ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.035.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ ГЕНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ

УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело №\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 28 февраля 2023 года № 2

О присуждении Кропочевой Екатерине Вадимовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование новых программируемых нуклеаз из семейства бактериальных белков-Аргонавтов» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология принята к защите 29 ноября 2022 года (протокол заседания № 2) диссертационным советом 24.1.035.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук, 119334, г. Москва, улица Вавилова, дом 34/5; приказ № 1044/нк от 14 сентября 2022 года.

Соискатель Кропочева Екатерина Вадимовна, 14 декабря 1993 года рождения. В 2017 году с отличием окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по специальности «Биология». В 2021 году закончила очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» по специальности «молекулярная биология». Работает инженером 1 категории в лаборатории биологии РНК и эпигенетики Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Диссертация выполнена в лаборатории биологии РНК и эпигенетики Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель – чл.-корр. РАН, доктор биологических наук Кульбачинский Андрей Владимирович, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов.

Официальные оппоненты:

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», заместитель генерального директора по научной работе, заведующий лабораторией генной инженерии;

Тальянский Михаил Эммануилович, доктор биологических наук, профессор, Государственный научный центр Федеральное государственное бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории функциональной геномики и протеомики растений – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва в своем положительном отзыве, подписанным Григоренко Анастасией Петровной, кандидатом биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории общей геномики, указала, что диссертационная работа Кропочевой Е.В. посвящена описанию бактериальных аргонавтов из ранее не исследованных групп. Изучение новых белков с нуклеазной активностью важно для понимания их функций в прокариотических клетках и может быть в дальнейшем использовано для детекции целевых последовательностей в биологических образцах, а также для создания новых методов в генной инженерии.

В предоставленной работе впервые охарактеризованы шесть аргонавтов из различных бактерий. Все белки являются нуклеазами, способными расщеплять нуклеиновые кислоты в определенном месте, заданном с помощью короткого олигонуклеотида. При этом среди описанных аргонавтов обнаружены белки, расщепляющие как ДНК, так и РНК. Наиболее полно описан белок из *K. massiliensis*, обладающий универсальной специфичностью к ДНК и РНК. Значительная часть работы посвящена характеристике нуклеазной активности аргонавта KmaAgo в различных условиях: при разной температуре реакции, в зависимости от природы двухвалентного катиона в буферном растворе, структуры направляющей ДНК и положения некомплементарных мишени нуклеотидов, а также от структуры мишени. Способность этой нуклеазы расщеплять как ДНК, так и РНК позволило рассмотреть ее активность по отношению к одно- и двунитевым мишеням. Особый интерес представляют различия в эффективности расщепления РНК в зависимости от ее структуры, что может потенциально использоваться для изучения конформации сложных молекул РНК. Заключительная часть экспериментальной работы посвящена экспериментам в клетках *E. coli.* Рассматривается влияние гетерологической экспрессии аргонавта на рост клеточной культуры и поддержание плазмид при отсутствие селективного давления антибиотиков. Также автор приводит анализ коротких ДНК, совыделяющихся с аргонавтом из клеток кишечной палочки.

В отзыве отмечено, работа Е.В. Кропочевой выполнена на высоком научном уровне. Полученные результаты могут быть интересны исследователям во многих научных учреждениях нашей страны, а также в биотехнологических компаниях.

Диссертационная работа Кропочевой Екатерины Вадимовны «Исследование новых программируемых нуклеаз из семейства бактериальных белков-Аргонавтов», представленная к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, является самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой.

Диссертация полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук и установленным «Положением о присуждении учёных степеней», утверждённым Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе 3 по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

По теме диссертации были опубликованы следующие работы в порядке выхода:

1. Kropocheva, E., Kuzmenko, A., Aravin, A. A., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis* // Nucleic acids research. - 2021. - V. 49. - №7. – С. 4054–4065.

Соискателем выполнена большая часть экспериментов. В статье указаны основные результаты приведенные в разделе диссертации «Результаты и обсуждение» про исследование белка-Аргонавта KmaAgo из *Kurthia massiliensis*. В статье впервые показано, что белок KmaAgo обладает широкой специфичностью к природе гидов и мишеней. Проведены основные эксперименты для характеристики нуклеазной активности: анализ специфичности, предпочтения к первичной структуре гида, каталитическому иону, различным типам мишеней.

