

**Отзыв официального оппонента
на диссертацию Смирнова Александра Васильевича на тему «Исследование механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом пронуклеарной микроинъекции»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - «генетика»**

Несмотря на сегодняшнюю несколько избыточную зарегулированность всех сфер, связанных с использованием трансгенных организмов, сложно представить наше настоящее и, тем более, будущее без использования генетически модифицированных организмов как в научных, так и в практических целях. В очень долгой, почти полувековой, истории трансгенеза, именно последнее десятилетие стало наиболее важным в развитии этой области молекулярной и клеточной биологии. В первую очередь, это связано с демонстрацией возможности использования системы адаптивного иммунитета бактерий CRISPR для направленного редактирования геномов, а также с открытием в последние годы других природных генетических редакторов. В то же время, многие базовые вопросы, связанные с технологиями получения генетически модифицированных организмов, остаются нерешенными на протяжении более чем 40 лет. Так, было не вполне понятно, каким образом процессируется экзогенная ДНК, вносимая в зиготу в процессе получения трансгенных животных. Давно было понятно, что интеграция вносимых генетических конструкций в хозяйский геном осуществляется при участии систем репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Однако оставалось неясным, каков вклад разных систем репарации двуцепочечных разрывов в этот процесс, а также каковы молекулярные механизмы известного феномена конкатемеризации трансгенов. Эти технические, казалось бы, вопросы, с одной стороны, представляют собой интересную молекулярно-биологическую задачу, а, с другой, имеют большое практическое значения в области получения трансгенных моделей мышей, особенно, с использованием CRISPR/Cas9-опосредованного трансгенеза. Все сказанное выше обуславливает актуальность и практическую значимость работы А.В. Смирнова, посвященной изучению

механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом микроинъекции в пронуклеус зиготы.

Сразу хочу отметить, что по уровню полученных в ходе работы результатов, а также по их представлению и обсуждению, эта диссертационная работа существенно превосходит средний уровень защищаемых диссертаций. В каком-то смысле, эту работу можно определить, как идеальную – в ней ставится одна конкретная цель, к которой автор планомерно приближается и, в конце концов, достигает. Конечно, нельзя утверждать, что это заслуга исключительно автора диссертационной работы – думаю, большую роль сыграли руководитель и весь коллектив лаборатории/отдела. Важно также отметить, что в ходе работы не только получены новые интересные данные, но фактически для проведения этого исследования был создан новый молекулярно-биологический, биоинформатический и визуализационный инструментарий.

Диссертационная работа объемом 117 страниц включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы», «Приложения». В диссертации процитировано 182 работы; работа содержит 33 рисунка и 2 таблицы.

Обзор литературы состоит из трех основных частей, планомерно подводящих читателя к постановке экспериментальных задач. Все три раздела, так или иначе, связаны с вопросом конкатемеризации трансгенов, который рассматривается как с концептуальной так и с технической стороны. В целом, обзор литературы написан очень хорошим языком, логично, хорошо иллюстрирован и содержит необходимые сведения для понимания представленных в работе экспериментальных данных.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно. Ознакомление с этим разделом дает представление как об общем дизайне исследования, так и о многих технических деталях. Несомненно, автор является высококвалифицированным исследователем, владеющим большим арсеналом современных методов молекулярной и клеточной биологии. Единственно, что обращает на себя внимание в этом разделе, так это

практически полное отсутствие описания использованных биоинформатических подходов.

Экспериментальные результаты работы изложены в виде двух основных глав в разделе «Результаты». В то время как в первой части речь идет о получении и характеристике трансгенных эмбрионов с конкатемерами, во второй – приводится анализ карт конкатемеров, полученных с использованием методов глубокого секвенирования. Одним из важных практических достижений работы, является создание баркодированной библиотеки трансгенов с разнообразием >12 000 молекул, а также биоинформатического инструментария для анализа этих трансгенов и методов визуализации данных такого анализа. Все это может быть востребовано для оценки процессов конкатемеризации. Из наиболее важных фундаментальных результатов работы стоит отметить следующие. В первую очередь, демонстрацию того, что система негомологичного соединения концов ДНК участвует в лигировании как минимум 10% инъецированных копий трансгена, которые затем служат в качестве матриц для гомологичной рекомбинации, но почти не встраиваются сами в конкатемер. Кроме того, автором показано, что как минимум 5% копий трансгена являются продуктами митотического кроссинговера при репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Важно также и то, что автором продемонстрировано отсутствие амплификации копий трансгена в конкатемере по механизму катящегося кольца.

Полученные результаты обсуждаются не только в ходе их представления, но и в виде отдельной главы «Обсуждение». Кроме того, что этот раздел просто приятно и интересно читать, хочу отметить демонстрируемый автором очень зрелый уровень дискуссии/текста.

В целом, диссертация написана очень логично и понятно. Все полученные данные оригинальны и, безусловно, будут интересны широкому кругу биологов. Обоснованность выводов, сделанных на основании полученных результатов, сомнений не вызывает. Автореферат полностью отражает существо работы. У меня нет сколь либо значимых замечаний ни к самой работе, ни к её представлению, которые стоило бы здесь привести. По теме диссертации автором опубликовано 8 научных статей, в том числе две – первым

автором. Основная часть представленных результатов была опубликована в журнале Nucleic Acids Research, что, само по себе, говорит о высоком экспериментальном уровне работы.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; 29.05.2017 г. № 650), а ее автор, Смирнов Александр Васильевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Генетика».

Официальный оппонент:

заместитель директора по научным вопросам,
заведующий лабораторией стабильности генома
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
доктор биологических наук (специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»)

Омар Леванович Кантидзе

О.К. 01.05.2021

Контактные данные:

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Сайт: www.genebiology.ru

Тел.: (499)135-97-87

E-mail: kantidze@gmail.com

