

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Глотова Олег Сергеевича, доктора биологических наук, на диссертацию Чиринскайте 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.**

Диссертация Чиринскайте А.В. на тему «Изучение активности фермента LbCas12a в условиях *in vitro*» посвящена анализу нуклеазных свойств белка LbCas12a, который широко используется в лабораторной практике наряду с нуклеазами Cas9 и Cas13. Нуклеазы семейства Cas12 направленно расщепляют двуцепочечную ДНК за счет взаимодействия с направляющей РНК, как и нуклеазы Cas9. Однако разнообразие ферментов, широкий спектр их целевых последовательностей и высокая специфичность делают Cas12a одним из наиболее востребованных инструментов в биотехнологии и медицине, используемых для получения нокаутных организмов, для направленного редактирования азотистых оснований, а также для детекции нуклеиновых кислот. Ранее для фермента LbCas12a была получена кристаллическая структура, определена структура и последовательность направляющей РНК, а также выдвинуто предположение о механизме расщепления целевой ДНК, однако, количество данных о специфичности фермента LbCas12a и его способности распознавать различные последовательности РАМ (Protospacer adjacent motif) остаётся ограниченным.

### **Научная новизна.**

В приведенном исследовании был получен ряд принципиально новых результатов: впервые было обнаружено расщепление ферментом LbCas12a целевой ДНК, содержащей новый РАМ последовательности 5'-ТТАА-3'. Было выяснено, что в присутствии данного РАМ расщепление ДНК происходит более специфично в сравнении с известным ранее «каноническим» РАМ. Также, диссертантом впервые было показана неспецифическая экзонуклеазная активность данного фермента. Кроме того, представлена новая система для детекции микроделений в геномной ДНК с использованием LbCas12a.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Результаты данного исследования, касающиеся распознавания ферментом новой последовательности РАМ и изменений активности при нестандартных взаимодействиях, открывают новые перспективы для использования LbCas12a в диагностике, включая

идентификацию микровставок, микроделеций и, возможно, однонуклеотидных замен. Это может стать полезным инструментом в медицинской практике. Узнавание нового PAM расширяет потенциальные возможности для внесения направленных изменений в геном организмов *in vivo*, в частности, для генотерапии наследственных заболеваний.

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Результаты исследования, представленные в рамках данной диссертации, опубликованы в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных RSCI, WoS и Scopus, а также обсуждены на нескольких российских и международных конференциях. Работа выполнена на высоком методическом уровне, методы исследования являются адекватными поставленным целям.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация насчитывает 85 страниц, включает 29 рисунков и 6 таблиц. Она состоит из введения, списка сокращений, четырех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение»), выводов, заключения, списка литературы и благодарностей. В список литературы вошли 125 источников.

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

В обзоре литературы проведен глубокий анализ исследований по тематике диссертации, включая обзор основных исторических фактов становления и развития технологии CRISPR/Cas.

В главе «Материалы и методы» представлена информация об использованных в работе штаммах микроорганизмов, а также об использованных микробиологических, генетических методик, а также методик молекулярной биологии и биохимии, включая конструирование плазмид для наработки ДНК-мишени нуклеазы LbCas12a.

В разделе «Результаты» представлены полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты:

1. нуклеаза LbCas12a взаимодействует с новым PAM последовательности 5'-ТТААЗ', при этом эффективность расщепления целевой ДНК-мишени ниже, чем в случае канонического PAM;

2. при взаимодействии с РАМ ТТАА нуклеаза LbCas12a демонстрирует более высокую специфичность расщепления целевой ДНК по сравнению с каноническим РАМ;
3. нуклеаза LbCas12a, помимо коллатеральной, демонстрирует экзонуклеазную активность, которая должна быть принята во внимание при использовании в системах детекции на основе LbCas12a;
4. предложенная автором система для экспресс-генотипирования позволила детектировать наличие микроделений в образцах ДНК нокаутных линий мышей Pde6b-KO и Grin3a-KO.

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.

При прочтении диссертации возник ряд **замечаний**:

1. Автор использует много англицизмов, например - «сайленсинг», что несколько затрудняет восприятие текста диссертации.
2. В нескольких местах, например на стр.13., имеются опечатки автор пишет: «При изучении *E. coli* (Mojica et al., 2005), *S. thermophilus*, *S. vestibularis* (Bolotin et al., 2005) и *Y. pestis* (Pourcel et al., 2005) было установлено, что многие последовательности спейсерные последовательности в локусе CRISPR гомологичны фрагментам плазмид или участкам геномов различных **бактериофагов** (Mojica et al., 2005) (Pourcel, et al., 2005). Также было показано, что количество спейсеров, гомологичных определенным **вирусам** в локусе, положительно коррелирует со степенью устойчивости бактерий к данным **вирусам** (Bolotin et al., 2005)».

В процессе ознакомления с работой возник ряд **вопросов**:

1. Не совсем понятно, зачем в основные положения, выносимые на защиту автор в п.1. вынес результат где указано, что эффективность расщепления целевой ДНК-мишени ниже с новым РАМ последовательности 5'-ТТАА3'?
2. Хотелось бы уточнить у автора в чем фундаментальное отличие Cas 9 и Cas 12, кроме образования «липких» концов?

3. Может ли разработанная система детекции микроделений на основе нуклеазы LbCas12a применяться для поиска микроделеционных синдромов у человека? Например, синдрома Ди Джорджи.
4. Есть ли в России или в мире работы по построению филогенетической карты систем CRISPR/Cas полученных в результате полногеномного секвенирования различных клинических образцов? И можно ли это сделать из метагеномных данных? Какой объем прочтений нужен на 1 метагеном?
5. Предложенная автором система для экспресс-генотипирования позволила детектировать наличие микроделений в образцах ДНК нокаутных линий мышей Pde6b-KO и Grin3aKO. Можно ли такую же систему предложить для экспресс-диагностики бактерий, например, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium*?

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Чиринской 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  
Доктор биологических наук,  
Заведующий отделом экспериментальной  
медицинской вирусологии,  
молекулярной генетики и биобанкинга  
ФГБУ «ДНКЦИБ» ФМБА России  
22.01.2025г.



Глотов О.С.