

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Немудрого Артем Александровича** на тему **«Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии *Brattleboro in vitro*»,** представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.07 – генетика».

Появление принципиально новых технологий, позволяющих манипулировать с генами и их фрагментами, обеспечивающими адресную доставку новых блоков генетической информации в заданные участки генома, совершило революцию в медицине. Исправление генных мутаций в клетках культивируемых *in vitro* является актуальной задачей, решение которой позволяет использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки с исправленными генами для заместительной терапии. Сегодня, благодаря появлению системы CRISPR/Cas, стало возможным эффективное внесение модификаций в геном плюрипотентных стволовых клеток. В связи с этим в настоящее время в программах по генной терапии большое внимание уделяется экспериментам на искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных. Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии является важной предпосылкой для дальнейших клинических испытаний.

Работа Немудрого А.А. направлена на исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс с помощью новейших технологий редактирования генома. В качестве модели для изучения возможности терапии наследственных заболеваний с помощью редактирования геномов *ex vivo* была использована лабораторная линия крыс *Brattleboro*. Крысы линии *Brattleboro* являются гомозиготными носителями мутантного аллеля *di* гена аргинин-вазопрессина. У гомозиготных носителей мутация вызывает наследственную форму несахарного гипоталамического диабета. Была **поставлена цель** – создать систему для гомологичной рекомбинации в локусе гена аргинин-вазопрессина и получить клетки крыс с исправленной мутацией в данном гене.

Для достижения указанной цели автором работы были поставлены **конкретные задачи**: 1. Создать набор генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9, для внесения двунитевых разрывов в различные участки локуса гена аргинин-вазопрессина крыс линии *Brattleboro*; 2. Провести качественный анализ активности системы CRISPR/Cas9 в целевых сайтах гена аргинин-вазопрессина эмбриональных фибробластов крыс *Brattleboro*; 3. Провести анализ нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина и определить с помощью биоинформатических методов потенциальные сайты нецелевого действия CRISPR/Cas9 в геноме; 4. Определить эффективность направленного внесения двунитевых разрывов в выбранном сайте гена аргинин-

вазопрессина и спектр модификаций, возникающих при репарации данных разрывов, в эмбриональных фибробластах крыс линии *Brattleboro*; 5.С помощью гомологичной рекомбинации произвести исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина эмбриональных фибробластов крыс линии *Brattleboro*.

Для реализации поставленных задач были использованы самые современные методы и подходы молекулярной генетики, которые в настоящее время широко используются во многих ведущих лабораториях мира для выполнения такого рода исследований. Так, например, для исправления мутации в гене *Avr* с помощью методов молекулярного клонирования был сконструирован плазмидный вектор p*Avr-target8*, содержащий два участка гомологичных целевому гену. Для этого в качестве основы был использован вектор p079 pPNT6, содержащий два гена, необходимые для позитивно-негативной селекции: ген устойчивости к антибиотику неомицину (*NeoR*), и ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSV-TK1*). Гомологичные сайты при рекомбинации были получены путем амплификации участков гена *Avr* с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК крыс контрольной линии *WAG*, которые были гомозиготными по аллелю *Avr* дикого типа. Амплифицированные участки были клонированы в вектор p079 pPNT6. В полученном векторе плечи гомологии фланкируют *NeoR* - ген устойчивости к неомицину и при гомологичной рекомбинации этот ген встраивается в локус *Avr*, который был выбран для анализа. Целевые клетки далее отбираются простым добавлением в среду антибиотика неомицина. Поскольку второй ген выбранный для анализа, ген тимидинкиназы *HSV-TK1*, расположен за пределами донорного участка, он при гомологичной рекомбинации не попадает в геном.

В результате проведенных молекулярно-генетических исследований автором рецензируемой работы была создана система для проведения гомологичной рекомбинации в локусе гена аргинина-вазопрессина, состоящая из набора генетических конструкций, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9, и донорной генетической конструкции. Разработана стратегия, позволяющая эффективно вносить двуцепочечные разрывы во второй экзон гена аргинин-вазопрессина, не оказывая нецелевого эффекта в паралогичном гене окситоцина. В результате позитивно-негативной селекции фибробластов крыс линии *Brattleboro*, трансфецированных смесью донорных плазмид и CRISPR/Cas9, была получена клональная линия RNFF1_t2.2, в одном аллеле гена аргинин-вазопрессина которой произошла гомологичная рекомбинация, а во втором аллеле была восстановлена рамка считывания в результате инсерции аденина. Высказано предположение, что причиной сниженной эффективности процесса гомологичной рекомбинации является способность созданной системы CRISPR/Cas9 вносить разрывы в донорный вектор из-за присутствия в нем неканонического PAM SpCas9 –NAG.

Научные результаты и предложенные в диссертационной работе Немудрого А.А. подходы и стратегии могут быть применены в биомедицине при разработке технологий терапии наследственных заболеваний человека с помощью редактирования генома *ex vivo*. Разработанные автором стратегии выбора спейсеров CRISPR/Cas9 позволяют направленно вносить модификации в целевые мутантные копии генов, не затрагивая при этом копии дикого типа. Такой подход в будущем может быть использован при исправлении мутаций или, наоборот, внесении мутаций (для моделирования заболеваний *in vitro*) в геном гетерозигот по целевому гену, либо в случае, когда целевой ген входит в семейство генов с близкими последовательностями.

Результаты исследований, по теме диссертации представлены в 8 публикациях, опубликованных в научных журналах и трудах международных конференций. В публикациях полностью отражены материалы, включенные в диссертацию.

Работа является законченным научно-квалификационным исследованием, отличающимся новизной и имеющим практическую ценность. Диссертация Немудрого Артема Александровича «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro *in vitro*» соответствует требованиям п.9.абзац 2 «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Берсимбай Рахметкажи Искендиорович

академик НАН РК, доктор биологических наук, профессор

Заведующий кафедрой общей биологии и геномики, директор Института клеточной биологии и биотехнологии Евразийского национального университета им.Л.Н.Гумилева

Место работы: ЕНУ им.Л.Н.Гумилева, ул.К.Сатпаева, 2, Астана 010000, Казахстан

Тел: +7(717)2709451

Факс: +7(717) 2928775

E-mail: ribers@mail.ru

