

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Кораблева Алексея Николаевича**
«Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена
***Cntn6* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9»,**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07– «Генетика»

Актуальность исследования. Редактирование генома с целью коррекции существующих генетических аномалий и создания новых изменений в геноме млекопитающих, является интересной задачей в современной генетике, как с теоретической, так и практической точек зрения. В диссертационной работе Кораблева Алексея Николаевича поставлена задача создать мышей с масштабными делециями и дупликациями, включающими ген *Cntn6*, с помощью технологии CRISPR/Cas9 и оценить их влияние на жизнеспособность и развитие животных. Выбор данного гена обусловлен его ролью в развитии некоторых психоневрологических патологий человека. Важно отметить, что применение таких технологий вносит существенный вклад в наше понимание механизмов возникновения генетических повреждений на стадиях зиготы. Поэтому поставленная в диссертационной работе Кораблева Алексея Николаевича цель создать новые генетические модификации на модели мышей является актуальной и своевременно поставленной проблемой.

Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнения, так как многие результаты были получены впервые. Впервые показано, что целевые делеции, индуцированные CRISPR/Cas9, формируются на одноклеточной стадии (чаще в одном из пронуклеусов и реже в обоих) с высоким уровнем корректной репарации двунитевых разрывов ДНК. Впервые с помощью метода FISH и Саузерн-блот анализа показано отсутствие следов интеграции делетированных фрагментов ДНК (размером свыше 1000 т.п.о.) на 6-ую хромосому или другие хромосомы. В итоге реконструирован возможный механизм одновременного образования делеций и дупликаций через межхроматидный обмен в поздней S-фазе в

одном из пронуклеусов одноклеточного эмбриона. Полногеномное секвенирование гомозиготных носителей дупликации гена *Cntnb* показало целостность дублицированных копий с минимальными нецелевыми изменениями последовательностей ДНК в области целевых сайтов CRISPR/Cas9.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы Кораблева А.Н., показавшие возможность применения технологии CRISPR/Cas9 для создания линий мышей, несущих масштабные делеции в районе гена *Cntnb*, расположенного в 6-ой хромосоме, несомненно, имеют теоретическую значимость для нашего понимания времени и динамики формирования мегабазных делеций, дупликаций и инверсий в геноме. Кроме того, важным результатом таких исследований явилось понимание «судьбы» делетированного фрагмента ДНК, который, как оказалось, не встраивается в геном, а элиминируется на одноклеточной стадии эмбриогенеза. Практическая значимость результатов также не вызывает сомнения, т.к. созданные линии мышей с масштабными хромосомными перестройками гена *Cntnb* могут стать уникальным объектом для дальнейших исследований роли этого гена в развитии патологий нервной системы.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Все эксперименты, проводимые автором с привлечением современных экспериментальных методов генетики и молекулярной биологии, имели адекватные контроли. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Кораблева А.Н. изложена на 116 страницах, она содержит 16 рисунков, 12 таблиц и приложение, состоящее из 4-х рисунков и 1-й таблицы. Диссертационная работа

включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из нескольких глав. Здесь представлена информация о геномной нестабильности в районе 3-й хромосомы человека (3p26.3) и связанные с этим клинические проявления, прежде всего, психоневрологические нарушения. Автор справедливо отмечает противоречивость клинических исследований, связанных с изучением хромосомных перестроек в исследуемом районе 3-й хромосомы и необходимость их дальнейшего изучения. Далее автор характеризует экспрессию генов контактина у лабораторных мышей, их роль в развитии нейронов. Отдельной главой представлена информация о получении масштабных делеций и оценке их фенотипических эффектов у мышей. Рассматриваются также основные принципы использования технологии CRISP/Cas9 и их альтернативные варианты, анализируются наиболее эффективные подходы для получения целевых хромосомных перестроек. В обзоре литературы анализируются также недостатки этих технологий, а также последствия хромосомных перестроек.

