

ОТЗЫВ

официального оппонента 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»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.

Тема работы автора диссертации связана с одним из наиболее активно развивающихся в настоящее время направлений исследований в области биохимии – разработкой подходов усовершенствования технологий редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas. Известно, что системы CRISPR/Cas 2 класса, особенно CRISPR/Cas9, являются наиболее доступными и адаптируемыми инструментами для редактирования и регулирования геномов различных организмов, и что особенно актуально - человека. При этом проблемы, связанные с наличием побочных эффектов, включая плохую специфичность, слабую эффективность, проблему с доставкой компонентов геномного редактирования в клетки и др., требуют дальнейших исследований для улучшения и оптимизации этой технологии. Для снижения нецелевых эффектов, разрабатываются различные стратегии, включая использование модифицированных направляющих РНК и новых методов доставки.

Свойства и структура направляющих РНК влияют на активность системы CRISPR/Cas9, поэтому важно модифицировать направляющие РНК таким образом, чтобы они соответствовали требованиям для дальнейшего терапевтического применения. Введение модификаций в эти РНК способно улучшать эффективность и специфичность работы системы CRISPR/Cas9, однако часто они положительно влияют только на один из параметров либо на специфичность, либо на эффективность геномного редактирования. Все это

указывает на чрезвычайную актуальность задачи по разработке модифицированных направляющих РНК, которые обеспечат снижение и\или устранение нецелевых эффектов с одновременным сохранением высокого уровня эффективности редактирования ДНК-мишеней.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Основные результаты работы Прохоровой Д.С. являются новыми и оригинальными. В частности, показано, что комплексы белка Cas9 с направляющими РНК, содержащими природные модифицированные нуклеотиды, поддерживают геномное редактирование как *in vitro*, так и в культивируемых клетках человека, и установлено увеличение специфичности системы CRISPR/Cas9 при включении природных модификаций в направляющие РНК. Впервые исследованы ДНК/РНК химерные sgРНК с фосфорилгуанидиновыми модификациями, способные формировать каталитически активные комплексы с белком Cas9. Показано, что такие модификации позволяют контролировать активность и специфичность системы CRISPR/Cas9 в культивируемых клетках человека, и продемонстрирована принципиальная возможность применения фосфорилгуанидил-модифицированных химерных sgРНК для редактирования генов в клетках человека. Полученные знания являются перспективными для их использования в получении биомедицинских клеточных продуктов, а также трансгенных животных с отредактированными геномами.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Теоретическая значимость диссертации заключается в том, что в ней показана перспективность подходов, основанных на модификации РНК, применяемых в системах CRISPR/Cas, для увеличения специфичности и эффективности редактирования геномов. При этом с практической точки зрения на основании полученных автором результатов можно получить конкретные рекомендации по модификации направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 для увеличения её активности и осуществлять дизайн экспериментов с большей производительностью редактирования геномов при

сниженной иммуногенности и цитотоксичности направляющих РНК. Поэтому данная работа, несомненно, имеет большую значимость не только в научных, но и медицинских приложениях.

ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Работа написана по традиционной схеме: содержит разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Экспериментальная часть”, “Результаты и их обсуждение”, “Заключение” и “Выводы” и изложена на 138 страницах. Диссертация проиллюстрирована 41 рисунком, включает 7 таблиц и 6 приложений; список цитируемой литературы насчитывает 149 библиографических источников.

В разделе “Введение” в краткой форме кратко изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и практическая значимость работы. Здесь же приводятся положения, выносимые на защиту, даётся информация об апробации работы, а также о личном вкладе автора.

Глава, содержащая обзор литературы, посвящена рассмотрению различных аспектов модификации систем геномного редактирования CRASPR/Cas второго класса. Данная глава разделена на две большие части. В первой части автор даёт описание известных на сегодняшний день вариантов систем геномного редактирования CRISPR/Cas, их устройства и механизмов работы, где особое внимание уделяет системе CRASPR/Cas II-го класса и её отличительным чертам. Вторая часть главы посвящена обзору разработанных в мире современных подходов для улучшения работы данной системы, основанных на внесении различных модификаций в её компоненты. В целом, обзор литературы написан стройно и системно, хорошо иллюстрирован, чувствуется, что автор владеет материалом и хорошо разбирается в мировых тенденциях по теме своей диссертационной работы.

Глава “Экспериментальная часть” даёт подробное описание использованных автором в работе реагентов и оборудования, и содержит

подробное описание методов, использованных автором в своей работе, в том числе – таких современных, как, например, цифровая ПЦР. Здесь же дано описание статистических расчётов результатов эксперимента. Из такого детального описания экспериментальных процедур можно заключить, что автор мастерски владеет техникой эксперимента, а полученные диссертантом данные достоверны и могут быть воспроизведены.

