



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН**

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334  
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru  
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001  
<http://idbras.ru>

19.02.2021 № 12506/01-45  
На 15345-23-6215 от 10.12.2020



**«УТВЕРЖДАЮ»**

Врио Директора ИБР РАН  
член-корреспондент РАН, д.б.н.

А.В. Васильев

«19» февраля 2021

### ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН на диссертацию Кораблева Алексея Николаевича «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntnb* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

**Актуальность исследования.** Диссертационная работа Кораблева А.Н. посвящена разработке технологии создания модельных лабораторных животных (мышей), несущих масштабные хромосомные перестройки, с использованием системы CRISPR/Cas9, а также изучению эффектов такого рода перестроек на примере гена *Cntnb*. Хорошо известно, что хромосомные перестройки и изменение числа гомологов являются причинами наследственных и врожденных заболеваний человека, в том числе с тяжелыми неврологическими проявлениями. Моделирование таких заболеваний, несомненно, является актуальной задачей современных исследований. С одной стороны, это позволяет изучать молекулярно-клеточные механизмы клинических проявлений болезни, искать способы их смягчения или разрабатывать возможные технологии ранней диагностики и, в некоторых случаях, патогенетического лечения на основе редактирования генома. С другой стороны, зачастую оказывается, что молекулярные мишени таких перестроек оказывают небольшое влияние на здоровье животных, в то время как у человека приводят к серьезным повреждениям функций нервной системы. Такие данные чрезвычайно интересны в плане определения особых функций изучаемых генов у человека. Поэтому тема диссертационной



работы представляется чрезвычайно актуальной. Кроме этого, само по себе создание моделей такого рода является стимулом для развития подобных исследований в России.

**Структура и содержание, научная новизна.** Диссертация Кораблева А.Н. изложена на 116 страницах и написана по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка процитированной литературы и приложений, содержащих дополнительные материалы. Диссертация проиллюстрирована 20 рисунками и 13 таблицами, в том числе 4 рисунка и одна таблица в приложении. Работа изложена лаконично, но очень емко и содержательно. В обзоре литературы приведены данные относительно известных последствий вариаций копияности генов (copy number variation – CNV) в прителомерном районе короткого плеча 3-й хромосомы у человека, где располагается, в том числе, ген *CNTN6*, а также характеристика и экспрессия генов-гомологов у мышей. Также описаны имеющиеся экспериментальные подходы к получению масштабных делеций у мышей и их фенотипические эффекты, в том числе с использованием технологии CRISPR/Cas9. Кратко описаны потенциальные недостатки этой технологии. Очень кратко описаны возможные последствия хромосомных перестроек, что можно отнести к недостаткам литературного обзора. В разделе Материалы и методы подробно описан широкий спектр молекулярно-биологических, генетических и эмбриологических методик, использованных в работе. Многие из них весьма трудоемки и технически сложны, что подтверждает высокий методический уровень рассматриваемой диссертационной работы. В разделе Результаты и обсуждение детально описаны последовательные этапы индукции масштабных хромосомных перестроек в ооцитах мышей, получение животных и анализ геномов, как основателей, так и потомков модифицированных животных. Характер полученных хромосомных перестроек и их наследование проанализирован с помощью ПЦР-анализа на границы делетируемого фрагмента, а также Саузерн-блота геномной ДНК для характеристики границ хромосомных перестроек, анализа структуры ДНК в районах стыков. Это позволило получить ценную информацию о работе системы CRISPR/Cas9 в условиях эксперимента с предложенным в работе дизайном. Поскольку в результате индукции хромосомных перестроек удалось получить животных с разными их типами (делеции, инверсии и дупликации), некоторые виды исследований проводили отдельно для разных групп. Так, у носителей дупликаций провели SNP анализ для определения происхождения дуплицированного аллеля (поскольку зиготы были гибридными), а FISH анализ – у носителей делеций для определения, в том числе, судьбы делетированных участков. На основании этих исследований автором предложен механизм произошедших хромосомных перестроек. Во второй части работы проведен интегральный анализ внутриутробного и постнатального развития определенных гомо- и гетерозиготных носителей делеций и дупликаций. Для этого понадобилось верифицировать генотип потомков, а затем провести оценку динамики развития по набору веса, а также оценить экспрессию целевых генов в тканях мозга молодых мышей. Несомненно, это только первые самые общие результаты по исследованию проявлений полученных перестроек. Полученные линии мышей, несомненно, будут использованы в дальнейшем.



