

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Дата защиты 10 марта 2021 г. протокол № 1

О присуждении Кораблеву Алексею Николаевичу
учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntnb* мыши, полученных при помощи технологии CRISPR/Cas9» по специальности 03.02.07 – генетика, принята к защите 25.12.2020 г, протокол №26, Диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утверждён ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутверждён Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Кораблев Алексей Николаевич, 1991 года рождения. В 2014 году окончил Новосибирский государственный университет, Новосибирск.

С 01.10.2015 г. по 30.09.2019 г. Кораблев А.Н. обучался в очной аспирантуре Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск. В период подготовки диссертации работал младшим научным сотрудником сектора постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН. В настоящее время работает младшим научным сотрудником в секторе постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН.

Диссертация выполнена в отделе молекулярных механизмов онтогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Серов Олег Леонидович** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярных механизмов онтогенеза ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Гуляева Людмила Федоровна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза НИИ Молекулярной биологии и биофизики, Федеральный Исследовательский центр «Фундаментальная и трансляционная медицина», г. Новосибирск

2. **Кулемзин Сергей Викторович** - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН), г. Москва. В своём положительном заключении, подписанном заведующей лабораторией клеточной биологии ИБР РАН, д.б.н., член-корреспондентом РАН Воротеляк Е.А. и утверждённом Врио директора ИБР РАН, член-корреспондентом РАН, д.б.н. Васильевым А.В., указало, что диссертация Кораблева А.Н. «Характеристика и эффекты масштабных делеций и дупликаций района гена *Cntnб* 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 2.088.2016 № 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.

Соискатель имеет всего 8 публикаций, из них 7 – по теме диссертации, общим объемом 42 страниц, в том числе 4 статьи, опубликованных в научных рецензируемых изданиях, (Wos, Scopus) и 3 тезиса в материалах всероссийских и международных конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Korablev AN, Serova IA, Serov OL. Generation of megabase-scale deletions, inversions and duplications involving the Contactin-6 gene in mice by CRISPR/Cas9 technology. BMC Genet. 2017 Dec 28;18(Suppl 1):112. doi: 10.1186/s12863-017-0582-7 (Web of Science, Scopus, IF 2.469).
2. Pristyazhnyuk, I.E., Minina, J., Korablev, A. et al. Time origin and structural analysis of the induced CRISPR/cas9 megabase-sized deletions and duplications involving the Cntn6 gene in mice. Sci Rep 9, 14161 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50649-4> (Web of Science, Scopus, IF 4.011).
3. Кораблев А.Н., Серова И.А., Скрябин Б.В. Манипуляции с ранними эмбрионами мыши для создания генетически модифицированных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):758-763. DOI 10.18699/VJ17.291 (Scopus).
4. Мензоров А.Г., Лукьянчикова В.А., Кораблев А.Н., Серова И.А., Фишман В.С. Практическое руководство по редактированию геномов системой CRISPR/Cas9. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):930-944. DOI 10.18699/VJ16.214 (Scopus).

На диссертацию и автореферат поступило 3 отзыва, все положительные.

Отзывы прислали:

1. Лебедев И.Н. – д.б.н., профессор РАН, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», руководитель лаборатории цитогенетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ, г. Томск.
2. Сергиев П.В. – д.х.н., профессор кафедры химии природных соединений химического факультета, директор института функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва. Вопросы: 1) Неясным осталось отклонение частоты клеток с делецией и дупликацией и идентичной частоты потомков с этими вариантами у основателей от теоретической; 2) Возможно ли, что после единичного события дупликации и воссоздания участков гибридизации гидовых РНК могло происходить дальнейшее разрезание генома после начала дробления? 3) «Представляется не вполне корректным с уверенностью говорить о том, что при соединении границ разрыва без микроделеции мы имеем дело с гомологичной рекомбинацией».
3. Томилин А.Н. – д.б.н., член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток, директор Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. Кузьмин Андрей Анатольевич - м.н.с. лаб. молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области генетики и молекулярной биологии, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали своё письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих

учреждений по изучению молекулярных и генетических механизмов регуляции ранних этапов развития и клеточной дифференцировки, клеточных механизмов морфогенеза, регенерации и роста, роли стволовых клеток, механизмов гаметогенеза и регуляции пола, интегрирующих систем (нервная, эндокринная, иммунная), обеспечивающие целостность организма в онтогенезе, гомеостаза развивающихся организмов, экологических и эволюционных проблем онтогенеза.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказана перспективность использования технологии микроинъекций компонентов системы CRSIPR/Cas9 в цитоплазму зигот мышей для адресной инициации хромосомных перестроек целевого гена и создания линий животных, гомо- и гетерозиготных носителей делеций, дупликаций и инверсий гена *контактин-6* (*Cntn6*), моделирующих перестройки в прителомерном районе короткого плеча хромосомы 3 человека.

Доказано, что делеции и дупликации гена *Cntn6*, индуцированные CRSIPR/Cas9, возникают у мышей на одноклеточной стадии в результате обмена между сестринскими хроматидами в одном из пронуклеусов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые изучен механизм одновременного возникновения дупликаций и делеций гена *контактин-6* в районе хромосомы 6 мышей, синтенном локусу 3p26.3 в хромосоме 3 человека. **Показано,** что при образовании дупликаций и делеций не происходит нецелевых изменений ДНК, при этом делетированные фрагменты ДНК не интегрируются в геном и элиминируются на одноклеточной стадии организма. **Показано** также, что возникшие на стадии зиготы дуплицированные копии гена *Cntn6* сохраняют свою целостность в двух независимо полученных линиях животных.