Глава “Результаты и обсуждение” содержит описание научных достижений автора по теме диссертационной работы и их сопоставление с данными других исследователей. Данная глава разделена на две части, в первой из которых содержится описание результатов, полученных при включении модифицированных нуклеотидных остатков в направляющие РНК, в системе CRISPR/Cas9, а вторая часть посвящена изучению влияния фосфорилгуанидиновых модификаций в различных положениях химерных направляющих sgРНК в этой системе. В первой части работы автор подробно исследует влияние введения четырёх типов модифицированных азотистых оснований, встречающихся в природе, а именно: m6A, m5C, Ψ и m1Ψ, в направляющие РНК для системы CRISPR/Cas 9. Введение этих модификаций с помощью T7-транскрипции позволяет регулировать глубину модификации РНК и более подробно оценивать наблюдаемые эффекты. Автор проводит подробную оценку эффектов модификаций в гайдовых РНК на общую активность системы CRASPR/Cas9, кинетику расщепления ДНК-дуплексов и специфичность этой системы *in vitro*. Отдельно стоит отметить попытки применить модифицированные гайдовые РНК для геномного редактирования клеток человека в культуре. И хотя исследуемые модификации, за исключением m5C, снижали эффективность редактирования, эти первые шаги показали, что такой подход имеет перспективы применения для увеличения специфичности системы.

Вторая часть главы посвящена исследованию влияния фосфорилгуанидиновых модификаций в химерных направляющих для системы CRISPR/Cas9. В ИХБФМ СО РАН, где были разработаны такие аналоги нуклеиновых кислот, было показано, что модифицированные этим

способом по сахарофосфатному основу РНК и ДНК обладают рядом полезных свойств. Автор подробно описывает дизайн sgРНК с фосфорилгуанидиновыми модификациями по различным положениям, изучение влияния этих групп в различных положениях РНК на активность системы CRISPR/Cas9, её специфичность и скорость работы *in vitro*. Кроме того, в опытах на культуре клеток человека автор показывает, что фосфорилгуанидин-модифицированные sgРНК можно использовать для редактирования клеток в культуре, и что такие модификации более перспективны в плане повышения специфичности реакции, чем тиофосфатные модификации.

В разделе “Заключение” автор подводит итог своим исследованиям и даёт их оценку с точки зрения современной проблематики подобных исследований и их дальнейших перспектив, что позволяет получить в кратком виде целостную оценку достижений работы.

На основании полученных результатов автором сформулированы 4 вывода, которые выглядят вполне обоснованными и соответствуют всем достижениям данной диссертационной работы. Основные результаты работы автора опубликованы в виде 3 статей в международных рецензируемых научных журналах, имеющих высокий рейтинг и индексируемых в базах данных научных публикаций. Во всех этих работах диссертант является первым автором, что отражает её основной вклад в выполнение опубликованных работ. Всё это указывает на высокое качество полученных результатов, их значимость для развития данной области науки и востребованность научным сообществом.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и даёт представление об основных разделах работы и полученных результатах.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ.

Хотя диссертационная работа Прохоровой Дарьи Вадимовны выполнена на высоком научном уровне, и в ней получены действительно весомые и

значимые научные результаты, следует отметить ряд замечаний по тексту диссертации.

Так, из данных по оценке кинетических параметров расщепления ДНК в реакции с различными модификациями в *tracrRNA*, представленных на рисунке 20А, видно, что кривые для 100% уровня модификаций основаниями m5C (зелёная кривая) и Ψ (фиолетовая кривая) практически совпадают с таковой для немодифицированной РНК (NM, синяя кривая), из чего можно допустить, что данные модификации слабо влияют на эффективность расщепления ДНК. Однако, на гистограмме на рисунке 20В для разницы в расщеплении ДНК между Ψ-содержащей и немодифицированной РНК указана высокая достоверность, хотя аналогичные различия между m5C-содержащей и немодифицированной РНК отмечены всё так же как незначимые. С другой стороны, из рисунка 20А видно, что m1Ψ-модификации сильно снижают эффективность реакции, однако на рисунке 20В эти эффекты почему-то отмечены наоборот, как незначимые. По-хорошему, этот момент было бы необходимо пояснить в тексте более конкретно.

Из других замечаний можно отметить неудачное в ряде случаев форматирование рисунков в тексте, когда остаются объёмные пустые пространства на страницах и слишком мелкий шрифт на рисунках в приложениях. Кроме того, встречаются непонятные фразы типа “водородные связи Хугстина” (стр.34) или “ген *ANXA6* является членом семейства аннексиновых белков” (стр. 62), обусловленные, по-видимому, ошибочной терминологией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа Прохоровой Д.В. соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в

соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института 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».

Официальный оппонент:

зав. Лабораторией структуры и функции рибосом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

доктор химических наук, доцент



Малыгин Алексей Аркадьевич

дата: 27 января 2025 г.

Контактные данные:

тел.: +7(913)7104041, e-mail: malygin@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.04 – биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8,
ИХБФМ СО РАН, Лаборатория структуры и функции рибосом
Тел.: +8(383)363-51-39; e-mail: malygin@niboch.nsc.ru

Подпись сотрудника ИХБФМ СО РАН Малыгина А.А. заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.б.н.



Логашенко Е.Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: +8(383) 363-51-50; Факс: +8(383) 363-51-53