

## ОТЗЫВ

официального оппонента Сергиева Петра Владимировича 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»

Редактирование геномов стало незаменимым инструментом практически любого фундаментального исследования в области молекулярной биологии. Кроме высокой значимости для фундаментальной науки, редактирование геномов открывает новые перспективы для медицины и биотехнологии. Поиск и исследование новых систем CRISPR/Cas также открывает нам глаза на природное разнообразие и устройство систем противофаговой защиты бактерий. Немаловажным в наш беспокойный век также является то обстоятельство, что широко известные и широко применяющиеся системы CRISPR/Cas запатентованы нашими западными, как говорится, партнерами. Остро стоит вопрос об отечественном патентно-чистом и эффективно работающем генетическом редакторе. Это, не без пафоса будет сказано, вопрос технологической независимости страны.

В работе Васильева Руслана Алексеевича была обнаружена и изучена новая эндонуклеаза RbCas12a. В рамках диссертационного исследования изучалась активность фермента в различных условиях *in vitro*. Стоит отметить, что большое количество похожих работ по поиску новых нуклеаз заканчиваются исключительно *in vitro* характеристикой ферментов, поскольку успешно использовать их в качестве инструментов редактирования генома не получается по тем или иным причинам. Васильеву Р.А., напротив, удалось получить делецию в геноме клеток человека с помощью RbCas12a, что, безусловно, повышает ценность данной работы в общем ряду схожих исследований.

Структура работы достаточно традиционна. Диссертация содержит «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Последний раздел включает 116 источников. Работа изложена на 116 страницах, иллюстрирована 23 рисунками и 2 таблицами, включает 3 приложения.

Во «Введении» приводится общая информация об изучении систем CRISPR/Cas в качестве инструментов редактирования генома человека.

Раздел «Обзор литературы» достаточно полно вводит в проблематику исследования. В главе рассмотрены системы защиты бактерий от фагов. Конечно, особенное внимание уделено системам CRISPR/Cas, причем закономерно, что наиболее подробно рассмотрены системы CRISPR/Cas пятого



типа, к которому принадлежит исследуемая в данной диссертационной работе система. Раздел написан понятно и профессионально, читатель может разумно сравнивать особенности системы, которую изучает соискатель с другими подобными системами, известными из научной литературы.

Раздел «Материалы и методы» свидетельствует о том, что в работе использовался довольно широкий набор современных методов молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики. Раздел написан достаточно подробно, как и подобает в диссертации с тем, чтобы у читателя была возможность, при желании, воспроизвести описанные эксперименты.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор подробно представляет и анализирует полученные экспериментальные данные.

Начинается раздел с описания того, как соискатель создавал конструкции для экспрессии гена RbCas12a и получения гидовых РНК в бактериальной, бесклеточной и эукариотической системах, а также как происходило выделение рекомбинантного белка.

После выделения рекомбинантного белка, Руслан Алексеевич проводит опыты по установлению оптимальных условий функционирования системы CRISPR/Cas из *Ruminococcus bromii*. Для этой задачи были испробованы различные буферные системы, оптимизирована температура и время реакции. Эти шаги совершенно необходимы для характеристики нового фермента, который планируется применять в биотехнологии. Также определена специфичность RbCas12a в отношении ионов металлов.

Еще более сложный тип экспериментов связан с установлением наличия коллатеральной гидролазной активности фермента RbCas12a и его специфичности в отношении узнаваемых PAM участков. Определена длина выступающих концов, образуемых этой нуклеазой при активации, а также возможность использования комбинации двух РНК (т.н. split) вместо одной в качестве направляющей.

Наконец, «венчает» работу эксперимент, который показывает возможность успешного применения этого нового инструмента для редактирования генома клеточной линии человека. Это очень важная часть работы, имеющая максимальную практическую значимость.

В «Заключении» автор резюмирует данные, полученные в ходе диссертационного исследования.

На основании проведенной экспериментальной и аналитической работы автором получено 7 выводов. Выводы соответствуют достигнутым результатам и являются абсолютно правомерными.



