

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Чиринской 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

Развитие методов редактирования геномов для практического внедрения в биотехнологии и биомедицину является одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений практической генетики. После описания и характеристики системы прокариотического иммунитета CRISPR/Cas и разработки принципов ее внедрения для решения задач по редактированию геномов эукариот начали развиваться новые направления использования этой системы - от различных модификаций методов редактирования до создания систем прижизненного трекинга участков генома в ядре и изменения в упаковке хроматина. Однако одной из основных проблем этих подходов остается повышение точности распознавания мишеней и снижение off target вмешательств при их применении, а также расширение спектра практических задач, для решения которых можно было бы использовать высокоточное распознавание ДНК-мишени в системах *in vivo* и *in vitro*. На достижение этих целей направлено расширение спектра используемых нуклеаз и поиск методов повышения точности их работы за счет более детального описания особенностей распознаваемых последовательностей – мишеней и организации направляющих РНК. Диссертационная работа А.В.Чиринской, выполненная на Кафедре генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета под руководством научного сотрудника, к.б.н. Ю.В.Соповой вносит вклад в расширение инструментов для редактирования геномов и открывает перспективы для разработки новых инструментов на основе системы CRISPR/Cas. Автором впервые охарактеризована субстратная специфичность нуклеазы LbCas12a, а также, методом анализа коллатеральной активности этого фермента, сделано предположение о механизмах, лежащих в ее основе. Важным практическим результатом исследования является разработанный метод детекции микроделений в геномной ДНК.

Текст работы изложен на 85 страницах и состоит из введения, списка сокращений, четырех глав, выводов, заключения, списка литературы и благодарностей. Работа написана в академическом стиле, ясно и логично структурирована, однако текст не лишен опечаток. Изложение сопровождается 29 рисунками, а также 6 таблицами. Список литературы содержит ссылки на 125 источников. Работа прошла апробацию на четырех специализированных научных мероприятиях, а основные результаты исследования изложены в 5 статьях в международных рецензируемых периодических научных изданиях, 3 из которых относятся к высокорейтинговым журналам первого квартала (Q1).

Введение достаточно подробно освещает вопросы актуальности и новизны исследования, большое внимание уделено содержанию публикаций по теме исследования и роли автора диссертации в получении результатов, а также в подготовке публикаций. При общем высоком качестве подготовки по диссертации метаданных в этом разделе формулировки положений, вынесенных на защиту, скорее выглядят как выводы, а не утверждения, требующие защиты.

Обзор литературы опирается на достаточно широкий круг источников и в полной мере позволяет очертить круг проблем, на решение которых направлено исследование. Качественные иллюстрации и наглядные примеры облегчают знакомство с материалом и свидетельствуют о внимании автора к теоретической проработке проблемы. К недостатку этого раздела можно отнести отсутствие подробной характеристики бактерий семейства *Lachnospiraceae* – источника LbCas12a. В тексте этот факт упоминается вскользь, причем для написания названия используется курсив, как если бы речь шла о названии вида, что некорректно.

Экспериментальная часть работы выполнена на очень высоком методическом уровне, изобилует разнообразными методами биохимического анализа, молекулярной генетики и геномной инженерии. Описание методов свидетельствует о высокой квалификации автора и не оставляет сомнений в качестве полученных результатов. Спектр использованных в работе подходов адекватен поставленным задачам и позволяет достичь цели исследования.

Отдельного внимания заслуживает часть работы, посвященная разработке быстрого скринингового метода для детекции микроделеций, которая продемонстрировала потенциал результатов исследования для внедрения в практику. Однако описанный в работе эксперимент, который также лег в основу одной из публикаций по теме диссертации, может иметь достаточно широкий круг ограничений. К сожалению, в работе эти ограничения упоминаются мельком, хотя логично было бы в главе «Обсуждение» посвятить отдельный раздел сравнительному анализу существующих экспресс-систем для анализа микроделеций с предложенным подходом. Хотелось бы услышать от автора сравнение, с какими введенными в практику молекулярно-генетической диагностики системами было проведено, каковы преимущества и недостатки нового подхода, его принципиальные ограничения и возможности для их преодоления, а также потенциальные области применения.

Мне также хотелось бы услышать от автора информацию о потенциале применения охарактеризованного фермента в системах *in vivo*, где особенности описанной РАМ-последовательности и расширение круга потенциальных мишеней может открыть новые возможности для исследователей. Эти вопросы к автору диссертации возникли в первую очередь в связи со скупостью обсуждения результатов и определения перспектив их применения.

Выводы, сделанные на основе проведенного исследования, полностью соответствуют поставленным задачам и вытекают из полученных результатов.

Перечисленные замечания и вопросы не снижают общего положительного впечатления от работы и не могут оказать влияния на ее оценку.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Чиринскайте 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 конкретной научной задачи, имеющей значение для развития современной генетики. Полученные результаты могут найти применение как для развития фундаментальных исследований, так и лечь в основу прикладных разработок, подобных экспресс-тест системе микроделечий на образцах геномной ДНК, описанной в работе.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата 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

д.б.н., доцент, профессор кафедры
эмбриологии СПбГУ

А.Ф.Сайфитдинова

13.01.2025