1. Lisitskaya L., Shin Y., Agapov A., Olina A., Kropocheva E., Ryazansky S., Aravin A.A., Esyunina D., Murakami K.S. and Kulbachinskiy A. Programmable RNA targeting by bacterial Argonaute nucleases with unconventional guide binding and cleavage specificity // Nat. Commun. – 2022. – 13*. –* 1-15.

В работу вошли экспериментальные данные, выполненные соискателем. Соискатель участвовала в подготовке публикации. Был проведен анализ специфичности Аргонавта RslAgo из *R*unella *sl*ithyformis к ДНК и РНК-гидам и мишеням. В статье впервые показано, что белок является ДНК-зависимой РНК-нуклеазой. Определены кинетические параметры реакции расщепления.

1. Кропочева Е.В., Лисицкая Л.А., Агапов А.А., Мусабиров А.А., Кульбачинский А.В., Есюнина Д.М. Прокариотические белки-Аргонавты как инструмент биотехнологии // Молекулярная биология – 2022. – 56, № 6. –915-936.

Автор принимала основное участие в написании обзорной статьи. Соискатель сделала обзор литературных данных об использовании программируемых нуклеаз различного происхождения в генетической инженерии и произвела обобщение данных по применению белков-Аргонавтов прокариот как инструмента биотехнологии.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы из:

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» от профессора кафедры молекулярной биологии биологического факультета, доктора биологических наук Каменского Петра Андреевича.

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии от старшего научного сотрудника лаборатории маркерной и геномной селекции растений, кандидата биологических наук Князева Андрея Николаевича.

Все отзывы на автореферат положительные, в них отмечается, что материалы, изложенные в автореферате, свидетельствуют о том, что диссертационная работа Кропочевой Екатерины Вадимовны соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается схожестью тематики их научных исследований с тематикой представляемой работы, а также их авторитетом и высоким уровнем проводимых исследований.

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, специалист в области генной инженерии и молекулярной биологии. Занимается разработкой методов генетической терапии бактериальных инфекций с использованием генов антимикробных пептидов, разработкой методов выделения и очистки рекомбинантных белков. Автор большого числа публикаций в области применения программируемых нуклеаз системы CRISPR-Cas.

Тальянский Михаил Эммануилович, доктор биологических наук, специалист в области некодирующих РНК и РНК-интерференции у растений. Занимается исследованием влияния абиотических и биотических факторов на протеом и пептидом растений.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, является ведущей организацией в области исследования общей, молекулярной и эволюционной генетики и геномики, популяционной генетики, генетических основ биотехнологии и репрограммирования генома, в организации разрабатываются следующие направления: генетика и геномика человека, животных, растений и микроорганизмов, генетическая структура популяций человека, демографическая генетика, генетические принципы селекции животных, растений и микроорганизмов, генетическая паспортизация и ДНК идентификация, генетическая безопасность, генетические и эпигенетические механизмы репрограммирования клеток млекопитающих, включая человека, генетические основы биотехнологии, биоинформатика, сравнительная геномика, системная биология.

Диссертационный совет 24.1.035.01 при ИБГ РАН, рассмотрев диссертацию Кропочевой Екатерины Вадимовны «Исследование новых программируемых нуклеаз из семейства бактериальных белков-Аргонавтов» пришел к заключению, что диссертация содержит научно-обоснованное решение актуальной задачи исследования функциональной активности новых белков-Аргонавтов из мезофильных бактерий и поиска белков, способные к расщеплению как ДНК-, так и РНК-мишеней.

Работа обладает научной новизной, имеет значимость для теории и практики, представляет собой законченное научное исследование.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**Разработан** и реализован научно-обоснованный подход для анализа нуклеазной активности шести новых белков-Аргонавтов, описанных в работе.

