ОТЗЫВ

на автореферат 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».

Редактирование геномов - одно из самых востребованных и динамично развивающихся направлений современной биологии. Несмотря на вал работ в этой области, достаточно много аспектов и методологических приемов в направленном редактировании геномов остаются недостаточно исследованными.

В работе Кораблева А.Н. описано создание линий мышей с крупными хромосомными перестройками, имитирующими соответствующие патологические изменения генома человека. Совершенно логично, что в работе использована система CRISPR/Cas9, как наиболее удобная и широко распространенная в наше время система геномного редактирования. Конкретно, использовалась микроинъекция мРНК Cas9 и пары гидовых РНК, а также двух одноцепочечных ДНК олигонуклеотидов (мостиков) в цитоплазму мышиных зигот. После микроинъекции, перенесшие процедуру зиготы подсаживали мышам-рецепиентам. В результате проведенных экспериментов были инъецированы 599 зигот, из которых 256 были подсажены, что привело к рождению 41 мышонка. Данный эксперимент можно было бы считать масштабным и успешным, но рутинным, если бы не необычайно большая длина участка ДНК между местами разрезания – свыше 1 миллиона нуклеотидов. Подобный масштаб хромосомных перестроек делает работу уникальной и весьма интересной. Тщательный анализ как фаундеров, так и их потомков методами ПЦР, блоттинга, FISH, ОТ ПЦР и секвенирования (как Сенгеровского, так и высокопроизводительного) позволил определить детали изменения последовательностей ДНК и определить частоты образования отдельных продуктов редактирования.

Наиболее интересным и в то же время не вполне объяснимым мне кажется распределение частот встречаемости определенных аллельных вариантов у фаундеров по результатам FISH анализа и у их потомков, по результатам генотипирования. Так, необычным и не объясненным в достаточной степени является наличие небольшой примеси 2-3% клеток дикого типа в гетерозиготных фаундерах №9 и №11, а также примеси клеток с трисомией по 6 хромосоме у мышей фаундеров по делеции/дупликации №1 и №20. Объяснение «погрешностью метода» кажется не очень убедительным, с учетом нулевых частот «необъяснимых» аллелей у других мышей.

Весьма интересна идея о том, что делеция и дупликация целевого локуса произошли в результате одного события между парой сестринских хроматид. Об этом свидетельствует наличие идентичного SNP в обеих копиях дуплицированной области. Это выглядит весьма убедительно, однако в таком случае можно было бы ожидать идентичной частоты клеток с делецией и дупликацией и идентичной частоты потомков с этими вариантами у фаундеров. Этого, однако, не наблюдается. Возможно ли, что после единичного события дупликации и воссоздания участков гибридизации гидовых РНК могло происходить дальнейшее разрезание генома уже после начала дробления? В таком случае, должны были бы образоваться несколько аллельных вариантов с различающимися «стыками». Мне также представляется не вполне корректным с уверенностью говорить о том, что при соединении границ разрыва без микроделеций мы имеем дело с гомологичной рекомбинацией. Хотя общеизвестно, что NHEJ может приводить к образованию микроделеций и микровставок, это не является непременным результатом NHEJ, который вполне может приводить и к соединению концов ДНК без дополнительных изменений.

Мне представляется, что возникающие вопросы не только не снижают ценность диссертации, но наоборот, свидетельствуют о ее значимости и актуальности. Несмотря на обилие опубликованных в последнее время работ по редактированию генома, мы находимся все еще в самом начале пути, ведущем к пониманию молекулярных механизмов перестроек ДНК, а диссертация Кораблева А.Н. это большой шаг вперед в этом направлении.

Все вышеизложенное позволяет мне утверждать, что диссертация Кораблева А.Н. является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей требованиям, установленным в Положении о присуждении ученых степеней, а ее автор – Кораблев Алексей Николаевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

профессор кафедры химии природных соединений
химического факультета и
директор института функциональной геномики
МГУ имени М.В.Ломоносова,

Сергиев Петр Владимирович

доктор химических наук
по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия
тел. +7 495 9395418
эл. почта: petya@genebee.msu.ru