

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Смирнова Александра Васильевича
«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»

Актуальность темы диссертации

Генетическая модификация животных активно используется для самых разных целей — это создание животных-продуцентов для нужд биотехнологии и сельского хозяйства, получение моделей разнообразных патологий, проведение фундаментальных исследований. К настоящему моменту получены тысячи линий трансгенных мышей, однако изучению фундаментальных механизмов интеграции генетических конструкций при трансгенезе уделено недостаточно внимания. Актуальность диссертационной работы Александра Васильевича, таким образом, очевидна, так как его исследование направлено на восполнение пробелов в понимании биологии трансгенеза. Детальное изучение механизмов трансгенеза важно не только для формирования полноценной научной картины, но и может быть полезным для решения прикладных задач.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

В первую очередь перед Александром Васильевичем стояла задача создать и охарактеризовать баркодированную плазмидную библиотеку, пригодную для исследований механизмов рекомбинации ДНК на клетках и эмбрионах. Необходимо отметить, что подобная библиотека сама по себе является важным инструментом, который может быть использован в других научных работах.

Впервые Александром Васильевичем описан новый продукт рекомбинации трансгенной ДНК (elongation beyond original broken end, EBOBE), который может быть распространенным элементом конкатемеров, характерным для метода пронуклеарной микроинъекции. Это серьезное достижение в области фундаментальной молекулярной генетики. Впервые автором были применены

разнообразные методы молекулярного и биоинформатического анализа ДНК-баркодов в тандемно-повторенных последовательностях трансгенов.

Александром Васильевичем также впервые было использовано секвенирование на платформе PacBio для анализа ДНК-баркодов в геномной ДНК. Автор демонстрирует, что данный метод позволяет детектировать “идеальные” палиндромные слияния трансгенов.

Таким образом, новизна проведённых Александром Васильевичем исследований очевидна.

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

Для того чтобы решить поставленные задачи Александр Васильевич задействовал наиболее подходящие и современные методы. Им была сконструирована библиотека баркодированной ДНК с представительностью более 10^4 , которая затем была использована для проведения микроинъекций. После этого автором была исследована структура локусов ДНК эмбрионов, в которые интегрировался трансген. Для этого автор использовал цифровой капельный ПЦР, секвенирование на платформах Illumina и PacBio и соответствующую обработку данных. Использование автором нескольких экспериментальных подходов позволяет уверенно утверждать, что полученные Александром Васильевичем данные достоверны, а сделанные выводы обоснованы.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Понимание механизмов интеграции ДНК при создании трансгенных животных крайне важно для правильного дизайна экспериментов, а также для повышения эффективности сложных модификаций. Александр Васильевич впервые доказал, что формирование конкатемеров в пронуклеарной микроинъекции происходит за счёт гомологичной рекомбинации между концами линейных молекул трансгенов. С учётом этого автор делает обоснованное заключение, что использование перекрывающихся длинных одоцепочечных фрагментов может стимулировать сборку составных двухцепочечных конструкций за счет

гомологичной рекомбинации. Использование такого подхода может быть востребованным для точной интеграции протяженных ДНК кассет. Также Александр Васильевич по результатам своей работы может рекомендовать временно блокировать активность негомологичной рекомбинации совместно с добавлением в ядро циклических копий трансгена для увеличения копийности трансгена. Таким образом, проведённые Александром Васильевичем фундаментальные исследования открывают новые перспективы и для разнообразных практических работ.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Александром Васильевичем результаты представляют значительную ценность как для фундаментальной биологии, так и для биотехнологии. Например, понимание механизмов формирования конкатемеров позволяет сдвигать равновесие в сторону интеграции множественных повторов трансгена, что может быть крайне востребовано для создания генетически модифицированных животных с высоким уровнем продукции целевого белка.

Оценивая содержание диссертации в целом, в первую очередь нужно отметить прекрасный научный язык Александра Васильевича. Диссертация построена по классической схеме, во введении Александр Васильевич излагает суть научной проблемы и ставит задачи, которые необходимо решить. Обширный и хорошо иллюстрированный обзор литературы содержит имеющиеся сведения о механизмах формирования конкатемеров при пронуклеарной микроинъекции, а также обзоре современных методов секвенирования встроок конкатемеров. Раздел «материалы и методы» содержит детальное описание всех экспериментальных процедур, а также последовательности олигонуклеотидов. Раздел «результаты» содержит подробное изложение полученных результатов. Необходимо отметить, что хорошие схемы помогают понять непростые данные, полученные автором. Александр Васильевич убедительно доказывает, что негомологичное соединение концов участвует в лигировании как минимум 10%

инъецированных копий, которые служат в качестве матриц для гомологичной рекомбинации, но почти не встраиваются в конкатемерный фрагмент. Как минимум 5% копий являются продуктами митотического кроссинговера при репарации DSBR, что говорит о высокой частоте этого процесса в зиготе. Автор обнаружил, что конкатемеризация введенных в пронуклеус молекул ДНК происходит через гомологичную рекомбинацию исходных концов молекул по механизмам SDSA и DSBR. При этом, вопреки сделанным другими исследователями предположениям, амплификации копий в конкатемере по механизму катящегося кольца не происходит.

Большую ценность представляет раздел «обсуждение», в котором Александр Васильевич глубоко анализирует полученные данные и сопоставляет их с результатами других исследований.

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

Замечаний к диссертационной работе нет.

Заключение

Считаю, что диссертация Смирнова Александра Васильевича «Исследование механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом пронуклеарной микроинъекции» 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 Смирнова Александра Васильевича «Исследование механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом пронуклеарной микроинъекции», 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 – Смирнов Александр Васильевич - 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: *skulemzin*
Учёный секретарь: *Хуснерова А.Г.*
«09» марта 2021 г.