

ОТЗЫВ

А.В. Лаврова

на автореферат диссертации Немудрого Артема Александровича на тему: «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro *in vitro*» по специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертационное исследование Немудрого А.А. на тему «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro *in vitro*» посвящено актуальной проблеме – разработке подходов к геномному редактированию при наследственных заболеваниях.

Геномное редактирование в отличие от генной терапии подразумевает исправление собственного генетического кода организма, а не внесение дополнительного (чужеродного) материала. Большие надежды на геномное редактирование возлагают во многом после открытия бактериальной системы CRISPR/Cas, обеспечивающей довольно точное и относительно просто реализуемое на практике редактирование ДНК. Интерес к теме и количество работ лавинообразно нарастает последние 3-4 года. Несмотря на значительные успехи и многочисленные яркие работы, демонстрирующие возможности геномного редактирования, технологии на основе CRISPR/Cas9 пока далеки от практического – клинического – воплощения. Любой новый ген и новая мутация, за исправление которой берутся исследователи требует индивидуального подхода, разработки метода редактирования, оценки эффективности и специфичности вносимых изменений.

Целью диссертационного исследования автор избрал исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина в культуре клеток крыс линии Brattleboro. Данные крысы являются моделью наследственной формы несахарного гипоталамического диабета. И разработка метода исправления мутации является первым шагом к разработке эффективного метода лечения не только этого заболевания, но и любой другой наследственной болезни.

Исправление мутации требует создание целевого разрыва геномной ДНК в области мутации и последующей гомологичной рекомбинации с матрицей нормальной ДНК. Соответственно автором были обоснованно определены следующие задачи:

1. создание нескольких наборов генетических конструкций с элементами CRISPR/Cas9 для внесения разрывов в ДНК в локусе с мутацией и оценка сравнительной эффективности разных наборов, направленных на создание разрывов в разных местах локуса с мутацией;
2. анализ нецелевых эффектов CRISPR/Cas9 в особенности в паралогичном гене окситоцина;
3. исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина эмбриональных фибробластов крыс линии Brattleboro с помощью гомологичной рекомбинации.

Автором созданы генные конструкции для целевого внесения разрыва в гене аргинин-вазопрессина, позволяющие избежать нецелевого редактирования паралогичного гена окситоцина. Разработаны матрицы для гомологичной рекомбинации, позволяющие проводить как отрицательную, так и положительную селекцию успешно отредактированных клеток. Эффективность CRISPR/Cas9 оценивали с помощью общепринятого анализа расщепления гетеродуплексов T7E1 эндонуклеазой. Показана применимость различных подходов к выбору мишени для CRISPR/Cas9 – были обнаружены последствия негомологичного соединения концов после двуцепочечных разрывов в целевом гене и отсутствие разрывов в паралогичном нецелевом гене.

Гомологичная репарация также была проведена успешно, и получены отредактированные фибробласты крыс. Вместе с тем были продемонстрированы эффекты,

заставляющие с большой осторожностью подходить к методам терапии с помощью геномного редактирования. Так, были отмечены эффекты повторного редактирования уже отредактированного аллеля. Особенную сложность для практического применения представляют собой плохо прогнозируемые случаи редактирования по неканоническим последовательностям, пример которого продемонстрировал автор, обнаружив активность CRISPR/Cas9 в высокогомолочной области рядом с целевой последовательностью. Активность была обусловлена слабым, но тем не менее действующим PAM (NAG вместо классического NGG).

Результаты в автореферате представлены автором блестяще: работа выполнена на высоком методическом уровне, изложена прекрасным понятным языком и хорошо оформлена иллюстрациями.

Замечания к работе:

1. в названии желательно уточнить, что речь идёт о клетках, иначе оно вводит в заблуждение, что эксперименты проведены на животных;
2. в автореферате нет последовательностей праймеров или каких-либо указаний на их расположение, позволяющее разделять при анализе последовательности целевого гена и его паралога;
3. на стр. 7 имеется ссылка на табл. 12 и метод TIDE, описание которых отсутствует в автореферате, что затрудняет оценку соответствующих результатов

Данные замечания нисколько не касаются качества выполненной работы и её научной и практической значимости.

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 учёных степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Александр Вячеславович Лавров, к.м.н.,
Зав. лабораторией мутагенеза,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр»
115478, Москва, Москворечье, 1
avlavrov@yandex.ru
+7-499-324-3579

Подпись заверяю
Е.С. Воронина, к.м.н.,
Ученый секретарь,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр»

