

## 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 активности ДНК эндонуклеазы RbCas12a из CRISPR/Cas системы бактерии *Ruminococcus bromii*. Ферменты данного семейства изучены довольно хорошо, однако каждый представитель имеет свои уникальные особенности. Изучение свойств новых Cas12a белков, в аспекте способности вносить изменения в геном млекопитающих, является более чем актуальной задачей.

Автореферат Васильева Р.А. построен по классической схеме. Результаты работы представлены в виде иллюстративного материала высокого качества, содержательны и информативны. С их помощью автор визуализирует экспериментальную часть диссертационной работы. Она в свою очередь представляет собой несколько серий экспериментов по использованию рекомбинантного RbCas12a для гидролиза ДНК-матриц в различных условиях *in vitro*. Автор сравнивает активности RbCas12a с гомологичной нуклеазой, определяет температурный оптимум работы RbCas12a, определяет кофактор-зависимость фермента и последовательность PAM, которую способен узнавать исследуемый белок. Последнее является критически важным для характеристики подобного рода ферментов, поскольку именно от PAM зависит, возможно ли применить тот или иной Cas инструмент для редактирования конкретного локуса.

Результаты экспериментов Васильева Р.А. позволяют сделать выводы, что RbCas12a способен функционировать в пределах от 20 до 42 С, связывая наиболее эффективно ионы магния и марганца *in vitro*. Примечательно, что в работе также продемонстрирована коллатеральная активность изучаемого фермента, что, с одной стороны, в перспективе позволяет использовать его в разработках биосенсоров нуклеиновых кислот, а с другой – оставляет опасения по поводу проявления этой неспецифической активности внутри клеток, хотя по данному вопросу необходимы дополнительные исследования, которые могут быть продолжены автором в его последующей работе. Еще одним, безусловно интересным, результатом является активность нуклеаз при расщеплении направляющей РНК. В данном случае Васильев Р.А. исследовал эффективность разрезания нескольких гомологов Cas12a при связывании коротких РНК, выполняющих роли двух структурных частей направляющей РНК. Это

удивительное свойство, к сожалению, было продемонстрировано только в экспериментах на синтетической матрице. Интересно увидеть аналогичных эксперименты на живых клетках.

Наиболее важными итогами экспериментальной части являются полученная автором консенсусная последовательность РАМ для RbCas12a, а также демонстрация активности фермента по отношению к геному клеточной линии человека. Судя по полученным результатам, была внесена направленная делеция в геном линии НЕК293Т с использованием двух направляющих РНК на расстоянии 471 нуклеотид друг от друга.

Результаты работы были опубликованы в трех статьях в рецензируемых научных журналах. Особенно стоит отметить публикацию результатов работы в журнале *Nucleic acids research* с импакт-фактором на момент публикации равным 16.971. Один этот факт уже характеризует Васильева Р.А. как высококлассного специалиста.

Диссертационная работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к данному типу работ. Считаю, что соискатель Васильев Руслан Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории клеточной и молекулярной  
патологии сердечно-сосудистой системы

Маркин Александр Михайлович

« 21 » октябрь 2022 г.

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына  
федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный  
центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Тел.: +7(499)120-80-65

E-mail: [alexander.markin.34@gmail.com](mailto:alexander.markin.34@gmail.com)

