

ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета

о диссертации Ангелины Валерьевны Чиринскайте

на тему: «Изучение нуклеазной активности фермента LbCas12a

в условиях *in vitro*», представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. - Генетика

Актуальность и новизна диссертационного исследования:

В диссертации А. В. Чиринскайте выполнено исследование нуклеазной активности фермента LbCas12a, который, наряду с нуклеазой Cas9, активно используют в молекулярной биологии благодаря его способности направленно вносить двунитевые разрывы в ДНК-мишень. Семейство нуклеаз Cas12 отличается высоким разнообразием ферментов, расщепляющих широкий спектр целевых ДНК-последовательностей. Ферменты этого семейства способны более специфично, по сравнению с SpCas9, расщеплять целевую ДНК. Ферменты Cas12a используют в лабораторной практике: с использованием LbCas12a были получены нокаутные линии различных организмов; был создан ряд диагностических систем на базе данного фермента, однако, субстратная специфичность и коллатеральная активность ферментов Cas12 были исследованы недостаточно. В представленной работе рассмотрены вопросы субстратной специфичности фермента LbCas12a, а также исследована коллатеральная активность фермента. Обнаружена новая последовательность PAM, узнаваемая нуклеазой LbCas12a, и впервые показано наличие экзонуклеазной активности у LbCas12a. Полученные результаты могут быть использованы для повышения предсказуемости получаемых результатов при проведении геномного редактирования с помощью LbCas12a, а также могут применяться для повышения точности систем детекции специфических последовательностей ДНК, использующих нуклеазную активность фермента LbCas12a.

Фундаментальная и практическая значимость представленной работы:

Полученные в результате этого исследования данные открывают новые возможности для использования фермента LbCas12a в диагностических целях, в частности, для идентификации в геноме микроинсерций или микроделеций, а потенциально и однонуклеотидных вариантов, без использования дорогостоящего оборудования, что потенциально может быть применено в лабораторной практике. Уточнение данных о неспецифической активности фермента может быть использовано при создании более точных диагностических систем на базе фермента LbCas12a. Впервые описанная в данной работе последовательность РАМ расширяет потенциальный круг мишеней для внесения направленных изменений *in vivo* в геномы при помощи данного фермента. В частности, это может быть актуально при разработке перспективных подходов для редактирования геномов различных млекопитающих.

Достоверность и обоснованность полученных результатов:

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, а использованные методы адекватны поставленным задачам. Полученные с применением этих методов результаты документированы представленными иллюстрациями и таблицами, некоторые замечания по представлению, возникшие при ознакомлении с работой, изложены далее.

По результатам диссертационного исследования было опубликовано пять статей в рецензируемых журналах, три из которых в изданиях первого квартала. В двух статьях А. В. Чиринской является первым автором. Результаты, полученные в ходе исследования, были представлены в докладах на международных и всероссийских конференциях.

Структура и содержание диссертации:

Полный объем диссертации составляет 85 страниц, включает 29 рисунков и 6 таблиц. Диссертация имеет классическую структуру и состоит из следующих разделов: введения, списка сокращений, 4 глав, выводов, заключения, списка литературы и благодарностей. В список литературы включено 125 источников.

В разделе «Введение» представлена информация об актуальности диссертационного исследования, его научной новизне, фундаментальной и практической значимости работы, а также представлена информация об апробации данной работы.

В главе 1 проведен достаточно подробный анализ литературы по тематике диссертации.

В главе 2 «Материалы и методы» представлена информация об использованных в работе штаммах микроорганизмов, а также об использованных микробиологических и генетических методах, о методиках молекулярной биологии и биохимии.

В главе 3 «Результаты» представлены полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты, описанные весьма подробно, с указанием деталей выполненных экспериментов, требуемых для обеспечения возможности их воспроизведения.

В главе 4 «Обсуждение» 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, выглядят аргументированными и достоверными.

После ознакомления с материалами диссертации могу высказать ряд замечаний и вопросов:

Стр. 19: Cas1 относится к многодоменным ферментам или является одним из белков в составе группы Cas1-4?

Стр. 50: Непонятно, почему на Рис. 16А столь отличаются количества целевой ДНК в случае разных РАМ. Неясно, как автор проводит сравнение активности расщепления.

Диаграмма на Рис. 16Б требует пояснения, поскольку часть расшифровок цветowych обозначений на рисунке отсутствует. Также не проведена статистическая обработка данных. Аналогичные замечания и в отношении рисунков 18 и 20.

Стр. 54: Что такое «степень расщепления целевой ДНК» и что означает фраза «эффективность расщепления ДНК-мишени практически отсутствует»?

Рис. 28: Отличия в пробах ДНК мышей, несущих микроделеции в целевых генах, по сравнению с контролем визуально детектируемые, но пробовал ли автор оптимизировать методику для получения более четких отличий, которые сделали бы ее более применимой для скрининговых экспериментов?

Имеющиеся замечания не снижают качества и научной ценности диссертационной работы.

С учетом всего сказанного полагаю:

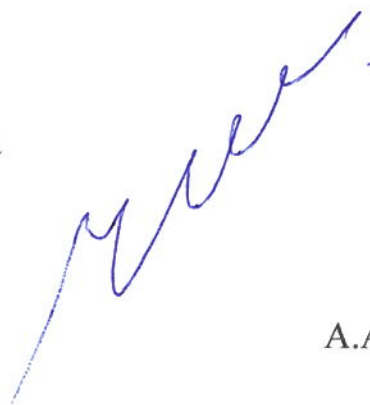
Содержание диссертации Ангелины Валерьевны Чиринскайте на тему: «Изучение нуклеазной активности фермента LbCas12a в условиях *in vitro*» соответствует научной специальности 1.5.7. - Генетика.

Диссертация А. В. Чиринскайте является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов активности нуклеаз Cas. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики и биохимии, в частности, открывая перспективы усовершенствования методологий редактирования генома и молекулярной диагностики.

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 А. В. Чиринской соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических 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.

«16» января 2025 г.

Председатель диссертационного совета
заведующий кафедрой
генетики и биотехнологии СПбГУ,
д.б.н., профессор РАН



А.А. Нижников