**Предложена** система для использования белка-Аргонавта из бактерии *Kurthia massiliensis* (KmaAgo) для направленного расщепления плазмидной ДНК и структурированной РНК с помощью ДНК-гидов *in vitro.*

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**Доказано**, что четыре Аргонавта являются ДНК-зависимыми ДНК-нуклеазами, один – ДНК-зависимой РНК-нуклеазой, а KmaAgo способен использовать как ДНК, так и РНК-гиды для разрезания ДНК- и РНК-мишеней.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих современных методов молекулярной биологии и генетики. Многие из них были успешно оптимизированы под конкретные исследования.

**Изучены** короткие ДНК, ассоциированные с KmaAgo при экспрессии в *Е. coli,* влияние экспрессии на поддержание плазмид.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**Определены** перспективы практического использования полученных данных для разработки новых инструментов для манипуляции с нуклеиновыми кислотами на основе исследованного белка KmaAgo.

**Разработан** способ направленного расщепления двуцепочечной ДНК с помощью аргонавта KmaAgo, загруженного короткими ДНК-гидами, направленными к противоположным цепям. Определено оптимальное для наибольшей активности расщепления мишени взаиморасположение комплексов нуклеаза-гид.

**Представлен** способ предсказания структуры высокоструктурированных молекул РНК на основе различий в эффективности расщепления с помощью KmaAgo.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

Диссертационная работа выполнена на сертифицированном оборудовании с использованием разнообразных современных методов молекулярной биологии. Результаты исследований показали высокую степень воспроизводимости. Теория согласуется с опубликованными данными о функциональных свойствах ранее исследованных прокариотических белков-Аргонавтов.

Диссертационная работа Е.В. Кропочевой является законченной научно-квалификационной работой, а достоверность полученных в ходе нее результатов и сделанных на их основании выводов не вызывает сомнений.

**Личный вклад соискателя:**

Все ключевые эксперименты: создание генно-инженерных конструкций для экспрессии белков KmaAgo, RslAgo, EmaAgo в клетках кишечной палочки, подбор условий и хроматографическая очистка белков, изучение нуклеазной активности белков-Аргонавтов, подбор оптимальных условий для расщепления одноцепочечных ДНК и РНК, плазмидной ДНК и структурированной РНК Аргонавтом KmaAgo, анализ влияния экспрессии KmaAgo на рост клеток кишечной палочки и поддержание плазмид, выделение коротких нуклеиновых кислот, ассоциированных с KmaAgo в клетках кишечной палочки и подготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования. Некоторые плазмиды и препараты белков (MaeAgo, CepAgo, CmiAgo), упоминаемые в работе, предоставлены Кузьменко А.В. Биоинформатический анализ данных высокопроизводительного секвенирования библиотек коротких ДНК был выполнен совместно с сотрудниками Лаборатории биологии РНК и эпигенетики НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ Кузьменко А.В. и Рязанским С.С. Соискатель лично участвовал в апробации результатов на конференциях и в подготовке научных публикаций по теме диссертации.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие замечания:

*Ведущая организация ИОГен РАН отметила, что:*

1. на рис. 9 для белка KmaAgo плохо различимы РНК-мишени и продукты их расщепления (дорожки 8 и 9), в то же время, автор на основе этих данных выбирает направление дальнейшей работы;

2. на с. 84. для белка RslAgo из *Runella slithyformis* не указан его идентификационный номер из базы данных белков;

3. не все использованные сокращения вынесены в список сокращений, например RISC, SSB, сокращения видов малых РНК и др.;

4. в разделе Материалы и методы не всегда указана концентрация использованных растворов, к примеру на с. 60 сказано «добавляли персульфат аммония (10 мкл на 1 мл раствора)», но не указана концентрация стокового раствора;

5. по тексту работы встречаются два варианта обозначения основного объекта исследования – аргонавта из бактерии *K. massiliensis* – KmaAgo и KmAgo;

6. подписи на многих рисунках значительно мельче, чем основной текст работы

*Соискатель Кропочева Е.В. согласилась с замечаниями ведущей организации 2-6*, *а также дала следующие пояснения по поводу замечания 1:*

1. Согласна с замечанием. На дополнительном слайде продемонстрирую электрофореграмму с использованием более точного способа детекции нуклеиновых кислот – радиоактивного мечения изотопом фосфора P32. Как видно из слайда расщепление РНК успешно осуществляется исследуемым белком с образованием продукта ожидаемой длины.

