

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 24 марта 2021 г. протокол №3

О присуждении Смирнову Александру Васильевичу
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Смирнова А.В. «Исследование механизмов, обеспечивающих интеграцию генетических конструкций при получении трансгенных мышей методом пронуклеарной микроинъекции» по специальности 03.02.07 – генетика, принята к защите 25.12.2020г, протокол № 27, 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 утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Смирнов Александр Васильевич, 1989 года рождения. В 2011 году окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск.

С 10.10.2011 г. по 09.07.2015г. обучался в очной аспирантуре ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, в настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный

исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Баттулин Нариман Рашитович** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Кантидзе Омар Леванович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией стабильности генома ФГБУН Института биологии гена РАН, г. Москва.
2. **Кулемзин Сергей Викторович** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Москва. В своём положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Института молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», доктором биологических наук А.В. Кульбачинским и утверждённом чл.-корр. РАН, д.х.н., директором Федерального государственного бюджетного учреждения Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Костровым С.В., указало, что «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 года), 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 рассмотрен, обсужден и утвержден на совместном научном семинаре Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов и Лаборатории биологии РНК и эпигенетики ФГБУН Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» 03.03.2021г.».

Соискатель имеет 8 публикаций, из них 4 – по теме диссертации, общим объемом 57 страниц. Все статьи опубликованы в научных рецензируемых изданиях (Scopus, WoS).

Основные публикации по теме диссертации:

1. Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote // Nucleic Acids Res. - 2020. - Vol. 48, № 2. - P. 719-735. (IF: 11.501, WOS, SCOPUS)
2. Smirnov A.V., Kontsevaya G.V., Feofanova N.A., Anisimova M.V., Serova I.A., Gerlinskaya L.A., Battulin N.R., Moshkin M.P., Serov O.L. Unexpected phenotypic effects of a transgene integration causing a knockout of the endogenous Contactin-5 gene in mice // Transgenic Res. - 2018. - Vol. 27, № 1. - P. 1-13. (IF: 2.197, WOS, SCOPUS)

3. Burkov I.A., Serova I.A., Battulin N.R., Smirnov A.V., Babkin I.V., Andreeva L.E., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice // Transgenic Res. - 2013. - Vol. 22, № 5. - P. 949-964. (IF: 2.197, WOS, SCOPUS)

4. Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Dias L.P., Battulin N.R., Smirnov A.V., Serov O.L. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice // Transgenic Res. - 2012. - Vol. 21, № 3. - P. 485-498. (IF: 2.197, WOS, SCOPUS)

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов, все положительные.
Отзывы прислали:

1. Юшкова Е.А. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геропротекторных и радиопротекторных технологий Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН (г. Сыктывкар).

2. Смирнихина С.А. – к.м.н., заведующая лабораторией редактирования генома ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (г. Москва).

3. Леонова Е.И. – к.б.н., директор Центра трансгенеза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (г. Санкт-Петербург).

4. Жарков Д.О. – член-корреспондент РАН, д.б.н., заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии ФГБУН Института

химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск).

5. Пиндюрин А.В. – к.б.н., заведующий лабораторией клеточного деления Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН (г. Новосибирск).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оба оппонента являются компетентными специалистами в области молекулярной биологии и генетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Университетов в нашей стране по изучению молекулярной биологии и генетики.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказана перспективность использования векторной ДНК, маркированной уникальными последовательностями (баркодами), для изучения механизмов встраивания гетерологичной ДНК в геном трансгенных животных, полученных с помощью микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы мышей.

Доказано, что характерное для трансгенных животных встраивание в геном гетерологичной ДНК в виде однонаправленных повторов, копии которых ориентированы в направлении «голова к хвосту» (конкатемеров), происходит за счет рекомбинации между концами индивидуальных молекул, а не через амплификацию циклической копии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые с использованием метода баркодирования ДНК изучен механизм встраивания векторной ДНК в геном трансгенных животных, полученных с помощью пронуклеарной микроинъекции. **Показано,** что при микроинъекции гетерологичной ДНК в зиготу мышей возникают конкатемеры, образование которых происходит благодаря взаимодействию линейных концов трансгенов

друг с другом по механизму гомологичной рекомбинации. **Показано**, что в конкатемере помимо однонаправленных повторов присутствуют палиндромные слияния копий векторной ДНК, которые можно обнаружить методами секвенирования третьего поколения, но не стандартным ПЦР-методом.

Показано, что метод баркодирования конкатемеров позволяет также обнаружить и подсчитать такие случаи рекомбинации гетерологичной ДНК в геном зиготы, которые сопровождаются удлинением концов молекул (elongation beyond original broken end, EBOBE), локальной амплификацией ДНК и митотическим кроссинговером.

