



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



Федеральное государственное бюджетное учреждение
Институт молекулярной генетики
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» – ИМГ)

пл. Академика Курчатова, д. 2, Москва, 123182
Тел.: (499) 196-00-00, факс: (499) 196-02-21
E-mail: img@img.ras.ru, www.img.ras.ru
ОКПО 04683332, ОГРН 1027739480955
ИНН/КПП 7734021670/773401001

№ _____
На № _____

УТВЕРЖДАЮ
Директор
государственного
учреждения
исследовательского
«Курчатовский институт», член-
корреспондент РАН

Федерального
бюджетного
Института молекулярной
Национального
центра
институт», член-
корреспондент РАН
С. В. Костров
2021 года

«05»

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **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

Диссертационная работа Смирнова А.В. посвящена изучению механизмов генетических перестроек, происходящих при встройке трансгенных конструкций в геном эукариот, на модели трансгенных мышей, получаемых методом пронуклеарной микроинъекции. Огромная актуальность разработки высокоэффективных подходов к получению трансгенных организмов, которые несут четко определенные и контролируемые изменения в геноме, на сегодня не вызывает сомнений ни у кого из ученых. Трансгенные организмы на протяжении последних десятилетий активно используются в научных исследованиях и являются совершенно необходимыми для понимания функций генов и регуляторных систем эукариот. Кроме того, с использованием этих подходов получены многие генетические модели различных заболеваний, созданы уникальные продуценты

биологически активных соединений, организмы с полезными свойствами, новые продукты и т.д. Так как исследуемый в работе экспериментальный подход является классическим в работах по трансгенезу, понимание молекулярных и генетических механизмов процессов встройки трансгена в геном совершенно необходимо как для интерпретации получаемых экспериментальных данных (особенно если речь идет о фенотипе трансгенных животных), так и для увеличения эффективности и точности создания трансгенных организмов. Представленная на соискание ученой степени работа является по настоящему пионерской в этой области. С использованием методов баркодирования и секвенирования нового поколения автору удалось впервые пролить свет на механизмы рекомбинации, конкатемеризации и перестроек трансгенов при их встройке в геном. Полученные в работе результаты могут служить основой как для дальнейших фундаментальных исследований в этом направлении, так и для создания новых подходов к точечной и контролируемой генетической инженерии эукариотических организмов.

Диссертация Смирнова А.В. изложена на 117 страницах и включает в себя следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и Список литературы, содержащий 182 ссылки, и семь Приложений. Работа содержит 27 рисунков в основном тексте диссертации и дополнительные рисунки в приложениях. Ниже кратко рассмотрены основные разделы работы и приведены некоторые замечания по отдельным разделам.

Обзор литературы посвящен описанию метода получения трансгенных животных с помощью пронуклеарной микроинъекции фрагментов ДНК, содержащих трансгены, и особенностей встройки трансгенов в геном при использовании этого метода. В обзоре подробно описан феномен конкатемеризации трансгенов, история исследования этого вопроса, предполагаемые механизмы конкатемеризации, приводящие к преимущественной встройке в геном фрагментов ДНК в ориентации «голова к хвосту», и возможная роль различных систем репарации разрывов в ДНК в данном процессе. Кроме того, рассматриваются существующие в настоящее время методы секвенирования, которые можно использовать для анализа геномных встроек трансгенов. В целом, этот раздел полностью выполняет свою функцию и знакомит читателя с проблематикой получения трансгенных животных, со спектром используемых методов и предполагаемой функцией систем репарации и рекомбинации ДНК во встройке трансгенов.

В разделе Методы и Материалы подробно описаны использованные в работе методы и подходы для получения и анализа трансгенных животных с использованием библиотек баркодированных трансгенов. В разделе описан каждый из этапов данного подхода, начиная от получения библиотеки трансгенов и микроинъекции в пронуклеусы, до генотипирования эмбрионов, получения и секвенирования библиотек баркодов и длинных геномных встроок трансгенов и анализа данных. Спектр примененных подходов полностью соответствует целям и задачам исследования, причем успех работы зависел именно от работоспособности разработанных и примененных автором методов, что, несомненно, является его большой заслугой. Некоторый недостаток этого раздела заключается в том, что некоторые этапы описаны слишком кратко, просто со ссылкой на опубликованные статьи (см. замечания ниже). С учетом рекомендуемых ссылок использованные методы описаны достаточно подробно и при необходимости могут быть воспроизведены другими исследователями.

В разделах Результаты и Обсуждение детально описаны выполненные автором эксперименты, приведен их подробный анализ и представлена наиболее вероятная интерпретация. Очень четкое и ясное изложение этих разделов является несомненной заслугой автора, особенно с учетом того, насколько сложной оказалась картина рекомбинации между индивидуальными копиями трансгенов. Следует отметить следующие наиболее важные результаты, полученные в работе.