*В отзыве официального оппонента, доктора биологических наук Лазарева Василия Николаевича отмечается, что:*

1. На стр. 8 в задачах исследования планировалось получить шесть рекомбинантных белков из разных мезофильных бактерий. Однако на стр.86 сказано, что «Препараты Аргонавтов из *Microcystis aeruginosa* (MaeAgo), *Chamaesiphon minutu*s (CmiAgo) и *Crinalium epipsammum* (CepAgo) были получены в нашей лаборатории ранее».
2. Три рекомбинантных белка, для которых описано получение, выделялись разными способами. Все три белка накапливаются, по-видимому, в растворимой форме (об этом прямо не сказано, но вытекает из описаний экспериментов) и имеют His-tag. Вполне очевидным было бы выделять их по общей методике, но причины, по которым белки выделялись по разному, в работе никак не комментируются и не обсуждаются.
3. Для получения трех экспрессионных плазмид, кодирующих сходные белки, использовались два разных реципиентных вектора – pET-28b и pBAD. Какая конкретно плазмида из обширного семейства pBAD использовалась, не упоминается. Причины, по которым для получения двух рекомбинантных белков использовалась pET-28b, а для третьего – pBAD, не комментируются. При этом отсутствуют генетические карты плазмид, кроме одной.
4. Для выделения KmaAgo использовали батч-процесс с сорбентом Co 2+ TALON Metal Affinity Resin, а для RslAgo и EmaAgo применяли колоночную хроматографию на сорбенте Ni sepharose HP. Причины, побудившие применить две разные технические реализации металл-хелатной хроматографии для разных белков, не объяснены. Также для хранения белка KmaAgo использовался раствор, содержащий DTT, а раствор для хранения RslAgo и EmaAgo DTT не содержал. При этом наличие и роль дисульфидных связей в исследуемых белках никак не обсуждается.
5. Для всех белков написано, что “Чистоту полученного препарата белка определяли с помощью электрофоретического разделения в денатурирующем геле с последующей окраской Кумасси”. При этом результаты электрофореза приведены только для двух белков из шести, а сама чистота никак не обсуждается. Из рисунка 7 видно, что с этим может быть все не очень хорошо.
6. Указано, что концентрацию белка определяли на спектрофотометре Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, США). При этом отсутствует информация, как это делали. По оптической плотности при длине волны 280 нм или другой? Какой брался коэффициент экстинкции? Откуда и на каком основании? Как проводился расчет? Причем в работе есть ряд экспериментов, результаты которых напрямую зависят от концентрации исследуемого белка.
7. Исследуемые белки являются программируемыми нуклеазами. В работе используется большое количество мишеней и гидов, однако совершенно отсутствует информация о том, почему для этих нуклеиновых кислот была выбрана именно такая первичная структура. Соответственно, сложно оценить, являются ли полученные результаты универсальными или находятся в определенной зависимости от выбранных последовательностей.
8. В работе проведен анализ нуклеиновых кислот, ассоциированных с KmaAgo после его выделения. При этом говорится, что связывание гидов происходит при накоплении белка в клетке. Большая часть последовательностей является фрагментами геномной ДНК. Каким образом белок может связать в клетке фрагменты геномной ДНК без ее разрушения? Как клетки не погибают при разрушении единственной хромосомы? Очевидно, что загрузка рекомбинантного KmaAgo гидами происходит при выделении белка. При лизисе с помощью пресса, как это описано в работе, происходит эффективная фрагментация как геномной, так и плазмидной ДНК. Эти фрагменты и могут быть связаны рекомбинантным белком. При этом внутри клеток белок вполне может связывать и РНК-фрагменты ввиду отсутствия большого количества фрагментов ДНК. Загрузка KmaAgo обнаруженными короткими фрагментами ДНК происходит, скорее всего, не при его накоплении в клетках *E. coli*, а при выделении белка.

