

ОТЗЫВ
на автореферат диссертационной работы
Васильева Руслана Алексеевича на тему
«Направленная модификация геномов с помощью новых эндонуклеаз
CRISPR/Cas V типа», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная
биология»

Диссертационная работа Васильева Руслана Алексеевича посвящена изучению новой эндонуклеазы CRISPR/Cas V типа из зубактерии *Ruminococcus bromii*. Системы CRISPR/Cas широко изучаются исследователями всего мира, в первую очередь из-за возможности применять их в качестве инструментов редактирования генома. Известная нуклеаза Cas9 рутинно используется в подобного рода экспериментах. Однако в последние годы появляется все больше данных об успешных опытах с применением другого типа Cas нуклеаз – Cas12a. Данные ферменты имеют ряд принципиальных отличий от Cas9, в частности они распознают тимидин-богатые PAM области, в то время как Cas9 – гуанидин-богатые регионы. Изучение различных нуклеаз Cas12a позволит пролить свет на нюансы их работы и получить необходимые знания для приобретения ими статуса рутинного инструмента редактирования. В работе Васильева Р.А. дана всесторонняя оценка неохарактеризованной ранее нуклеазы RbCas12a, что делает диссертационное исследование актуальным и подтверждает новизну полученных результатов.

В ходе работы было установлено, что нуклеаза RbCas12a способна распознавать 5'-YYN-3' области PAM. Стоит отметить, что подобная PAM-толерантность не является широко распространенной среди Cas12a, что повышает ценность диссертационной работы. Также автором были подобраны условия работы фермента *in vitro*, в частности показана активность нуклеазы при связывании двух молекул-частей гидовой РНК. В работе автор укорачивал длину гидовой РНК, наблюдая за изменением эффективности разрезания матрицы. Интересным результатом этих экспериментов является обнаруженная эндонуклеазная активность при связывании белком исключительно той части гидовой РНК, которая является комплементарной матрице, при полном отсутствии шпилечной части гидовой РНК. Результаты дополнительных проведенных с гидовыми РНК экспериментов демонстрируют общее для Cas12a нуклеаз свойство – способность связывать «сплит»-версию направляющей РНК, в которой спейсерная и скаффолдная части представлены на разных молекулах. Большую практическую ценность имеют эксперименты по редактированию генома клеток человека. Васильеву Р.А. удалось с помощью RbCas12a внести разрывы в ядерную ДНК, что автор подтверждает с помощью анализа данных NGS.

В то же время к автореферату имеются некоторые замечания. Во-первых, не очень четко сформулированы задачи исследования, в том числе пункты 2 и 3. Они не в полной мере являются планом выполнения работы в экспериментальных терминах. Во-вторых, в задачах имеется пункт о получении рекомбинантного белка RbCas12a, но получение рекомбинантного белка никак не отражено в главе «Результаты и обсуждение» автореферата, хотя из дальнейших результатов ясно, что он был получен. В-третьих, глава

«Методология и методы исследования» практически не раскрыта и выполнена для формального наличия. В четвертых, утверждается, что «Из Рисунка 2 следует, что наибольшая активность наблюдается при 42 °С, но она не сильно отличается от таковой при 37 °С», хотя из рис. 2 следует, что активности фермента достоверно не различаются при температурах 30, 37 и 42°С. Наконец, в работе несколько раз, в т.ч. и в выводах, упоминается об обнаружении гена нуклеазы длиной 3735 п.о. Не понятно, идет ли речь о размере всего гена, или только его кодирующей части. Если верно первое, то не понятно, каков же размер открытой рамки считывания гена, а если второе — почему употребляется термин «ген».

В заключении хочется добавить, что текст автореферата является достаточно логичным и связным, автор приводит исчерпывающий анализ полученных в ходе работы результатов. Выводы емкие и сформулированы обоснованно. Содержание автореферата в полной мере отражено в публикациях автора.

Считаю, что соискатель Васильев Руслан Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории геномной инженерии
Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического Агентства,
к.б.н.
Манувера Валентин Александрович

Тел.: +7 (499) 246-4409
e-mail: vmanuvera@yandex.ru
г. Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а