- 1) Автором разработан новый метод, позволяющий следить за судьбой отдельных копий трансгенов в геноме, основанный на их баркодировании. Кроме секвенирования нескольких типов библиотек последовательностей, полученных путем избирательной амплификации баркодов в составе каждого трансгена, а также в местах стыков трансгенов, в работе использованы методы секвенирования индивидуальных молекул ДНК третьего поколения, что позволило установить структуру протяженных участков конкатемеров инъецированных конструкций в геноме трансгенных эмбрионов. Надо отдельно подчеркнуть, что кроме проведения собственно эксперимента по получению трансгенных животных и секвенирования, автору потребовалось разработать достаточно сложные подходы к анализу полученных данных, что связано с очень интенсивной рекомбинацией отдельных баркодированных копий. Данный метод и его модификации могут найти

применение в многочисленных дальнейших исследованиях судьбы повторяющихся генетических элементов в геноме.

- 2) В работе впервые получены четкие данные, указывающие на вероятный механизм рекомбинации между отдельными копиями трансгенов, приводящий к их мультимеризации при встройке в геном. Показано, что в ходе этого процесса происходит негомологичное соединение отдельных копий (с возможной циклизацией некоторых из них), после чего начинается массивная рекомбинация их друг с другом, приводящая к обмену фрагментами копий, их разнообразным перестройкам и встройке в геном по участкам микрогомологии. В связи с очень активной рекомбинацией, далеко не всегда удается проследить судьбу отдельных копий и определить структуру конкатемера – тем не менее, полученные данные открывают принципиально новые возможности для дальнейших исследований геномных перестроек, происходящих при рекомбинации повторяющихся элементов.
- 3) Показано, что встройки трансгенов в геном часто сопровождаются изменениями в структуре кодирующих участков генома. Стоит отметить, что такие перестройки могут значительно влиять на фенотип получаемых данным методом трансгенных животных и значительно затруднять интерпретацию данных при исследовании функций генов. Очевидно, что полученные данные указывают на необходимость тщательного анализа места встройки трансгена при дальнейших исследованиях.

Диссертация обладает несомненной оригинальностью и имеет как большую фундаментальную, так и практическую значимость. Необходимо отметить, что несмотря на очень большую сложность полученных массивов данных, что объясняется многочисленными рекомбинационными событиями и перестройками трансгенов, автору удалось представить максимально четкую интерпретацию результатов (насколько это возможно при столь разветвленной рекомбинации) и очень внятно объяснить наблюдаемые паттерны рекомбинации в тексте диссертации. После описания результатов проведено очень подробное и содержательное обсуждение полученных данных, детально рассмотрены возможные модели рекомбинации и приведены хорошо продуманные аргументы за и против каждой из них. Как использованные подходы, так и полученные результаты проиллюстрированы

четкими схемами, объясняющими наблюдаемые картины комбинаций баркодов, использованных для детекции трансгенов. Необходимо подчеркнуть, что, кроме собственно перестроек конкретных генетических конструкций, полученные данные показывают, какие в целом механизмы гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов действуют в зиготе и на ранних стадиях эмбрионального развития, и позволяют оценить их особенности и вклад в общую картину генетических перестроек. В частности, автором открыт механизм удлинения и соединения концов ДНК (названный EBOBE), который является комбинацией механизмов гомологичной рекомбинации и негомологичного (или микрогомологичного) соединения концов в клеточной ДНК. Очевидно, что разработанные подходы могут быть использованы в дальнейшем для более детального исследования механизмов перестроек частично гомологичных и повторяющихся участков ДНК, в том числе, при использовании дополнительных баркодов, как предлагает автор. Правда, при этом необходимо учитывать, что интерпретация данных, полученных с несколькими баркодами, может оказаться еще более сложной, чем в данной работе.

В целом, диссертация прекрасно оформлена и проиллюстрирована, написана хорошим и понятным языком и, кажется, полностью лишена ошибок и опечаток (не считая использования в одном-двух местах англицизмов: плот, гайдовые РНК). Замечания к диссертации носят в основном уточняющий характер и касаются интерпретации данных и описания использованных подходов к исследованию трансгенов.

- 1) Проведенный анализ тандемных копий трансгенов методами секвенирования библиотек баркодов не учитывал возможную палиндромную ориентацию трансгенов, «голова к голове» или «хвост к хвосту». Вместе с тем, оценить количество таких событий (которые должны происходить за счет негомологичного соединения концов) было бы интересно. Некоторая оценка получена при использовании методов секвенирования третьего поколения, причем показано, что такие события являются не такими уж и редкими. Можно ли, исходя из наблюдаемой частоты таких ориентаций (8 событий на 56 копий трансгена, с. 62), сделать вывод о примерно случайном соединении концов (во всех возможных ориентациях) на начальных этапах рекомбинации, после чего происходит преимущественное увеличение числа копий «голова к хвосту» уже за счет гомологичной рекомбинации? Еще один вопрос касается возможной детекции таких

копий при анализе ПЦР-библиотек баркодов. Хотя использованные пары праймеров не должны узнавать палиндромные слияния, лишь одного из этих праймеров в принципе должно быть достаточно для амплификации таких участков (это будет один либо другой праймер, смотрящий навстречу второй копии, в зависимости от типа слияния, голова к голове или хвост к хвосту). Можно ли в полученных библиотеках последовательностей детектировать пары однотипных баркодов («зеленый» или «серый»), ориентированные навстречу друг другу? Если да, то можно ли оценить их частоту относительно общего числа слияний?