*С замечаниями официального оппонента доктора биологических наук Лазарева В.Н. соискатель согласилась. На заданные оппонентом вопросы соискатель дала следующие пояснения:*

1. Согласна с замечанием, стоило аккуратнее подойти к формулировке целей работы.

2-3. Отличия в методиках выделения белков отражают процесс подбора условий. Для экспрессии трех белков, ранее полученных в нашей лаборатории использовались конструкции на основе широко используемого вектора pBAD HisB (Invitrogen). Схему покажу на дополнительном слайде. Этот вектор имеет индуцибельный araBAD-промотер, который регулируется закодированным в этой же плазмиде белком AraC. В отсутствие L-арабинозы он выступает как ингибитор транскрипции, при добавлении индуктора – активирует синтез РНК с промотера с помощью клеточной полимеразы *E. coli*. На N-конце целевого белка располагается гексагистидиновый таг, эпитоп для детекции белка с помощью антител и сайт расщепления энтерокиназы для удаления N-концевого пептида.

Для получения белка EmaAgo мы использовали подобную систему экспрессии, но заменили эпитоп и сайт расщепления энтерокиназы на сайт расщепления тромбина и WELQut-протеазы, так как эти протеазы имелись у нас в лаборатории.

Так как количество белка KmaAgo, которое удавалось выделить с помощью аналогичной системы было низким, мы решили использовать другой экспрессионный вектор pET28b. Система включает промотор Т7 РНК-полимеразы, который находится под контролем *lac*-оператора. При добавлении лактозы или ее неметаболизируемого аналога ИПТГ запускается транскрипция с помощью РНК-полимеразы фага T7. Для получения белков с помощью этого вектора необходимо использовать штаммы с фрагментом λDE3-профага в геноме, кодирующим фаговую полимеразу. Транскрипция в этой системе идет очень активно и в некоторых случаях это помогает повысить выход целевого белка. Согласна, что процесс выбора вектора стоило описать подробнее.

1. Действительно, все описываемые белки накапливались в растворимой форме. Для первой стадии очистки KmaAgo из лизата клеток применяли кобальтовую смолу, так как это более специфичный метод. Из этого препарата затем выделяли нуклеиновые кислоты для дальнейшего высокопроизводительного секвенирования. С помощью кобальтовой смолы получилось получить гораздо более чистый препарат белка, чем с помощью никелевой хроматографии.

В молекуле KmaAgo находится 8 молекул цистеина, для поддержания их в восстановленной форме добавляли ДТТ в буферный раствор для хранения, так как при выделении наблюдалась склонность белка к выпадению в осадок.

1. Так как в рамках работы были выделены три белка, приведены электрофореграммы только для них. Для белков, выделенных ранее в лаборатории, результаты покажу на дополнительном слайде. Примесные белки или фрагменты деградации целевого белка, заметные на рис. 7Б составляют незначительную долю от целевого белка. К тому же в процессе концентрирования белка с помощью центрифужного концентратора, примеси массой меньше 50 кДа проходят через поры и таким образом элиминируются из препарата целевого белка. В тестах на активность продуктов побочных реакций, которые могли бы возникать за счет нуклеазной активности примесей обнаружено не было.
2. Для определения концентрации белков пробовали применять три метода. Метод Брэдфорда, измерение c помощью кубитного флуориметра и флуоресцентных красителей и спектрофотометрию при длине волны 280 нм. При определении концентрации по Бредфорду возникла проблема отличия содержания аргинина в исследуемых белках и бычьем сывороточном альбумине, использующимся в качестве контроля. При добавлении белка в реагент для кубитного флуориметра происходило образование осадка. Поэтому для определения концентрации остановились на спектрофотометрии. Коэффициент экстинкции рассчитывали по содержанию тирозина, триптофана и цистеина в белке – аминокислот, вносящих вклад в поглощение при длине волны 280 нм.
3. В работе использовали случайную последовательность гидов и комплементарых им мишеней. На рис. 14 для KmaAgo показано, что Аргонавт способен расщеплять однонитевую ДНК в участках с различной первичной последовательностью. На рис. 13 показано, что, в отличие от некоторых других Аргонавтов, KmaAgo не имеет предпочтения к первому нуклеотиду гида. В опытах по расщеплению плазмидной ДНК (рис. 17) и структурированной РНК (рис. 20) которые проводились с гидами, отличающимися по последовательности, заметно, что эффективность реакции расщепления мишени определяется в первую очередь взаиморасположением гидов относительно друг друга в первом случае и структурой РНК во втором.