Материалы и методы проведенного исследования полностью соответствуют поставленной цели и решаемым задачам. Были выбраны целевые сайты для применения технологии CRISP/Cas9, получены векторы, экспрессирующие хнРНК, получены компоненты для микроинъекции самкам мышей линий В6СВАF1/Ли С57BL/6J. Генотипирование животных-носителей индуцированных изменений в геноме было проведено методом ПЦР. Для анализа делеций в области гена *Cntnb* был использован метод Саузерн блота. Для дальнейшего исследования автором были получены первичные культуры фибробластов мышей-носителей делеций и дупликаций и с помощью метода FISH проанализированы метафазные хромосомы. В дальнейшем для

подтверждения наличия адресных геномных перестроек было проведено полногеномное секвенирование гомозиготных носителей дупликации 2274 т.п.о. Все методы описаны достаточно детально и могут быть легко воспроизведены.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований, где последовательно приводятся этапы проведения экспериментов. С помощью технологии CRISPR/Cas9 было получено пять носителей целевой делеции размером 1137 т.п.о., два - делеции и дупликации размером 2374 т.п.о., и четыре - инверсии, вовлекающие единственный ген *Cntn6*. Все 11 основателей-носителей хромосомных перестроек стали основателями линий мышей. Был проведен анализ наследования адресных делеций 1137 т.п.о. у потомков F1, полученных от скрещивания основателей с мышами дикого типа. Установлено, что шесть делеций сформировались на одноклеточной стадии в одном из пронуклеусов, а в одном случае в обоих родительских пронуклеусах. Эти данные хорошо согласуются с результатами FISH анализа метафазных хромосом основателей, показавшем присутствие делеции на одном из гомологов 6-ой хромосомы в исследованных клетках у пяти гетерозиготных носителей и на обоих гомологах у гомозиготного носителя. Автором впервые показано, что одновременное возникновение делеции и дупликации произошло на одноклеточной стадии в пронуклеусе, маркированном SNP, специфичным для линии C57BL/6J. Делается вывод, что эти процессы произошли в результате обмена сестринскими хроматидам, что подтверждается анализом делеций и дупликаций у потомков F1. Данные полногеномного секвенирования гомозиготных носителей дупликации показали, что обе копии гена *Cntn6* специфичны для линии C57BL/6J. Интересным аспектом исследования явился анализ методами Саузерн-блот и FISH локализации делетированного фрагмента ДНК размером 1137 т.п.о. у семи основателей-носителей этой делеции. Результаты позволили сделать предположение, что на одноклеточной стадии развития произошла его элиминация. Важно отметить, что автор провел также

комплексный анализ последовательностей «стыков» делеций и границ дублированных копий и не выявил нецелевых масштабных изменений ДНК. Для подтверждения целенаправленно индуцированных генетических изменений автором была определена экспрессия гена *Cntn6* у гомозиготных носителей делеции и дубликации. Результаты показали, что уровень его экспрессии соответствует дозе гена, тогда как экспрессия соседних генов *Ch11* и *Cntn4* у таких животных не отличается от мышей дикого типа. В целом, в результате выполнения диссертационной работы Кораблевым А.Н. получены новые оригинальные результаты, показавшие возможность использовать CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование генома для получения заданных геномных перестроек у лабораторных животных с последующим созданием новых геном-модифицированных линий.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям.

При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. Из работы не ясно, проводился ли сравнительный анализ геномов мыши и человека в интересующем районе генома для разработки дизайна эксперимента (с. 49).
2. Были ли видны физиологические различия между мышами с перестройками и диким типом? Автор обсуждает, что их не было (с. 94), однако в «Результатах» я не нашла такой анализ.
3. Хотелось бы знать мнение автора, каков механизм трисомии по 6-й хромосоме, возникающей под влиянием образования дуплексов *de novo*?

Приведенные выше вопросы носят, в основном, дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

Заключение. Диссертационная работа на тему «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дубликаций района гена *Cntn6* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9», соответствует критериям пп. 9-14

"Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор Кораблев Алексей Николаевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07– «генетика».

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
профессор, руководитель
лаборатории молекулярных
механизмов канцерогенеза
Федерального Исследовательского
Центра «Фундаментальная и
Трансляционная Медицина»
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12,
Тел. 8(383)335-98-47
gulyaeva@niimbb.ru
<http://niimbb.ru>

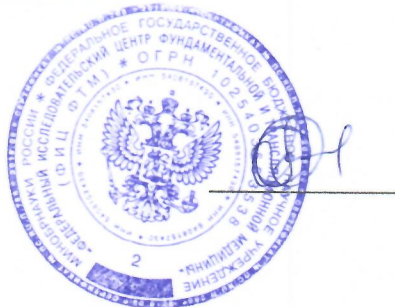


Гуляева Людмила
Федоровна

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.

заверяю:

Начальник отдела кадров
ФИЦ ФТМ



Минаева

Ольга Михайловна

18 февраля 2021 г.