Изучена структура границ в местах встраивания гетерологичной ДНК в геномах 11 линий мышей. **Показано**, что интеграция конкатемеров в геном происходит в основном через микрогомологичное соединение концов ДНК. Средний размер участка микрогомологии составляет ~3 нуклеотида.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработана технология создания баркодированных плазмидных библиотек и разработан протокол для их анализа после пронуклеарной микроинъекции в эмбрионы млекопитающих.

Создана баркодированная плазмидная библиотека с разнообразием 12.7 тыс. молекул, которую можно использовать для изучения механизмов репарации ДНК при интеграции трансгена в геном, введенного в эмбрион с помощью пронуклеарной микроинъекции.

Разработанные технологии могут быть также использованы в научно-исследовательских учреждениях биологического, сельскохозяйственного и медицинского направлений, применяющих системы целевого геномного редактирования для получения ген-модифицированных организмов и клеток различного назначения, для поисков путей ингибирования конкатемеризации в CRISPR/Cas экспериментах и улучшения эффективности и надежности сайт-специфичного трансгенеза в клетках млекопитающих.

Полученные теоретические знания могут быть использованы в образовательном процессе при подготовке специалистов в области молекулярной биологии и геной инженерии. Результаты диссертационной работы используются при чтении курса лекций «Стволовые клетки» на кафедре цитологии и генетики факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы современные методы молекулярной биологии, генетической инженерии и биоинформатики, включая технологию микроинъекций ДНК в пронуклеусы зигот мышей, метод клонирования плазмидных библиотек и инвертированный ПЦР. Для установления структуры границ в местах встраивания конкатемеров использован метод термального асимметричного ПЦР (TAIL-ПЦР) и секвенирование по Сэнгеру. Для высокопроцессивного анализа структуры конкатемеров и поиска баркодов применены методы секвенирования следующего поколения (next-generation sequencing, NGS) и одномолекулярного секвенирования третьего поколения (PacBio single molecule real-time sequencing, SMRT). Оценку копийности конкатемеров проводили методом цифровой ПЦР с зондами на гены *Emid1* и *Clover*, а также по числу уникальных баркодов в данных NGS. Для анализа встроек конкатемеров у животных использовали электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле. Данные обработаны стандартными методами статистического анализа.

Оценка достоверности результатов исследования показала, что в работе использован широкий спектр современных молекулярных методов анализа последовательностей ДНК (NGS, PacBio SMRT, TAIL-ПЦР, лонг-дистанс ПЦР, цифровой ПЦР), позволивших в независимых экспериментах подтвердить достоверность результатов трансгеноза и выводов о механизмах интеграции ДНК-баркодов в геном эмбриона мыши.

При обсуждении результатов анализа конкатемеров учитывались данные,

полученные ранее по рассматриваемой тематике. Совокупные результаты поддерживают гипотезу конкатемеризации трансгенной ДНК через рекомбинацию линейаризованных концов молекул. Данные получены на сертифицированном оборудовании для технологий микроинъекций в зиготы мышей, NGS, цифровой ПЦР, полногеномного секвенирования PacBio SMRT, и доступны для других исследователей. Достоверность данных подтверждена статистической обработкой.

Личный вклад автора заключается в дизайне и клонировании баркодированных генетических конструкций, подготовке баркодированной библиотеки для микроинъекции, анализе генетически-модифицированных мышей методами ПЦР, ТАИЛ-ПЦР и цифровой ПЦР, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Пронуклеарные микроинъекции для получения трансгенных эмбрионов проведены А.Н. Кораблевым и к.б.н. И.А. Серовой. Клонирование и анализ баркодированной плазмидной библиотеки методом NGS проведены совместно с к.б.н. А.М. Юнусовой. Секвенирование генома одного из эмбрионов методом PacBio SMRT проведено коммерческой компанией Novogene (Гонконг). Биоинформационная обработка данных NGS проведена к.б.н. В.С. Фишманом. Анализ данных NGS и PacBio SMRT проведен совместно с к.б.н. Н.Р. Баттулиным.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п.3. «Процессы репликации, рекомбинации, репарации», п.10. «Генетическая и клеточная инженерия. Трансгенные организмы» и п.11 «Генетические основы биотехнологии» паспорта специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация

представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 24 марта 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Смирнову Александру Васильевичу учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 8 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Зам.Председателя
диссертационного совета,
член-корр. РАН



А.В. Кочетов

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

24.03.2021 г