В статье (Hunt et al., 2021) был проведен скрининг библиотеки гидов для определения предпочтений к последовательности Аргонавта TtAgo и были обнаружены некоторые закономерности – снижение активности расщепления при нахождении А в 12 позиции и G или С в 10 и 11. Подобный анализ может быть интересен и в отношении других Аргонавтов.

1. Вопрос о происхождении коротких ДНК, связанных с аргонавтом очень интересный. С одной стороны, экспрессия KmaAgo имеет токсический эффект на культуру *E. coli*. Это может говорить о нарушениях хромосомной ДНК, приводящей к гибели клеток. Для другого Аргонавта, CbAgo, исследованного в нашей лаборатории, показано, что внесение мутаций в компоненты системы репарации двунитевых разрывов приводит к снижению роста клеток в присутствии Аргонавта. При этом обнаружены различия в составе коротких ДНК, связанных с каталитически активным и неактивным CbAgo, что также говорит о загрузке Аргонавтов в процессе клеточного метаболизма, а не при разрушении клеток (Kuzmenko, 2020).

Более прямое исследование этого вопроса было проведено для

Аргонавта SeAgo. Клетки *Synechococcus elongatus*, экспрессирующие Аргонавт смешали c клетками другой бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, далее клетки разрушили с помощью гомогенизатора высокого давления, выделили Аргонавт SeAgo и проанализовали ассоциированные с ним короткие ДНК. Было обнаружено, что на геном *R. sphaeroides* картируется только 1-2 процента коротких ДНК. Это говорит о том, что они были загружены в Аргонавт в клетках хозяина.

Для Аргонавта KmaAgo, исследованного в данной работе подобные эксперименты только предстоит выполнить.

*В отзыве официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Тальянского Михаила Эммануиловича* *отмечается:*

1. Не ясно какие короткие НК образуются в бактериях и все ли из них связываются с KmaAgo (видимо было бы полезно сравнить профиль коротких НК, образуемых в *Е. coli* в целом с короткими НК, загружаемыми в KmaAgo);
2. Играет ли какую-либо (и какую) роль в формировании коротких НК сам KmaAgo [можно было бы сравнить профили свободных и загружаемых в KmaAgo коротких НК в присутствие функционально активного Аргонавтa и его мутанта, дефицитного по PIWI (лишённого нуклеазной активности)];
3. Изменяются ли профили коротких НК (тотальные фракции коротких НК и загрузка в KmaAgo) при заражении бактерий фагами;
4. Изменяются ли профили коротких НК (тотальные фракции коротких НК и загрузка в KmaAgo) в условиях стресса, например при голодании (изменение pH, голодание и т.п.);
5. Принимая во внимание, что разные Аргонавты, как и в случае эукариот, могут играть роль в различных процессах, было бы интересно сравнить профили загрузки (как и свободных) НК в случае разных Аргонавтов, например KmaAgo versus CbAgo;
6. Наконец, исследование проведено в гетерологичной системе KmaAgo -*E.coli*. Что происходит в гомологичной системе KmaAgo – *Kurthia massiliensis*?

*С замечаниями официального оппонента доктора биологических наук, профессора Тальянского М.Э. соискатель согласилась. На вопросы и пожелания официального оппонента соискатель дала следующие ответы:*

1. Такие эксперименты с KmaAgo не проводили, действительно было бы интересно это выяснить. Но есть некоторое количество данных наших коллег, покажу на дополнительном слайде. Для другого Аргонавта CbAgo, также являющегося ДНК-зависимой ДНК-нуклеазой показано, что короткие ДНК, загруженные в Аргонавт образуются при участии комплекса RecBCD. Мутации его компонентов изменяют профиль связанных с Аргонавтом коротких ДНК (Kuzmenko, 2020). Насколько мне известно, свободные короткие ДНК в таком эксперименте пока не анализировали.

