

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Чиринской Ангелины Валерьевны на тему: «Изучение активности фермента LbCas12a в условиях *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.

Генетика

Актуальность темы исследования.

Системы редактирования генома CRISPR/Cas впервые были описаны как системы т.н. «адаптивного иммунитета» у прокариот, которые используют короткие РНК, закодированные в особых последовательностях генома (CRISPR-локусах), которые направляют нуклеазу Cas для создания сайт-специфичных надрезов в чужеродной/вирусной ДНК. После того как стало ясно, что данный уникальный природный инструмент может быть использован также как технология редактирования геномов млекопитающих, включая человеческий, метод стал стремительно развиваться в таких областях, как диагностика инфекционных заболеваний, создание организмов с заданными свойствами, направленный мутагенез. Присуждение Нобелевской премии по химии в 2020 году Эммануэль Шарпантье и Дженнифер А. Дудна за открытие т.н. «генетических ножниц» дало новый толчок прикладным исследованиям систем CRISPR/Cas как перспективного инструмента для осуществления генной терапии наследственных заболеваний.

Предметом исследования в данной работе является представитель семейства ферментов Cas12, которые выделяются высоким разнообразием, широким спектром целевых ДНК-последовательностей и, главное - высокой специфичностью, что делает их одними из наиболее востребованных инструментов в биотехнологии и медицине, однако многие их особенности описаны не в полной мере. В диссертации Чиринской А.В. проводится анализ активности фермента LbCas12a в присутствии впервые обнаруженного нового РАМ (*protospacer adjacent motif*), а также специфичности фермента LbCas12a в условиях *in vitro*. Также, показано наличие нуклеазной активности, отличающееся от целевой и коллатеральной активностей, описанных для данного фермента.

Научная новизна.

В рамках диссертационного исследования впервые показывается взаимодействие фермента LbCas12a с целевой ДНК, несущей последовательность РАМ 5'-ТТАА-3'. Также показано, что специфичность взаимодействия нуклеазы с целевой ДНК изменяется в зависимости от последовательности РАМ. В данной работе впервые показывается наличие экзонуклеазной активности у фермента LbCas12a. С учетом полученных данных об

активности фермента, предложена система для анализа наличия микровставок/микроделеций в целевой ДНК на базе нуклеазы LbCas12a.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В плане практической применимости результатов, в диссертации Чиринскайте А.В. предложен вариант использования рекомбинантного фермента LbCas12a в лабораторных условиях для проведения потокового генотипирования нокаутных животных для идентификации в геноме микровставок или микроделеций. В качестве системы детекции предлагается использование расщепляемых флуоресцентных зондов, что позволяет проводить анализ результатов эксперимента как с помощью флуоресцентных ридеров, так и визуально по интенсивности свечения в ультрафиолетовом свете. Узнавание нового РАМ, а также обнаружение экзонуклеазной активности фермента LbCas12a позволяет увеличить качество результатов при использовании систем детекции на базе данного фермента. Также, наличие альтернативного РАМ, узнаваемого ферментом увеличивает потенциальный круг мишеней для внесения направленных изменений в геном различных организмов *in vivo* при помощи данного фермента.

Достоверность и обоснованность полученных результатов.

Методический уровень данной работы высокий, использованные методы адекватны поставленным задачам. Полученные в исследовании Чиринскайте А.В. с применением этих методов результаты строго документированы представленными иллюстрациями и таблицами.

Структура и содержание диссертации.

Диссертация представлена на 85 страницах и содержит традиционные разделы: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы, заключение, список литературы, и благодарности. Список литературы представлен 125 источниками.

Раздел «**Введение**» занимает 5 страниц, объясняет актуальность исследования, степень разработанности темы, его цели и задачи, положения, выносимые на защиту, новизну полученных результатов, а также теоретическое и практическое значение работы. Также представлена информация об апробации данной работы в виде 5 публикаций в реферируемых журналах и докладов на международных конференциях.