Изучена экспрессия гена *контактин-6* и близлежащих генов *Chl1* и *Cntn4* у мышей, гомозиготных по делеции или дупликации гена *Cntn6*. **Показано,** что данные перестройки не влияют на экспрессию генов *Chl1* и

Cntn4, но изменяют экспрессию *контактин-б* в соответствии с его копийностью.

Изучено влияние делеций и дупликаций гена *Cntnb* в гомозиготном и гетерозиготном состоянии на жизнеспособность мышей, а также динамику изменения массы тела в сравнении с животными дикого типа. **Показано**, что гомозиготное носительство по делеции или дупликации гена *Cntnb* не приводит к эмбриональной смертности и не снижает жизнеспособности животных на постнатальной стадии развития.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработана технология получения масштабных делеций и дупликаций (размером более 1 млн. п.о.) при помощи микроинъекции системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот с высокой эффективностью и без незапланированных генетических изменений.

С помощью данной технологии **созданы** уникальные линии мышей, несущие делеции, дупликации и инверсии гена *Cntnb*, которые могут быть использованы в физиологических исследованиях, связанных с изучением роли гена *Cntnb* в нейрогенезе и его влиянии на поведение животных.

Полученные теоретические знания и разработанные технологии могут быть использованы как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях научно-исследовательских организаций биологического, сельскохозяйственного и медицинского направления, применяющих системы целевого геномного редактирования для получения ген-модифицированных организмов и клеток различного назначения, а также в образовательном процессе при чтении курсов по генетике развития, молекулярной биологии и генной инженерии. Результаты диссертационной работы используются при чтении курса лекций «Генетика развития» на кафедре цитологии и генетики факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы экспериментальной эмбриологии,

генетической инженерии и классические методы генетического анализа, включая, технологии микроинъекций компонентов системы CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот мышей, клонирования плазмидных векторов, ПЦР, *in vitro* транскрипции. Для установления границ хромосомных перестроек у ген-модифицированных животных использованы электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле, секвенирование по Сэнгеру и Саузерн-блот анализ. Для установления судьбы делетированного фрагмента применен метод FISH. Оценка целостности дублицированных копий гена проведена с помощью полногеномного секвенирования, а уровня экспрессии генов *Cntn6*, *Cntn4* и *Chl1* – с использованием цифровой ПЦР. Определение генотипов животных проведено с помощью электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле. Данные обработаны стандартными методами статистического анализа.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, которая подтверждается использованием для создания и анализа характеристик линий мышей с хромосомными перестройками широкого набора методов – молекулярно-генетических, цитогенетических и физиологических, дополняющих друг друга. Интерпретация результатов, касающихся механизмов возникновения делеций и дубликаций, индуцированных системой CRISPR/Cas9, учитывает данные, полученные другими исследователями по рассматриваемой тематике, и поддерживает гипотезу одновременного возникновения делеции и дубликации путем обмена между сестринскими хроматидами на стадии зиготы в одном из пронуклеусов. Результаты получены на сертифицированном оборудовании для технологий микроинъекций в зиготы мышей, FISH, цифровой ПЦР, Саузерн-блот гибридизации, полногеномного секвенирования и могут быть использованы другими исследователями. Достоверность данных подтверждена статистической обработкой.

Личный вклад автора заключается в дизайне генетических модификаций, подборе целевых сайтов системы CRISPR/Cas9, подготовке компонентов системы CRISPR/Cas9 для микроинъекции, получении

генетически-модифицированных мышей, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Анализ животных, установление линий генетически-модифицированных животных, ведение колоний полученных линий произведено совместно с к.б.н. И.А. Серовой. Саузерн-блот анализ проведен при участии научной группы к.б.н. Б.В. Скрыбина (Мюнстерский университет, Германия), а FISH – к.б.н. И.Е. Пристяжнюк и Ю.В. Мининой. Выделение РНК и последующий анализ экспрессии генов *Cntn6*, *Chl1* и *Cntn4* проведен совместно с к.б.н. М.М. Гридиной. Полногеномное секвенирование произведено коммерческой компанией GENEWIZ (США). Биоинформационная обработка данных результатов полногеномного секвенирования проведена совместно с к.б.н. В.С. Фишманом.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют и соответствуют п. 3. «Процессы репликации, рекомбинации, репарации.», п. 4. «Мутационная изменчивость. Радиационный и химический мутагенез. Геномные и хромосомные перестройки. Полиплоидия и анеуплоидия. Модификационная изменчивость. Импринтинг.», п. 7. Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Роль геномных перестроек в реализации генного действия. Взаимодействие генов.» и п. 10. Генетическая и клеточная инженерия. Трансгенные организмы.» паспорта специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 10 марта 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Кораблеву Алексею Николаевичу учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 20, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Зам. председателя диссертационного совета, .

Доктор биологических наук



Н.Б. Рубцов

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

10.03.2021 г.