемыми модификациями.

Раздел «Обсуждение результатов» содержит два больших раздела. В первом разделе рассматривается влияние на работу системы CRISPR/Cas9 присутствующих в направляющей РНК модифицированных нуклеозидов, которые обнаруживаются в природных типах РНК: m6A, m5C, Ψ и m1Ψ. Кстати диссертант неправильно называет их нуклеотидами. Прежде всего Прохорова Д.В. оценивает влияние модификаций в tracrRNA на эффективность расщепления плазмидной ДНК *in vitro* и показывает, что наличие модифицированных оснований в состав tracrRNA в сочетании с crRNA и белком Cas9 не препятствует формированию каталитически активных комплексов и гидролизу ДНК-субстрата, хотя в случае m6A и особенно m1Ψ эффективность гидролиза заметно снижается. Несколько другие закономерности были получены Прохоровой Д.В. при анализе влияния присутствия модифицированных оснований в составе sgRNA. В этом случае оказалось, что расщепление плазмидной ДНК незначительно уменьшается при увеличении содержания остатков m6A или m1Ψ в sgRNA, и практически не изменяется при увеличении содержания m5C. Вместе с тем, 100% замена остатков уридина на псевдоуридин в составе sgRNA значительно снижает эффективность расщепления ДНК. Интересные результаты были получены в работе Прохоровой Д.В. в ходе изучения *in vitro* специфичности расщепления ДНК-субстратов, содержащих мисматчи в области протоспейсера, системой CRISPR/Cas9, в которой направляющие РНК содержали модифицированные нуклеозидные остатки. Оказалось, введение модифицированных нуклеотидных остатков в tracrRNA не оказывает существенного эффекта на специфичность расщепления ДНК. В то же время, наличие модификаций в составе sgRNA позволяет повысить точность расщепления ДНК-субстратов практически для всех положений мисматчей. При этом, включение m1Ψ в sgRNA позволяет достичь наибольшей специфичности и значительно снизить нецелевые эффекты.

Результаты, полученные Прохоровой на культуре клеток несколько менее оптимистичны, поскольку оказалось, что включение в состав направляющей РНК модифицированных нуклеозидных остатков изменяет эффективность геномного редактирования. Если для немодифицированной sgРНК процент отредактированных клеток составлял примерно 70%, то при введении m6A вместо аденозина эффективность редактирования снижалась до 40%, а при включении Ψ вместо уридина - до 30%. Самое сильное влияние оказала замена U на m1Ψ, она примерно в три раза снижала эффективность редактирования. Оказалось, что только модификация m5C в составе sgРНК позволяет достичь эффективности редактирования сравнимой с немодифицированным вариантом sgРНК. Тем не менее, на основании всех полученных результатов Прохорова Д.В. делает абсолютно логичный вывод, что исследованные ею модифицированные гетероциклические основания могут быть включены в состав tracrРНК или sgРНК без значительного снижения эффективности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* и в клетках.

Вторая часть работы Прохоровой Д.В. посвящена изучению влияния дезоксирибонуклеотидов с фосфорилгуанидиновыми (ФГ) группами в составе направляющих РНК на эффективность и специфичность работы системы CRISPR/Cas9. Это очень интересное исследование, расширяющее возможность использования этой перспективной модификации межнуклеотидного фосфата. Так известно, что олигонуклеотиды, содержащие ФГ модификации, имеют низкую токсичность для эукариотических клеток, способны образовывать устойчивые дуплексы с РНК и ДНК и гораздо устойчивее к действию нуклеаз, чем немодифицированные олигонуклеотиды. Прохоровой Д.В. удалось показать, что в случае CRISPR/Cas9 с модифицированной crРНК, эффективность расщепления ДНК зависит от положения ФГ модификации и количества модификаций в crРНК. Наиболее сильное негативное влияние на эффективность работы системы оказывает ФГ модификация в четвертом положении с 5'-конца crРНК. Наибольший вклад ФГ-модификации в повышение специфичности наблюдается для химерных crРНК, содержащих несколько ФГ-групп, но не в 4-ом положении. При этом важно, что проведенное диссертантом включение PS или 2'-F групп в направляющие РНК не приводило к увеличению специфичности системы CRISPR/Cas9 *in vitro* по сравнению с ФГ-модификациями, хотя сравнение ФГ-модифицированных crРНК и crРНК, содержащих PS модификации, не выявило достоверных различий в эффективности редактирования гена-мишени в культуре клеток.

