

Отзыв на диссертацию Немудрого Артема Александровича «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro *in vitro*», представляемую на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Работа Немудрого А.А. посвящена созданию системы для исправления мутации в гене аргинин-вазопрессина в культуре клеток крыс линии Brattleboro методом гомологичной рекомбинации. Постановка задачи представляется актуальной, поскольку выбранное направление исследований связано с генной терапией заболеваний, в основе которых лежат генетические нарушения. Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина было осуществлено с использованием метода CRISPR/Cas9. Биологические применения с использованием этой системы активно развиваются во всем мире и показывают хорошие результаты в исследовательских лабораториях. В представленной работе проведен подробный анализ побочных эффектов, возникновение которых можно ожидать при генной терапии. Выбранная система из двух паралогичных генов позволила продемонстрировать высокую специфичность примененного подхода, что весьма важно в исследованиях, результаты которых могут представлять интерес для медицины.

Во Введении автор аргументирует актуальность проблемы, ставит основные вопросы, формулирует цели и задачи исследования, отмечает новизну, теоретическую и практическую значимость и апробацию в виде докладов на конференциях. Список публикаций автора по теме диссертации содержит три статьи в научных журналах и тезисы пяти конференций.

Обзор литературы предоставляет информацию о системе CRISPR/Cas у бактерий, ее адаптацию для геномной инженерии у эукариот, а также известные сложности и ограничения, связанные с ее использованием. Этот раздел также содержит краткое описание индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и их возможные применения для терапии наследственных заболеваний. Также приводится описание использованной модельной системы. В целом, эта глава содержит основную информацию, достаточную для погружения в тематику диссертационной работы.

Раздел Материалы и методы содержит описание молекулярно-биологических методов, подходов для получения эмбриональных фибробластов и работы с ними, а также статистических и биоинформатических методов для анализа возможных неспецифических эффектов при использовании системы CRISPR/Cas9. Разнообразие использованных методов производит хорошее впечатление, поскольку говорит о разносторонности проведенного анализа, однако в ряде случаев хотелось бы видеть более развернутое описание подходов и лежащих в их основе принципов.

Глава Результаты и Обсуждение детально описывает постановку экспериментов для получения эмбриональных фибробластов линии Brattleboro с исправленной мутацией в гене аргинин-вазопрессина. Эти клетки планируется впоследствии использовать для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Используемая генетическая конструкция позволяла проводить как позитивную селекцию специфических событий встраивания, так и негативную селекцию неспецифических. Такой подход позволяет повышать долю клеток, содержащих целевую встройку, что было убедительно показано в эксперименте. Для представленной работы такая комбинация несет несомненные преимущества.

Раздел содержит описание проведенных тестов, направленных на оценку эффективности и специфичности разработанной системы. Проведенный анализ показал, что эффективность внесения двуцепочечных разрывов достаточно высока в случае гена аргинин-вазопрессина и исчезающе мала в случае паралогичного гена *Oxt*. Биоинформатический анализ также указывает на низкую вероятность неспецифических событий. Конечным результатом проведенной работы стало получение клона эмбриональных фибробластов линии крыс Brattleboro с исправленной мутацией в одном из аллелей гена аргинин-вазопрессина и с восстановленной рамкой считывания в другом. В работе констатируется относительно низкая эффективность гомологичной рекомбинации и обсуждаются возможные причины.

Итог работы сформулирован в конце диссертации в виде 5 выводов, которые отражают содержание работы. В конце рукописи присутствует список использованной литературы, содержащий 119 источников.

В целом представление материала позволяет сделать вывод о решающем вкладе автора в представляемую к защите работу. Содержательная часть проиллюстрирована рисунками и таблицами. Основные результаты опубликованы в статьях в научных журналах и представлены на конференциях. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

Важным достоинством работы является удачный выбор модельного объекта. Как упоминалось выше, в работе были проанализированы два паралогичных гена, в которых нуклеотидная последовательность в интересующем районе отличалась только мутацией, на исправление которой были направлены усилия исследователей. Проведенная работа показала, что даже в такой ситуации оказалось возможным подобрать конфигурацию, в которой CRISPR/Cas9 специфически воздействует именно на мутантную форму.

На мой взгляд, раздел Научная новизна написан чересчур пространно и недостаточно конкретен. Раздел, посвященный биоинформатическому анализу побочных эффектов, слишком велик и может быть существенно сокращен без потери информативности. В тексте обращает на себя внимание использование разговорных оборотов.

Несмотря на это, диссертационная работа Немудрого А.А. «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro *in vitro*», представляемая на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика соответствует критериям и требованиям, установленным п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор Немудрый Артем Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

к.б.н., зав. лабораторией геномики
ФГБУН Институт молекулярной и
клеточной биологии СО РАН



С.Н. Белякин

03.11.2017

пр-т ак. Лаврентьева 8/2, 630090 Новосибирск
Тел.: (383) 363-90-42
e-mail: belyakin@mcb.nsc.ru

