

## О Т З Ы В

на автореферат диссертации Артема Александровича Немудрого «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.

Открытие и развитие технологий редактирование генома является одной из крупнейших разработок в области биотехнологий за последние годы. Метод редактирования генома CRISPR/Cas открывает принципиально новые возможности для модификации генома высших организмов. Одним из потенциальных применений данного метода является лечение наследственных заболеваний. Однако, несмотря на сделанные первые шаги в данной области (и др.), практическое применение метода для лечения/предупреждения наследственных заболеваний требует решения большого числа вопросов, как этического, так и технологического порядка. Решение этих вопросов, в свою очередь, требует детальных исследований на различных модельных системах, которые необходимы для освоения и развития технологии, решения специфических проблем (например, преодоления и изучения off-target эффектов), оценки безопасности метода.

Целью диссертации А.А. Немудрого является создание системы CRISPR/Cas9 для гомологичной рекомбинации в локусе гена аргинин-вазопрессина и получение клеток крыс линии Brattleboro с исправленной мутацией в данном гене. Линия крыс Brattleboro несет мутацию в гене аргинин-вазопрессина и является моделью моногенного заболевания аутосомно-рецессивного типа (несахарный диабет). Таким образом, диссертация посвящена разработке технологии CRISPR/Cas9 на конкретной модели и направлена на создание технологий терапии наследственных заболеваний человека, что, несомненно, является актуальным. Говоря об актуальности работы, следует также отметить, что в настоящее время основная масса работ в области геномного редактирования проводится за

рубежом, в России исследования в данной области проводятся в ограниченном количестве лабораторий, что, в свою очередь, повышает актуальность рассматриваемой диссертации.

Для решения поставленной цели, в диссертационном исследовании были поставлены и решены пять задач, включающих создание набора генетических конструкций для внесения двунитевых разрывов в различные участки гена аргинин-вазопрессина, анализ активности системы CRISPR/Cas9 в целевых сайтах гена и изучение нецелевых эффектов, определение эффективности двунитевых разрывов и использование созданной конструкции для исправления мутаций в гене аргинин-вазопрессина в клетках крыс Brattleboro.

В процессе достижения поставленной цели и выполнения сформулированных задач автором разработаны стратегии выбора спейсеров, позволяющие вносить модификации в мутантные целевые гены, не затрагивая гены дикого типа, впервые получены эмбриональные фибробласты крыс линии Brattleboro с исправленной мутацией в гене аргинин-вазопрессина, показано отсутствие нецелевых эффектов в паралогичном гене окситоцина. Работа выполнена с использованием широкого набора современных методов, включая методы получения и селекции клональных линий, методы ПЦР, рестрикционный анализ, биоинформационный анализ и другие.

Значимость полученных результатов определяется: а) развитием технологии CRISPR/Cas9 применительно к конкретной модели и конкретному гену; б) демонстрацией возможности модификации мутантного гена, ответственного за развитие моногенного заболевания; в) документированием отсутствия нецелевых эффектов при использовании разработанной технологии. Существенно, что полученные автором эмбриональные фибробласты с исправленной мутацией могут в дальнейшем



быть репрограммированы к плюрипотентному состоянию, что дает возможность проведения доклинических исследований *in vivo* и является важным этапом на пути к разработке методов терапии наследственных заболеваний.

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.

Лядова Ирина Владимировна,

докт. мед. наук

Зав. лабораторией биотехнологии

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,

Яузская аллея, 2, Москва, 107564

Эл. почта: ivlyadova@mail.ru

Тел. +7-499-785-9035

Подпись д.м.н. И.В. Лядовой ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ФГБНУ «ЦНИИТ»,

к.б.н. Г.С. Шепелькова

Дата 15.10.2017