- 2) Интересный вопрос касается копийности трансгенов и мозаицизма эмбрионов. Очевидно, что в тех случаях, когда копийность меньше 1, речь почти наверняка идет о мозаицизме (хотя тут еще возможны ошибки метода и недооценка числа копий). А можно ли говорить о том, что и при большом числе копий эмбрионы могут являться мозаичными, так что в некоторых их клетках или частях трансгенов нет вовсе, а в других находятся разные варианты тандемов? Например, на схеме эмбриона 9 (Рис. 16) видно несколько не связанных между собой цепочек трансгенов. Возможно, отсутствие узлов связано с делециями или палиндромной ориентацией копий, – но могут ли эти цепочки соответствовать разным частям эмбриона с разной структурой встройки? Не проводились ли в ходе работы попытки напрямую визуализировать возможную мозаичность эмбрионов (например, какими-то методами гибридизации *in situ* или по флуоресценции трансгена)?
- 3) Методы получения библиотек разных типов для секвенирования баркодов стоило бы описать чуть более подробно (в нескольких случаях читателя отсылают к опубликованной статье в *Nucleic Acids Research*, но было бы лучше представить эти данные и в самой диссертации). В частности, достаточно сложно разобраться, для чего конкретно использовали те или иные комбинации праймеров, показанных на рис. 10 и приведенных в Приложении 1 (текст на стр. 46). Почему некоторые из праймеров представлены несколькими разными последовательностями (например, праймер 2а, 2в, 2с и т.д.)? Анализ данных секвенирования второго поколения также стоило бы описать подробнее непосредственно в тексте диссертации, не ограничиваясь ссылкой на статью (стр. 51). При описании получения библиотеки исходных комбинаций баркодов допущена неясность: в тексте написано, что

фрагменты ДНК вырезали из плазмиды по сайтам рестрикции (стр. 47), а на схеме на Рис. 15 на стр. 58 под плазидами показана пара праймеров, которые, по-видимому, использовали для ПЦР-амплификации. При описании получения генетических конструкций на стр. 44 стоило бы привести схему с расположением сайтов эндонуклеаз рестрикции (PciI, SbfI, NheI), иначе детали того, что именно происходило с фрагментами ДНК, остаются непонятны.

- 4) Небольшое замечание касается цитирования в тексте рисунков: в нескольких случаях рисунок впервые упоминается за несколько страниц до его появления (например, ссылка на Рис. 8 на стр. 38, а сам он на стр. 42).
- 5) Небольшое уточнение: ДНК-полимеразы δ и ϵ , которые участвуют в синтезе ДНК при рекомбинации, не являются специализированными (стр. 34 в Обзоре литературы) – это репликативные ДНК-полимеразы.

Необходимо сказать, что перечисленные выше вопросы и замечания ничуть не снижают высокой оценки работы. Результаты диссертационной работы Смирнова А.В. опубликованы в четырех статьях в международных рецензируемых журналах, включенных в базу Web of Science: одна статья в Nucleic Acids Research с первым авторством и три статьи в Transgenic Research (одна из них также с первым авторством). Автореферат диссертации полностью отражает содержание и выводы работы.

В целом, диссертационная работа Смирнова А.В., представленная на соискание ученой степени кандидата наук, полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в «Положении о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ (утверждено постановлением правительства РФ №842 от 24 сентября 2013), и является научно-квалификационной работой, в которой разработан новый метод анализа повторяющихся баркодированных элементов в геноме и с его помощью изучен механизм перестроек трансгенов в зиготе. Автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Смирнова А.В. «Исследование механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом пронуклеарной микроинъекции» составлен зав. Лабораторией молекулярной

генетики микроорганизмов д.б.н. А.В. Кульбачинским. Отзыв рассмотрен, обсужден и утвержден на совместном научном семинаре Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов и Лаборатории биологии РНК и эпигенетики Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» 03 марта 2021 года.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Адрес: 123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

Телефон: +7-499-196-00-00, +7-499-196-00-06

Адрес электронной почты: img@img.ras.ru

Веб-сайт: <https://img.ras.ru/ru>


Заведующий Лабораторией молекулярной
генетики микроорганизмов
доктор биологических наук



Кульбачинский Андрей Владимирович

Подпись Кульбачинского А.В. удостоверяю

Ученый секретарь
НИЦ «Курчатовский институт» ИМГ
кандидат биологических наук



Андреева Людмила Евгеньевна