

## ОТЗЫВ

**официального оппонента Шайтана Алексея Константиновича 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 Васильева Руслана Алексеевича нацелена на изучение новой РНК-направляемой эндонуклеазы системы CRISPR/Cas V-A подтипа. В работе приводятся полученные данные об условиях работы фермента *in vitro* и продемонстрирована способность эндонуклеазы вносить направленные изменения в геном клеток человека.

Системы CRISPR/Cas нативно осуществляют защиту прокариотических организмов от мобильных генетических элементов. Эффекторные нуклеазы Cas, осуществляющие с помощью РНК направленное разрезание чужеродной нуклеиновой кислоты, широко используются в качестве инструментов редактирования генома высших эукариот. Белок SpCas9 был первым задействованным в качестве редактора генома представителем CRISPR/Cas систем и на данный момент является самым применяемым в мировой практике. Однако с момента открытия систем V типа, нуклеазы Cas12a благодаря своим исключительным отличиям от Cas9 быстро были адаптированы для работы в клетках человека и животных. Способность Cas12a редактировать участки генома с T-богатой последовательностью PAM существенно выделяет эти ферменты от семейства Cas9, чей потенциал редактирования реализуется преимущественно в локусах с G-богатыми последовательностями. В то же время стоит отметить, что количество потенциальных локусов редактирования Cas12a все же невелико. Кроме того, изученные представители Cas12a обладают сравнительно низкой эффективностью редактирования клеток млекопитающих. Поэтому поиск эффективных ортологов Cas12a, способных узнавать более широкий диапазон целей в геноме, является интересной и актуальной задачей.

Диссертационная работа написана по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы (116 источников) и дополнительных материалов. Рукопись включает 2 таблицы и 23 рисунка, изложена на 116 страницах.

Работа написана хорошим языком, легко читается и практически не содержит опечаток.

Литературный обзор посвящен изучению CRISPR/Cas систем. Содержит краткий исторический экскурс, определяет место CRISPR/Cas в общем пуле

систем защиты прокариот, далее углубляется в механизмы молекулярных взаимодействий белков Cas.

Глава «Материалы и методы» содержит исчерпывающие данные о проведенных экспериментах с описанием арсенала современных молекулярно-биологических методик, которые были использованы автором во время выполнения диссертационной работы. В ней подробно описаны схемы молекулярного клонирования, а также дизайна эксперимента. Приведены условия тестирования эндонуклеазы RbCas12a в различных условиях *in vitro* и в культуре клеток человека. Стоит отметить, что Васильев Р.А. использовал широкий спектр молекулярно-биологических, биохимических и гено-инженерных методов исследования. Подробное изложение методики определения последовательности PAM обнаруженной нуклеазы может являться справочным материалом при выполнении аналогичных работ и демонстрирует обстоятельность и глубину планирования молекулярно-генетического анализа.

В «Результатах и обсуждении» подробно приводятся полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты, новизна которых обусловлена следствием открытия нового ортолога Cas12a, а также интересным обнаруженным свойством семейства Cas12a связывать в качестве направляющего агента две молекулы коротких РНК, выполняющих по отдельности роли структурных элементов гидовой РНК. Полученные результаты сопровождаются критическим анализом полученных данных и их обсуждением в контексте современных подходов к CRISPR/Cas-индуцированному редактированию геномов. Стоит отдельно отметить разделы 3.6 «Определение последовательности PAM» и 3.9 «Сплит направляющей РНК», содержащие, на мой взгляд, наиболее интересные результаты проведенных работ. Во-первых, определенная в ходе выполнения работы консенсусная последовательность PAM вида «5'-YYN» нуклеазы RbCas12a выгодно выделяет ее среди охарактеризованных ортологов, поскольку значительно увеличивает количество возможных участков генома для редактирования. Во-вторых, учитывая наличие у описанного фермента коллатеральной активности (раздел 3.7 «RbCas12a проявляет коллатеральную активность»), его PAM увеличивает количество молекулярных мишеней для CRISPR-диагностики, что особенно актуально в условиях недавней пандемии. В-третьих, возможность разрыва направляющей РНК Cas12a и использование ее частей независимо при формировании RNP-комплекса без видимой потери эффективности в условиях *in vitro*, снижает экономические издержки при твердофазном синтезе РНК, что может интенсифицировать исследования в данной области.

«Заключение» и «Выводы» написаны объективно, логично следуют из полученных в работе результатов.

Результаты диссертационной работы опубликованы автором в трех публикациях из списка ВАК, включая журналы с высоким импакт-фактором *Nucleic Acids Research* и *International Journal of Molecular Sciences*, докладывались на конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика».

К работе можно выдвинуть ряд замечаний и вопросов:

1) В изложении обзора литературы, результатов и заключения не хватает иллюстраций, которые бы продемонстрировали структуру изучаемых молекулярных систем и облегчили таким образом понимание текста. В частности, например, на стр. 24, описывая процесс адаптации, автор утверждает, что эндонуклеазы “процессируют торчащие концы той цепи ДНК, которая не содержит PAM (нетаргетная цепь)”. Почему цепь, которая не содержит PAM, в данном случае является нетаргетной остается непонятным, так как обычно в CRISPR-Cas комплексе нетаргетная цепь ДНК как раз содержит PAM.

2) На стр. 70 утверждается, что «При 30 °C активность комплекса снижается в некоторых репликах, в результате по полученным данным наблюдается  $61.3 \pm 29.2$  стандартных отклонений процента разрезания.» Следует отметить, что концепция стандартного отклонения, строго говоря, не применима к описанию отклонений относительных величин. Следовало бы указать, сколько раз проводились измерения и каков был разброс значений или доверительный интервал.

3) В ходе работы последовательность PAM 5'-YYN была определена *in vitro* в условиях разрезания PAM-библиотеки в течение 30 мин при 37 °C. Однако эффективности разрезания ДНК с различными PAM сильно варьируют, например, CTT, CCA, CCG практически не разрезаются. Зависят ли наблюдаемые эффекты от условий проведения реакций? Увеличится ли эффективность при более длительной инкубации?

4) Оценка активности RbCas12a *in vivo* проводилась с использованием двух направляющих РНК для получения делеции в геноме клеточной культуры. Вместе с тем активность в клетках можно определять, исследуя мутации, при использовании лишь одной направляющей РНК. Чем обусловлен такой выбор?

5) На Рисунке 22 показаны относительные эффективности внесения делеции в ген DNMT1. Значения достигают 77.1 % в одной из реплик, в то время как в двух других не превышают 22 %. Чем объясняется столь большая разница значений?

6) В части обсуждения работ по сплит-РНК хотелось бы, чтобы был обсужден вопрос о структурных механизмах связывания спейсерной РНК отдельно от скаффолдной РНК (структуры гомологичных Cas12a известны).

7) В целом хотелось бы, чтобы в диссертации был отдельный раздел, где проводилось бы более глубокое обсуждение сравнения полученных результатов

для RbCas12a с результатами известными из литературы для других нуклеаз семейства Cas12a.

Несмотря на имеющиеся замечания, считаю, что диссертационная работа Р. А. Васильева является целостным качественным исследованием высокого уровня. 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:

Доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Шайтан Алексей Константинович

Контактные данные:

Тел.: +7 (495) 939-57-38; e-mail: shaytan\_ak@mail.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.09 - Математическая биология, биоинформатика (физ.-мат. науки)

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: +7 (495) 939-27-76; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова А.К. Шайтана удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова



Е.В. Петрова