Для Аргонавта RsAgo, связывающего в качестве гидов короткие РНК, проводили анализ тотальных коротких РНК в присутствии или отсутствии Аргонавта. Без Аргонавта количество коротких РНК в клетках *Rhodobacter sphaeroides* заметно меньше и отличается их состав. Данный Аргонавт предпочитает U на 5’-конце и в присутствии Аргонавта фракция коротких РНК была обогащена такими гидами.

1. Соглашусь, что такой эксперимент следует провести в дальнейшем для KmaAgo. В нашей лаборатории было показано для Аргонавта CbAgo, что профиль коротких ДНК, загруженных в Аргонавт дикого типа и каталитически неактивный мутант отличаются друг от друга, что позволяет сделать вывод об участии Аргонавта в генерации гидов (Kuzmenko, 2020).
2. Показано, что, по крайней мере, некоторые Аргонавты могут защищать бактериальные клетки от фаговой инфекции. Покажу данные из статьи (Kuzmenko, 2020) на дополнительном слайде. CbAgo снижает эффективность инфекции бактериофагами M13 и p1, показано что он загружается короткими ДНК, которые картируются на кольцевой однонитевой геном бактериофага, а также не комплементарную цепь, что говорит о загрузке Аргонавта в процессе репликации бактериофага. Дальнейшие исследования влияния Аргонавтов на течение фаговой инфекции в настоящее время активно ведутся в нашей лаборатории, в том числе с Аргонавтами, упомянутыми в данной работе.
3. Это также интересный вопрос, пока таких исследований не проводилось.
4. Если сравнить профили распределения по геному коротких ДНК, связанных с KmaAgo и CbAgo можно обнаружить отличия. В случае KmaAgo распределение более равномерное, отсутствует предпочтение к плазмидной ДНК и плазмидным последовательностям в геноме. Также нет выраженных пиков в области сайтов терминации репликации.
5. Исследование Аргонавтов в родных штаммах действительно очень интересно и продуктивно, но возникает проблема отсутствия методик генной инженерии для многих штаммов – трансформации и т.д. Мы предпринимали попытки начать работу с клетками *Kurthia massiliensis*, но пока результатов не получили.

*Вопросы, которые были заданы в ходе защиты диссертации:*

*От доктора биологических наук Тиллиба Сергея Владимировича:*

Очень интересно для меня с точки зрения биотехнологического инструмента. Я бы хотел уточнить. У вас на многих рисунках несовершенное расщепление, не стопроцентное. Можно добиться почти полного расщепления в нужном месте? И насколько велика вероятность при этом неспецифических расщеплений? Потому что олигонуклеотиды в больших геномах повторяются. Как вы смотрите на перспективу использования как биотехнологического инструмента? По-видимому, будет можно довести условия, чтобы было хорошее расщепление в одном месте. Это хорошо работает на плазмидах или присутствуют фоновые эффекты?

*На вопрос соискатель дала следующий ответ:*

На однонитевой мишени, к примеру, аргонавт KmaAgo расщепляет практически полностью в случае оптимальных для него гидов и мишеней и достаточно четко. Мы это видим на геле, с мечеными радиоактивным фосфором олигонуклеотидами. Это достаточно точный метод. В случае расщепления плазмид мы также можем детектировать достаточно чистые продукты в геле. Но действительно, мисматчи могут нарушать как эффективность разрезания, так и его точность. В случае некоторых вариантов мы видим, что присутствует не одна точка расщепления, она смещается. Тогда, как в случае полностью комплементарного гида, расщепление происходит в одном месте.

На заседании 28 февраля 2023 года диссертационный совет принял решение за исследование новых программируемых нуклеаз из семейства бактериальных белков-Аргонавтов, результаты которого расширили представления о специфичности и нуклеазной активности выбранных белков, присудить Кропочевой Екатерине Вадимовне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 15 докторов наук по специальности «молекулярная биология», участвовавших в заседании, из 21 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за – 15, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

**Председатель**

**Диссертационного совета Мельникова Лариса Сергеевна**

**Ученый секретарь**

**Диссертационного совета Набирочкина Елена Николаевна**

28 февраля 2023 года