

## ОТЗЫВ

**Официального оппонента на диссертационную работу Немудрого Артема Александровича «ИСПРАВЛЕНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА КРЫС ЛИНИИ BRATTLEBORO *IN VITRO*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.**

### **Актуальность темы диссертации**

Система редактирования геномов CRISPR/CAS9, основанная на системе «иммунной защиты» бактерий, была предложена как методический подход для редактирования геномов эукариот совсем недавно. Менее чем за 5 лет использования этой системы произошел настоящий прорыв в получении животных и клеточных модельных систем с заданным генотипом. Возможности системы очень велики – от исправления точечных мутаций до внесения или удаления достаточно протяженных участков ДНК, а также множественного редактирования. Уже достаточно широко используется возможность редактирования генома *in vivo*. Опубликованная в этом году работа лаборатории Ш.Миталипова, выполненная на бластоцистах, показала потенциальную возможность геномного редактирования на уровне всего организма человека. Тем не менее, остается много технических вопросов о механизмах и надежности функционирования системы CRISPR\CAS9 при ее применении в качестве метода редактирования генома. С другой стороны, интересных биологических моделей, для которых эта система будет нужна, как инструмент исследования, множество. Одной из таких моделей – крысам с несахарным диабетом с нарушением секреции гормона аргинин-вазопрессина и изучению возможности исправления этого нарушения посвящена работа Артема Александровича Немудрого.

### **Научная новизна диссертационного исследования**

Перед автором стояла не очень простая экспериментальная задача – исправить мутацию в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro, не вызывая при этом нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина. Автор опробовал методические подходы к решению подобного рода задачи. Впервые были

получены эмбриональные фибробласты крыс линии Brattleboro с исправленной мутацией в гене аргинин-вазопрессина. Эти фибробласты станут в дальнейшем источником материала для трансплантации крысам и отработки методик клеточной терапии наследственных заболеваний.

### **Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК**

Диссертационная работа А.А. Немудрого построена по классической схеме, изложена на 104 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 26 рисунков и 12 таблиц. Список литературы содержит 119 источников.

Во введении автором обосновывается актуальность проводимого диссертационного исследования, четко формулируется цель и задачи, приводится общая характеристика работы.

Первая глава диссертационной работы представляет собой анализ зарубежной научной литературы, отражающий современные достижения и существующие проблемы в области применения системы CRISPR/CAS9 для редактирования геномов. В этой главе рассмотрено несколько важных тем – рассмотрен принцип организации системы CRISPR/Cas9 у бактерий и проблемы адаптации системы CRISPR/Cas9 для редактирования геномов эукариот. Обсуждены нецелевые эффекты системы CRISPR/Cas9. Обсуждаются современные концепции применения системы CRISPR/Cas для терапии наследственных заболеваний. В конце обзора литературы автор знакомит читателя с особенностями объекта своего исследования – крысами Brattleboro и генетическими причинами наследственного несахарного гипоталамического диабета у этих крыс. Обзор литературы иллюстрирован многочисленными рисунками, которые облегчают понимание текста.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» представлена подробная информация о материалах и методах исследований, дизайне

проводимых экспериментальных работ, используемых автором для достижения поставленной перед ним цели и задач. Следует особо отметить, что в диссертационном исследовании использовался спектр как классических, так и новых модификаций методов и подходов, что подчеркивает оригинальность работы автора. Методы, которые использовал автор, немногочисленны, но они из разных областей биологии – есть и методы молекулярной генетики, и методы клеточной биологии, и биоинформатики. Методы изложены достаточно подробно для их воспроизведения, видно, что автор квалифицированно этими методами владеет.

Глава «Результаты и их обсуждение» структурирована на разделы, в каждом из которых представлены результаты проведенных экспериментальных исследований и их детальный анализ.

Глава содержит достаточное количество иллюстративного материала, помогающего читателю оценить значимость проведенного диссертационного исследования и не усомниться в достоверности полученных результатов.

А.А. Немудрым подобраны гидовые и донорные последовательности, внесенные в генетические конструкции, при применении которых CRISPR/Cas9 направленно вносит модификации во второй экзон мутантного гена аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro, не вызывая при этом нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина.

При репарации двуцепочечного разрыва, направленно внесенного системой CRISPR/Cas9 в эмбриональных фибробластах крыс линии Brattleboro произошло исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина в результате гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором.

Следует отметить тщательный биоинформатический анализ возможных off-target эффектов выбранных гидовых последовательностей, который был осуществлен с помощью нескольких общедоступных поисковых программ.

Выводы, выдвигаемые автором, четко сформулированы, резюмируют полученные данные и полностью соответствуют поставленным задачам.

### Замечания и вопросы по диссертационной работе.

Основное замечание: Несмотря на то, что диссертация производит впечатление исследования, вполне соответствующего квалификационной работе на соискание степени кандидата биологических наук, тем не менее, в ней есть определенная незавершенность. Работа смотрелась бы более завершенной, если бы автор пошел чуть дальше и сделал и охарактеризовал ИПСК из фибробластов с исправленной мутацией. Есть еще несколько вопросов, по которым бы хотелось получить пояснения.

1. Не совсем понятно, почему автор работы пошел по пути редактирования генома фибробластов, а потом уже планирует получить из них ИПСК? Даже эмбриональные фибробласты обладают ограниченным пролиферативным потенциалом, и получить сначала ИПСК крыс, а потом их редактировать, было бы, как представляется, менее рискованной и более логичной задачей.
2. В обзоре литературы диссертант не останавливается подробно на том, есть ли другие животные модели, аналогичные или похожие на модель несахарного диабета крыс Brattleboro. Есть ли заболевания человека, для которых эти крысы могли бы служить адекватной животной моделью? Стоит отметить, что утверждение автора о том, что «Дальнейшее использование этих животных позволит моделировать клеточную терапию заболевания, связанного с нарушением в нейронах определенного типа – это такие заболевания, как болезнь Гентингтона (нейроны стриатума), болезнь Паркинсона (нейроны черной субстанции) и другие» - представляется не совсем обоснованным.
3. Было бы неплохо, если бы диссертант в своем обзоре литературы хотя бы раз сослался на работы своего коллектива, например, на книгу своего руководителя («Редактирование генов и геномов/ отв. редакторы С.М. Закиян, С.П. Медведев, Е.В. Дементьева, В.В. Власов)

Сделанные замечания не снижают общего хорошего впечатления от работы.

Всё это позволяет сделать заключение, что исследование Немудрого Артема Александровича по своей актуальности, новизне и значимости результатов, в которых содержится оригинальное решение актуальной научной задачи, удовлетворяет всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Немудрый Артем Александрович заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.02.07 генетика.

Член корр. РАН, д.б.н. по специальностям 03.02.07 - «генетика»,

03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»

 Лагарькова Мария Андреевна

20 октября 2017 г.

Заведующий лабораторией клеточной биологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Адрес: 119435, Москва, Малая Пироговская, д.1 а  
e-mail: [maryalag@yahoo.com](mailto:maryalag@yahoo.com) телефон: 8-916-220-67-85

Подпись Лагарьковой М.А. заверяю,

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

К.м.н. Васильева Л.Л.