Новизна исследования заключается в том, что исследованы на молекулярном уровне механизм и последствия индукции хромосомных перестроек у мышей, индуцированных с использованием системы CRISPR/Cas9: показано, что целевые делеции возникают на одноклеточной стадии в одном или, реже, в двух пронуклеусах, использование методов FISH и Саузерн блота позволило впервые продемонстрировать отсутствие интеграции делетированных участков ДНК в геном. В случае дупликаций с помощью полногеномного секвенирования доказана целостность дублицированных копий, а также минимальные внецелевые изменения последовательности ДНК в потенциальных сайтах-мишенях CRISPR/Cas9. Предложен механизм одновременной делеции и дупликации.

Работа Кораблева А.Н. представляет большой интерес для исследователей во многих областях биологии. Во-первых, использованный подход для получения масштабных хромосомных перестроек доказал свою жизнеспособность, воспроизводимость и эффективность, может быть использован для самых разных генетических мишеней. Дизайн эксперимента, а, главное, грамотное подтверждение и анализ получившегося может служить основой для последующих работ в этой области. Интересно будет сравнить получающиеся результаты в плане подтверждения механизмов образования хромосомных перестроек. Во-вторых, получен ряд линий лабораторных мышей, несущих делеции, инверсии и дупликации весьма интересной области генома. На первый взгляд, «клинический» эффект этого значительно уступает таковому у человека. С одной стороны, возможно в дальнейшем привлечение дополнительных методов и тестов для верификации этих предварительных результатов. С другой стороны, на этой основе можно строить предположения об эволюции функций генов (сигнальных систем) в нервной системе, определяющих развитие и функционирование мозга у млекопитающих.

В диссертационной работе Кораблева А.Н. использованы современные методы экспериментальной биологии, проанализировано достаточное количество животных, образцов тканей и генетического материала, проведен грамотный биоинформатический анализ. Обоснованность и достоверность выводов обеспечивают независимые повторы экспериментов и наличие адекватных контролей в каждом тесте, а также проведенный анализ полученных экспериментальных данных. Все выводы следуют из результатов работы и содержат ответ на поставленные в диссертации задачи.

Основные положения и результаты диссертационной работы представлены в 4 статьях, из них две в высокорейтинговых международных журналах. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации, основные результаты работы получены автором самостоятельно.


Задачи исследования автором успешно решены. Разработан дизайн и проведены эксперименты, приведшие к получению мышей с адресными масштабными перестройками области генома, включающей ген *Cntn6*. Исследован процесс формирования перестроек и их судьба от зигот до взрослых животных F0. Уровень корректности индуцированных CRISPR/Cas9 делеций и дупликаций определен при помощи секвенирования ПЦР продуктов, Саузерн-блот анализа, полногеномного секвенирования и FISH, проведена оценка жизнеспособности и уровень экспрессии генов целевой области у мышей-носителей. Чрезвычайно интересным представляется предложенный механизм одновременного

**Замечания.** Диссертация Кораблева А.Н. написана четко и логично; содержит достаточное количество библиографических ссылок. Из мелких замечаний можно отметить некоторую лаконичность литературного обзора, а также отсутствие описания технических повторов в некоторых разделах методов. Существенных замечаний по рецензируемой диссертационной работе Кораблева А.Н. нет.

### Заключение

Диссертация Кораблева А.Н. «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntnb* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9» полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 № 335 и от 2.08.2016 № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика. Отзыв обсужден и утвержден на открытом семинаре лаборатории клеточной биологии ИБР РАН, протокол №2 от «16» февраля 2021 года.

Член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук

 / Воротеяк Е.А./

Сведения о составителе отзыва:

Воротеяк Е.А., доктор биологических наук по специальностям 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология,  
заведующий лабораторией клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН).

Почтовый адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 26.

Тел: +7(499) 135-40-81,

Интернет-сайт: <http://idbras.ru/>

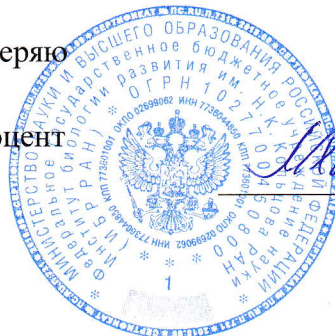
e-mail: [vorotelyak@idbras.ru](mailto:vorotelyak@idbras.ru)


Подпись Воротеяк Е.А. удостоверяю

Ученый секретарь ИБР РАН,

кандидат биологических наук, доцент

Хабарова Марина Юрьевна



 / Хабарова М.Ю./

Дата: 19 февраля 2021 г.