Как и во всякой большой и интересной работе в диссертационной работе Васильева Руслана Алексеевича можно найти некоторое количество мелких несущественных недостатков, рассказать о которых обязанность рецензента.

1. Начнем с самого основного. Стиль изложения в главе Результаты и Обсуждение ставит читателя в сложное положение зрителя немого кино, вошедшего в зал с половины фильма. Мы как бы смотрим со стороны за действием, обходясь без каких-либо комментариев, поясняющих цель и логику происходящего. Глава Результаты и Обсуждение начинается так: "Результаты выдачи CRISPRTarget позволили идентифицировать T-богатую последовательность PAM..." Что такое CRISPRTarget? Зачем его запускали? Вообще, и диссертации и научные статьи пишутся в виде, позволяющем читателю в любом месте понять логику действий. Можно было бы написать, например, как то так: "Нашей задачей было изучить систему CRISPR/Cas из *Ruminococcus bromii*. Для этого, нужно было в первую очередь клонировать ген RbCas12a для экспрессии в бактериях, выделить белок и протестировать его активность... Чтобы протестировать активность RbCas12a необходимо было иметь субстрат для направленного разрезания. В то время, как последовательность спейсеров и, соответственно, архитектура crRNA была понятна из последовательности CRISPR кассеты, последовательность PAM участка мы не знали. Для разумного предположения об этой последовательности мы использовали программу CRISPRTarget, позволяющую предугадать последовательность PAM участка по ... такому-то принципу."

Глава 3.3 начинается таким образом: "Разрезание ДНК рекомбинантным RbCas12a *in vitro* проводили в ряде буферов: Nebbuffer1.1, Nebbuffer2.1, Nebbuffer3.1, Nebbuffer4, CutSmart (NEB), а также при добавлении в них 5 mM дитиотрейтола (DTT) и буфера для разрезания (100 mM HEPES pH 7.5; 500 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT). Результаты представлены на электрофореграмме (Рисунок 7)." Опять же, читатель как бы наблюдает со стороны за молчаливым экспериментатором, пытаюсь понять причины его выбора. Какие-то минимальные вводные фразы в начале главы значительно облегчили бы читателю восприятие текста. Вот ведь в следующей главе автор показывает, что пояснения ему не чужды: "Чтобы уточнить температурный диапазон активности RbCas12a, ...". Было бы хорошо подобный риторический прием использовать и в других главах.

2. Тестирование разрезания ДНК в клетках. На рисунке 22, верхняя панель, не приведен контроль без разрезания. ПЦР порой может приводить к появлению неспецифичных продуктов амплификации. Было бы приятно убедиться, что низкомолекулярная зона появляется только в условиях разрезания. Я бы также

подверг секвенированию и продукты разрезания ДНК по одному участку, приводящему к репарации с помощью NHEJ. Хотя это и не обязательно, но могло бы добавить содержательной информации малыми усилиями.

3. В работе есть какая-то доля опечаток и неудачных выражений, что, конечно, сущая мелочь:

Стр. 9 “при использовании в качестве кофакторов ионы магния”

Стр. 23 “инструментом ... пользуются бактерии и археи, экспрессирующие белки «анти-CRISPR»”. Во-первых, экспрессируются не белки, а гены, а во-вторых, гены систем «анти-CRISPR» экспрессируют *фаги*.

Стр. 36 “проведена ... (ПЦР) *со* праймерами”

Стр. 47 “ Гидролизованная ДНК далее анализировались электрофоретически”. ДНК анализировалась, а еще лучше, гидролизованную ДНК анализировали.

Стр. 66 “Разрезания проводили...” Разрезание, даже если разрезали в разных условиях.

Стр. 78 “...объясняется нативной природой” native это, собственно, и есть природный

Стр. 78 название главы “Сплит направляющей РНК” неудачно.

Высказанные замечания не снижают общей высокой оценки 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.

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

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального



государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Сергиев Петр Владимирович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-16-71; e-mail: petya@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.10 - Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: +7(903) 669-19-62; e-mail: press@chem.msu.ru

Личную подпись —  
**ЗАВЕРЯЮ:**  
Нач. отдела дел  
химического факультета

Л