Из полученных Прохоровой Д.В. результатов видно, что как новизна, так и практическая значимость данной работы в первую очередь определяется тем, что были предложены новые варианты модификации направляющих РНК в системе CRISPR/Cas9, которые позволяют повысить специфичность расщепления ДНК-мишени без существенного снижения эффективности расщепления. Это позволяет сделать вывод о том, что модифицированные

азотистые основания и ФГ-модификации в направляющих РНК являются перспективными модификациями, которые могут позволить усовершенствовать функционирование системы CRISPR/Cas9.

Необходимо подчеркнуть, что все полученные в работе результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Подводя итог, следует отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками. Принципиальных замечаний к содержанию диссертации нет, хотя можно отметить некоторые стилистические и грамматические ошибки и опечатки. Присутствуют в работе и явно неудачные выражения, например, «белок Cas13d ... может быть доставлен с помощью вектора аденоассоциированного вируса», «sgРНК с различной глубиной модифицированных нуклеотидных остатков», «исследование кинетики модифицированных РНК», присутствующее в названии нескольких разделов или достаточно сложное для понимания предложение «Доступность РАР, однако, остается существенной проблемой даже при условии использования ортологов белков Cas, поскольку только незначительная часть существующих РАР доступна всем природным белкам Cas, функционирующим в клетках млекопитающих».

Тем не менее, к работе есть некоторые вопросы и замечания. Так, на рис. 21 и 23 в диссертации (рис. 3 и 4 в автореферате, соответственно) в части А показаны структуры направляющих РНК с выделенными разными цветами положениями модифицированных звеньев, а в части Б показана зависимость эффективности расщепления плазмидной ДНК от степени модификации. Видно, что эффективность расщепления меняется, например, на стр. 6 автореферата указано, что «расщепление плазмиды незначительно уменьшается при увеличении глубины модификации m6A или m1Ψ в sgРНК с 10% до 100%». К сожалению, ни из рисунков, ни из сопроводительного текста непонятно, в какие именно положения были введены модификации в тех случаях, когда их содержание отличалось от 100%. В результате непонятно, влияет ли конкретное положение модификации на эффективность расщепления. Хотелось бы в заключении к работе видеть некоторые рекомендации для пользователей системы CRISPR/Cas9, основанные и на результатах данной работы, и на литературных данных, например, какие именно модификации надо вводить в то или иное положение направляющей РНК для того, чтобы достичь большей специфичности геномного редактирования без потери эффективности, а какие позволяют повлиять только на специфичность или только на эффективность. И последнее, скорее даже не замечание, а сожаление по поводу того, что Прохорова Д.В., проверив влияние модификаций на активность

системы CRISPR/Cas9 в культивируемых клетках человека, не проверила их влияние на специфичность работы этой системы. Возможно, это будет следующим шагом в ее научной деятельности.

Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы. Диссертация Прохоровой Д.В. является научно-квалификационной работой, направленной на решение важнейшей задачи оптимизации системы геномного редактирования. Работа представляет собой целостное и завершенное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены четко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Прохоровой Дарьей Вадимовной, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утверждёнными постановлением Правительства РФ от 01 октября 2018 г. №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия».

Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор,
зав. отделом химии нуклеиновых кислот
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова

 /М.Б. Готтих/

специальность 02.00.10 – Биоорганическая химия
почтовый адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1
телефон: +7 (495) 939 5407
адрес электронной почты: gottikh@belozersky.msu.ru

Данные Готтих М.Б. подтверждаю
И.о. директора НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова
член-корреспондент РАН

30.01.2025

