

ОТЗЫВ

официального оппонента Дивашука Михаила Георгиевича на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Васильева Руслана Алексеевича «Направленная модификация геномов с помощью новых эндонуклеаз CRISPR/Cas V типа» по специальности

1.5.3 - «Молекулярная биология»

Диссертационная работа Руслана Алексеевича Васильева посвящена исследованию обнаруженного в бактерии *Ruminococcus bromii* sp. класса *Clostridia* нового ортолога Cas12a нуклеаз - RbCas12a, его биохимической характеристике в условиях *in vitro* и оценке эффективности использования в качестве инструмента редактирования генома на примере культуры клеток человека. Работа также включает в себя изучение обнаруженной способности Cas12a нуклеаз вносить разрывы в ДНК в составе комплексов с двумя короткими молекулами РНК, являющимися, по сути, отдельными частями нативной направляющей РНК.

Актуальность избранной темы диссертационной работы заключается в необходимости современной науки в расширении пула используемого инструментария, в частности, это относится и к молекулярно-биологическим исследованиям. В последние годы широко изучаются подходы к редактированию геномов, потребность в которых в биотехнологической и агропромышленной отраслях сложно переоценить. К сожалению, на данный момент возможности предлагаемых средств редактирования генома зачастую оказываются недостаточны не только для внедрения этих подходов в терапию заболеваний наследственных патологий человека, но и для решения многих задач био- и агротехнологии. Перспективным, хотя и не единственным, путем расширения возможностей сферы современного геномного редактирования является поиск и характеристика новых ферментов, способных вносить направленные мутации в геном с предсказуемым результатом. Увеличение разнообразия имеющихся в доступе экспериментатора инструментов позволяет проводить более направленные и точные манипуляции, с использованием наиболее подходящих методик. Другой путь — это улучшение свойств уже изученных ферментов, как правило, достигается внесением направленных или ненаправленных мутаций в кодирующие их гены с последующим анализом активности. Такой подход в ряде случаев, несомненно, оказывается оправданным в контексте оптимизации характеристик ферментов, однако не дает возможности получить принципиально новые белки с уникальным набором характеристик. Поиск и изучение новых ферментов, напротив, может приводить к обнаружению непредсказуемых свойств, в том числе полезных для решения той или иной задачи.

Рукопись диссертационной работы имеет традиционную структуру и изложена на 116 страницах. Она состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключения, выводов, списка сокращений, списка

использованной литературы (116 источников) и дополнительных материалов (3 приложения). Рукопись включает 2 таблицы и 23 рисунка.

Обзор литературы знакомит читателя с темой исследования, затрагивает аспекты молекулярных механизмов, лежащих в основе борьбы микроорганизмов с вирусами, уделяет особое внимание системам CRISPR/Cas с детальным описанием функционирования Cas нуклеаз.

Диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов и подходов молекулярной биологии, микробиологии и биоинформатики. Глава «Материалы и методы» написана подробно, с детальным и логичным изложением хода проводимых экспериментов, состоит из трех частей. В первой части описаны подготовительные этапы по изучению нуклеазы — биоинформатический поиск, клонирование необходимых конструкций, получение фермента. Вторая часть описывает все шаги получения данных о свойствах нуклеазы *in vitro*, а также анализ активности Cas12a в комплексе со сплит-направляющей РНК. Третья часть посвящена изучению работы фермента в качестве редактора генома клеток человека.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно описаны полученные результаты исследования с понятной, аргументированной и научно-обоснованной интерпретацией. Автором впервые охарактеризованы свойства нового ортолога Cas12a (Cpf1), а также открыта способность всего семейства Cas12a разрезать ДНК, используя в качестве направляющего элемента пару коротких РНК. Описанный в работе ортолог Cpf1 нуклеаз обладает рядом преимуществ перед имеющимися аналогами, в первую очередь, более высоким покрытием потенциальных геномных локусов для редактирования, благодаря менее строгой последовательности РАРМ. Кроме того, в работе доказана активность нуклеазы по отношению к хроматину на примере клеточной культуры. Дальнейшие изучения этого фермента, возможно, приведут к более широкому его использованию в научной практике. Научную ценность открытия способности Cpf1 формировать комплексы с несколькими молекулами коротких РНК еще предстоит оценить, однако очевидна безусловная фундаментальная значимость изученного свойства.

