

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета

на диссертацию **Чиринскойте Ангелины Валерьевны**

на тему: «**Изучение нуклеазной активности фермента LbCas12a в условиях in vitro**»,

представленную на соискание ученой степени **кандидата биологических наук**

по научной специальности **1.5.7. Генетика**

Актуальность избранной темы

В последние годы методы редактирования геномов развиваются очень бурно. Системы редактирования генома CRISPR/Cas, в настоящее время получают все большее распространение как инструменты направленного изменения наследственного материала. Активно ведется поиск новых систем CRISPR/Cas их описание и систематизация. Среди них ферменты семейства Cas12a получили широкое распространение в биотехнологии благодаря большому спектру целевых последовательностей ДНК и большой специфичности разрезания ДНК. Нуклеаза а LbCas12a, которой посвящена представленная к защите работа, относится к данному семейству но охарактеризована слабо (мало изучены ее субстратная специфичность, узнавание ею различных PAM, эффективность). Исходя из вышесказанного актуальность диссертации не вызывает сомнения.

Научная новизна и практическая значимость работы

Несмотря на активное исследование новых ферментов семейства Cas12a, фундаментальные исследования их свойств не достаточны. В диссертационной работе Чиринскойте А.В. впервые выявлена новая последовательность PAM, узнаваемая нуклеазой LbCas12a, проанализирована специфичность расщепления ею ДНК-мишени в случае наличия неспаренностей при взаимодействии с направляющей РНК, показано наличие экзонуклеазной активности у изучаемого фермента, исследована коллатеральная активности фермента. В работе предложен подход для детекции микроделеций в геномной ДНК на основе использования нуклеазы LbCas12a, не требующий больших затрат материальных ресурсов и времени.. Таким образом, работа Чиринскойте Ангелины Валерьевны внесла заметный вклад в разработку систем редактирования геномов.

Основное содержание

Диссертационная работа изложена на 85 страницах и состоит из введения, четырех глав, выводов, заключения, списка литературы из 125 наименований. Работа содержит 29 рисунков и 6 таблиц.

Глава 1 «Обзор литературы. CRISPR/Cas-системы: от повторов в геноме до инструментов генной терапии наследственных заболеваний человека» посвящена обобщению имеющихся

данных от истории открытия до различных аспектов использования CRISPR/Cas-систем. Завершает раздел описание имеющихся сведений о работе нуклеазы LbCas12a, изучением которой занималась А.В. Чиринская

Во второй главе описываются материалы и методы исследования. Следует отметить оригинальность и изящность дизайна многих экспериментов в данной работе.

В третьей главе описаны результаты исследования. В четвертой главе приводится их обсуждение.

К работе имеются следующие **вопросы и замечания**:

1. На рисунке 14 представлены схемы комплексов, образуемых нуклеазой LbCas12a с направляющей РНК *exo1 wt* и целевой ДНК в случае канонического и нового РАМ. Почему изучаемые последовательности изображены в разном контексте?
2. На рисунке 16а не совсем понятно, почему на электрофореграммах сверху и снизу представлено разное количество нанесенного препарата ДНК.
На рисунке 16б отсутствует легенда для столбиков синего цвета.
3. В описании результатов анализа коллатеральной активности сказано, что использованы зонды с FАМ, но нет ни слова о гасителе. Эта небрежность затрудняет восприятие материала.
4. На стр 57 обсуждается различие в 1 нуклеотид фрагмента при его мечении FАМ и VIC с точки зрения разной молекулярной массы флуорофоров. Это сомнительная интерпретация. Программное обеспечение использованного в работе секвенатора пересчитывает первичные данные и вводит поправку в зависимости от флуорофоров. Автору следовало бы подумать и о каких-то альтернативных гипотезах, объясняющих сделанное наблюдение.
5. В работе имеется незначительное количество стилистических, орфографических, и пунктуационных огибков.

Однако, сделанные замечания не умаляют достоинств работы. Результаты этой работы будут использованы в молекулярно-генетических и биотехнологических исследованиях.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Чиринской Ангелины Валерьевны на тему: «Изучение нуклеазной 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 генетики. Работа имеет огромное значение для фундаментальной и прикладной науки. Ее результаты по достоинству оценены научным сообществом. Обоснованность научных положений и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Основные результаты работы представлены в виде докладов на международных конференциях и 5 научных статей в престижных журналах, индексируемых Wos и Scopus,

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
Доктор биологических наук,
доцент,
профессор кафедры генетики и
биотехнологии биологического
факультета
Санкт-Петербургского
государственного университета

Татьяна Валерьевна Матвеева



17.01.2025