

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 темы диссертации

Долгое время арсенал методов для исследования хромосомных патологий был ограничен световой микроскопией. Появление методов гибридизации, а особенно флуоресцентной гибридизации *in situ*, позволило проводить картирование хромосомных перестроек с высокой точностью. Тем не менее, даже самое точное картирование продолжало оставаться описательным методом. Наконец, современные методы трансгенеза и геномного редактирования позволили искусственно манипулировать участками генома *in vitro* и *in vivo*, что позволяет проводить функциональный анализ.

Алексей Николаевич в своей работе проводит анализ влияния масштабных делеций, инверсий и дупликаций, затрагивающих ген *Cntn6* (кодирует белок контактин-6) на фенотип мышей. У человека делеции и дупликации гена *CNTN6* являются причинами психоневрологических патологий у гетерозиготных носителей (заболеваний аутистического спектра, интеллектуальных расстройств, задержки развития и пр.). При этом молекулярные механизмы развития таких патологий не вполне ясны.

В связи с этим, диссертация Кораблева Алексея Николаевича, посвящённая изучению хромосомных мутаций затрагивающих ген *Cntn6* у мышей, выглядит крайне актуальной.

Новизна проведённых исследований и полученных результатов

Перед Алексеем Николаевичем стояла методически крайне сложная задача, так как требовалось совместить использование технологии CRISPR/Cas9 и трансгенеза на модельных животных. Впервые в мировой практике Алексеем Николаевичем было детально описано время и динамика формирования масштабных делеций, дупликаций и инверсий в шестой хромосоме мыши, индуцированных с помощью CRISPR/Cas9 технологии. Было обнаружено, что целевые делеции формируются на одноклеточной стадии, чаще в одном из пронуклеусов и реже в обоих, благодаря чему отсутствует мозаицизм по этим хромосомным перестройкам среди соматических клеток у F0, развившихся из экспериментальных зигот. Алексей Николаевич впервые показал, что фрагменты ДНК размером свыше 1000 т.п.о. после делеции элиминируются на ранних стадиях развития без интеграции в другие хромосомы.

Алексеем Николаевичем был также реконструирован возможный механизм одновременного образования делеции и дупликации, возникающие посредством межхроматидного обмена в поздней S-фазе в одном из пронуклеусов на одноклеточной стадии.

Новизна полученных результатов, таким образом, представляется очевидной.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений.

Работа Алексея Николаевича выполнена на очень высоком методическом уровне. Полученные хромосомные делеции, инверсии и дупликации были охарактеризованы при помощи разнообразных методов, как то полногеномное секвенирование, FISH, саузерн-блот анализ. Когда автору потребовалось изучить экспрессию генов *Chl1*, *Cntn6* и *Cntn4* он воспользовался методом цифровой ПЦР, что позволяет получать максимально достоверные данные о количестве транскриптов. Чувствуется, что в ходе работы Алексей Николаевич

обстоятельно относился к оценке достоверности полученных данных, поэтому обоснованность выводов не вызывает сомнений.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Работа Алексея Николаевича имеет большое значение для развития экспериментальной генетики, так как оптимизированный им протокол получения целевых хромосомных перестроек при помощи системы CRISPR/Cas9 способен обеспечить адресные мегабазного масштаба делеции, дупликации и инверсии в геноме зигот мыши с минимальным уровнем нецелевых модификаций генома. При этом, удаленные фрагменты ДНК (более 1000 т.п.о.) элиминируются без признаков их интеграции в другие хромосомы. Таким образом, предложенная в настоящей работе Алексеем Николаевичем методика является перспективным тонким инструментом адресных масштабных модификаций генома, и безусловно будет еще неоднократно использована как в фундаментальных так и в прикладных работах по созданию трансгенных животных.

Кроме того, полученные линии мышей с хромосомными перестройками гена *Cntn6* потенциально могут стать моделями для дальнейших физиологических исследований его роли в нейрогенезе.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты и выводы диссертационного исследования представляют интерес как для фундаментальной науки, так и для трансляционных исследований. В первую очередь, необходимо отметить что метод создания масштабных хромосомных делеций будет широко востребован в трансляционных исследованиях для создания всевозможных модельных животных с модифицированными хромосомами. Подобные задачи часто возникают при

создании «гуманизированных» животных, когда необходимо удалить протяженный участок собственной хромосомы животного и интегрировать гомологичный участок ДНК человека.

Также результаты работы Алексея Николаевича интересны и для фундаментальной науки, так как им были изучены возможные механизмы образования делеций и дупликаций в зиготе.

Оценивая содержание диссертации в целом, нужно отметить хорошо выстроенную логику изложения результатов, и прекрасный иллюстративный материал. Диссертация построена по классической схеме, во введении Алексей Николаевич обрисовывает актуальность работы и ставит исследовательские задачи. Обзор литературы соединит сведения о патологиях, вызванных хромосомными мутациями затрагивающими ген *CNTN6* у человека. Также присутствует обстоятельное изложение существующих методов и подходов к созданию масштабных делеций в геноме мыши. Раздел «материалы и методы» содержит детальное описание всех экспериментальных процедур, а также последовательности олигонуклеотидов. Раздел «результаты» содержит подробное изложение полученных результатов. Описано, как в экспериментах с использованием технологии прямой микроинъекции компонентов CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот с последующей их трансплантацией приемным матерям были получены трансгенные животные, ставшие основателями линий с делециями, дупликациями и инверсиями, затрагивающими ген *Cntn6*. Впервые показано, что возникновение дупликации, инициированной адресной делецией, произошло на одноклеточной стадии, в пронуклеусе, предположительно в результате обмена сестринскими хроматидами. Впервые проведен комплексный анализ «судьбы» делетированного фрагмента ДНК, выдвинуто предположение, что элиминация делетированного фрагмента ДНК происходит на одноклеточной стадии. Обнаружено, что у мутантных носителей делеции или дупликации гена

Cntn6 отсутствуют признаки снижения жизнеспособности в эмбриональном и постнатальном развитии, не выявлены дисморфозы и видимые нейральные нарушения, характерные для пациентов-носителей хромосомных нарушений, затрагивающих этот ген.

В обширном разделе «заключение» Алексей Николаевич обсуждает полученные результаты и подводит итоги.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы.

В качестве незначительного замечания можно отметить некоторые стилистические огрехи в тексте диссертации.

Заключение

Считаю, что диссертация Кораблева Алексея Николаевича «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntn6* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9» полностью соответствует паспорту научной специальности 03.02.07 – «генетика»: п. 1. «Молекулярные и цитологические основы наследственности.», п. 5. «Методы генетического анализа у прокариот и эукариот....», п. 10. «Генетическая и клеточная инженерия. Трансгенные организмы.»

Диссертация Кораблева Алексея Николаевича «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntn6* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является продуманной и законченной научно-квалификационной работой. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября

2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024 и от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор – Кораблев Алексей Николаевич - заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник
лаборатории иммуногенетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии
наук (ИМКБ СО РАН),
кандидат биологических наук



Кулемзин Сергей Викторович

630090

город Новосибирск

проспект Академика Лаврентьева д. 8/2

тел: +7383-363-90-72, e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru



Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук
Подпись *SK*
Учёный секретарь *Александр С. П.*
20 февраля 2021 г.