Глава «**Обзор литературы**», которая озаглавлена «CRISPR/Cas системы: от повторов в геноме до инструментов генной терапии наследственных заболеваний человека», занимает 21 страницу и иллюстрирована восемью рисунками. В трех подглавах весьма лаконично, но исчерпывающе проведен глубокий анализ исследований по

тематике диссертации от истории открытия CRISPR/Cas систем до структурной специфики объекта исследования – нуклеазы LbCas12a.

В главе «**Материалы и методы**» на 14 страницах подробно представлена информация об использованных в работе штаммах микроорганизмов, об использованных микробиологических, генетических методиках, а также методах молекулярной биологии и биохимии. Эта глава проиллюстрирована четырьмя рисунками и шестью таблицами. Автор овладел самыми разнообразными методами современной молекулярной генетики, что является несомненным достоинством работы.

Экспериментальные данные обобщены в главах «**Результаты**» и «**Обсуждение**», которые по объёму занимают 23 страницы и подробно иллюстрированы семнадцатью рисунками. Автором была проделана большая и методичная работа, а в обсуждении проведен анализ полученных результатов, сравнение с данными, полученными в других исследованиях по данной тематике, а также сделаны предположения о причинах получения таких данных в экспериментальной работе.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, аргументированы и достоверны.

Однако, в процессе ознакомления с работой возник ряд **вопросов и замечаний**:

1. В разделе «**Материалы и методы**» есть отсылки к методическим описаниям в пункте 3.2 и 3.5, однако, думаю, здесь скорее имеют место опечатки и должно быть “пункт 2.3” и “пункт 2.5”. Также имеется неточность на странице 42 (пункт 2.6): нуклеотидные последовательности флуоресцентно-меченных репортерных одностранных ДНК, очевидно, приведены в Таблице 4, а не 3, как указано в тексте.
2. Так ли необходимо краткое методическое описание в начале почти каждого подпараграфа раздела «**Результаты**», если данные методы уже подробно описаны в разделе «**Материалы и методы**»? Это также касается рисунка 24, который является методологической инфографикой и, скорее всего, органичнее смотрелась бы в Главе 2 (а именно в пункте 2.10).
3. В разделе «**Результаты**» не совсем ясно, что именно подразумевается под “дополнительным внутренним контролем” для нивелирования наличия “фоновое уровня расщепления флуоресцентных зондов”. Также не объясняется значение красной пунктирной линии на рисунках 18 и 19. Было бы неплохо прописать цветовые коды для различных флюорофоров в описаниях рисунков 21, 22 и 23, а не только в тексте.

4. Чем все же объясняется наличие коллатеральной активности в отсутствие двухнитевого расщепления ДНК с делециями в позиции 17-18 на рисунке 16? Было бы интересно, помимо констатации факта, узнать мнение диссертанта, почему на конце спейсера (в позициях 19-20) неспаренности между направляющей РНК и ДНК не приводят к той же степени ингибирования активности фермента, как во всех остальных случаях?

Приведенные замечания никоим образом не умаляют научной ценности проведенного исследования и предложенных новых методических подходов.

С учетом всего вышеизложенного полагаю:

Содержание диссертации Чиринскайте Ангелины Валерьевны на тему: «Изучение активности фермента LbCas12a в условиях *in vitro*» соответствует специальности 1.5.7. «Генетика»;

Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, либо изложены новые научно обоснованные технические, технологические или иные решения и разработки, имеющие существенное значение для развития страны

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено.

Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета,
Заведующая лаборатории Токсикологии и Молекулярной систематики,
Доктор биологических наук, профессор,
Директор Института физиологии им.
акад. Л.А. Орбели НАН РА

Подпись проф. Айвазян Н.М. заверяю:

Ученый секретарь Института физиологии,
им. акад. Л.А. Орбели НАН РА



Небогова Кристина Александровна
21.01.2025г.