Заключение и выводы в полной мере обоснованы представленными данными, полученными в ходе выполнения диссертационного исследования.

Диссертация Васильева Р.А. не вызывает существенных замечаний. Однако стоит отметить некоторые моменты.

1. В обзоре литературе широко освещаются молекулярные механизмы работы систем CRISPR/Cas, в том числе отдельных представителей систем V типа, что полностью согласуется с тематикой работы и с ее результатами. Однако учитывая новизну полученных результатов со сплит-версией направляющей РНК, хотелось бы видеть в литературном обзоре данные о других модификациях направляющих РНК, чтобы более полно оценить место изученного свойства в общем ряду возможных модификаций.

2. При определении РАМ последовательности проводились эксперименты по *in vitro* разрезанию РАМ-библиотеки с дальнейшим NGS анализом продуктов реакции. В научной практике для этой цели наряду с *in vitro* методами используют в том числе *in vivo* методы в клетках *E. coli*, позволяющие дать оценку РАМ-специфичности непосредственно в бактериях. Чем обусловлен выбор *in vitro* методики?

3. На стр.68 на Рисунке 9 представлены электрофореграммы реакций разрезания *in vitro* с использованием эквимольных количеств рекомбинантных белков RbCas12a и AsCas12a в течение различных временных промежутков. Автор сравнивает эффективности разрезаний и делает вывод, что RbCas12a более активен, чем AsCas12a (что действительно следует из Рис.9). В то же время в работе не приведены результаты очистки рекомбинантного AsCas12a, что можно было показать, например, с помощью электрофореза в ПААГ, как это было сделано для RbCas12a. Таким образом, из одного только Рисунка 9, не имея сведений о чистоте рекомбинантного AsCas12a, сложно делать однозначный вывод о разнице в эффективностях в условиях *in vitro*.

В разделе Материалы и Методы не описано откуда бралась ДНК *Ruminococcus bromii* sp. Была использована какая-то библиотека с последовательностями этой бактерии (стр 36: «Образцы ДНК, в которых на предыдущих этапах были найдены целевые локусы CRISPR»)?

В эксперименте на Эффективность разрезания RbCas12a в различных буферах (Рис 7) разрезания лучше было произвести в дифференцирующих условиях, когда разрезание проходит примерно на 50%. В условиях практически полного разрезания, исходной ДНК остаётся очень мало, что существенно понижает точность ее определения. В то же время даже незначительная разница между оставшейся исходной ДНК (например, 1% и 2%) может означать заметное различие в скорости разрезания.

На Рисунках 2 и 5 размеры белков белковые маркеры не обозначены.

На рисунке 6 при определении четвертичной структуры белка RbCas12a (мономерное, димерное или какое-то другое состояние в растворе) с помощью гель-фильтрации не показано распределение стандартов размера белка.

В разделе 2.1.5 (Получение рекомбинантного RbCas12a) процедура очистки белка описана подробно, однако осталось не ясно, при какой скорости подвижной фазы проходила хроматографическая очистка белка и какое оборудование было использовано для проведения хроматографии.

На рисунке 10 (Влияние температуры на эффективность разрезания *in vitro* RbCas12a) не ясно время инкубации.

Краситель для окраски полиакриламидных гелей с разделенным белковым образцом в работе называется Coomassie-250, хотя правильнее назвать Coomassie-R 250. Указанные вопросы и замечания незначительны и не влияют на сделанные в работе выводы и общее положительное впечатление от диссертационной работы.

Диссертационная работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода.

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Считаю, что соискатель Васильев Руслан Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Дивашук Михаил Георгиевич

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 977-93-29; e-mail: divashuk@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.15 - Генетика

Адрес места работы:

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Тел.: +7 (499) 977-09-29; e-mail: iab@iab.ac.ru

Подпись сотрудника ФГБНУ ВНИИСБ Дивашука М.Г. удостоверяю:

Начальник отдела кадров ФГБНУ ВНИИСБ.

Л.И. Сукова