

Федеральное агентство научных  
организаций  
(ФАНО России)  
**Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки  
Институт биологии развития  
им. Н.К.Кольцова РАН  
(ИБР РАН)**  
ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334  
Тел. (499)135-33-22, Факс (499) 135-80-12  
E-mail: idb@idbras.ru  
http://idbras.comcor.ru  
ОКПО 02699062, ОГРН 1027700450800,  
ИНН 7736044850 / КПП 773601001

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор Федерального государственного  
Бюджетного учреждения науки  
Институт биологии развития  
им. Н.К. Кольцова  
Российской академии наук,  
доктор биологических наук,  
член-корреспондент РАН



\_\_\_\_\_  
А.В. Васильев

26.10.17 № 12506-01/548  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### ОТЗЫВ

Ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ФГБУН ИБР РАН) – 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.**

В настоящее время, в связи с бурным развитием технологий редактирования генома (в частности CRISPR/Cas9), становятся весьма актуальными исследования возможности применения данных технологий для лечения наследственных заболеваний, вызываемых разного рода мутациями. Так, например, одной из самых привлекательных стратегий является исправление мутации в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (полученных от носителя заболевания), которые в дальнейшем можно дифференцировать в клетки нужного типа ткани для последующих ауто-трансплантаций. Одним из самых естественных и необходимых этапов перед внедрением такого подхода в клинику является валидация его на модельной системе.

Цель работы Артема Александровича Немудрого заключалась в исследовании возможности применения системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для исправления мутации в гене аргинин-вазопрессина в клетках крыс линии Brattleboro, вызывающей наследственную форму несахарного гипоталамического диабета.

Для достижения этой цели, были поставлены задачи по получению набора генетических конструкторов, экспрессирующих необходимые элементы CRISPR/Cas9, проанализировать их эффективность и нецелевую активность и получить линии эмбриональных фибробластов крыс этой линии с исправленной мутацией. Решались и другие актуальные и значимые задачи.

### **Структура и содержание работы.**

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 26 рисунков и 11 таблиц.

Во введении автор описывает актуальность работы, а также цели и поставленные задачи.

В главе «Обзор литературы», занимающей 38 страниц, обсуждены несколько научных областей, затрагивающих тему диссертации. Так, например, достаточно подробно разобрана система редактирования генома на основе CRISPR/Cas, описаны перспективы использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для терапии наследственных заболеваний, а также возможность использования крыс линии Brattleboro как модельного объекта при разработке стратегии лечения наследственных заболеваний. В целом обзор литературы содержит всю необходимую информацию для осмысления и оценки полученных в диссертации результатов.

Глава «Материалы и методы» позволяет охарактеризовать Артема Александровича Немудрого как полноценного специалиста в области современной молекулярной биологии. К недостаткам написания раздела все же следует отнести местами слишком сокращенный стиль описания некоторых методов, ограничивающийся стандартной фразой «согласно протоколу производителя». Читателям, неискушенным в области клеточной и молекулярной биологии, было бы интересно узнать нюансы пробоподготовки или количественных параметров методов (например, из какого количества клеток, выделяется какое количество геномной ДНК и т.д.).

Глава «Результаты и обсуждение». В начале проведения экспериментов была создана генетическая конструкция, представляющая собой ДНК-донор для дальнейшей гомологичной рекомбинации и исправления мутации. Остроумный дизайн донорного вектора позволяет осуществить позитивно-негативную селекцию при дальнейших трансфекциях клеток. Далее был проведен выбор последовательностей протоспейсеров для гидовых РНК системы CRISPR/Cas9 в локусе гена *Avr*. Была проведена серия экспериментов, в ходе которых был выбран самый удачный вариант (CR-7), показавший

самые лучшие показатели по отсутствию off-target эффектов. При дальнейшем анализе работы CR-7, проведенном двумя методами (биоинформационным и секвенирования по Сенгеру спектра полученных клонов) было показано, что эффективность двух цепочечных разрывов составила порядка 85 % и вероятность внесения при этом мутаций (в основном одно нуклеотидной инсерции) – порядка 50 %. Также было проанализировано действие конструкторов на ген Oxt – паролог гена Avr, который является наиболее уязвимой мишенью для off-target эффекта, и было показано, что нецелевого воздействия, по всей видимости, нет. В качестве замечания к этому разделу, хочется отметить, что столь подробное описание конструирования вектора pX330-CR-7-Puro – было бы более уместно как раз в разделе «Материалы и методы», а не «Результаты и обсуждение». В заключительной части диссертационной работы были получены клональные линии эмбриональных фибробластов крысы RNFF1, в которых при помощи провалидированных конструкторов была исправлена мутация в гене Avr. При помощи впечатляющего арсенала методов и подходов последовательности генов Avr и Oxt были проанализированы, и была подсчитана эффективность гомологичной рекомбинации. При этом было обнаружено, что реальная эффективность ниже расчетной почти на порядок, а также наличие нецелевых мутаций в некоторых клонах. Были сделаны предположения о причинах такого поведения системы, заключающейся в маловероятном, но все же ненулевом действии протоспейсера гидовой РНК по неканоническому РАМ-мотиву – NAG.

Несколько непринципиальных замечаний и вопросов к работе:

- к сожалению, отсутствует подробное описание культуры клеток RNFF1, в которых происходит исправление мутации. Были ли они выделены из гомозиготных мутантов по Avr крыс Brattleboro? Проверялось ли это (гомозиготность) и каким образом?

- В пункте 3.5.3 – нет четкого описания, что такое образец 1 и образец 2 и чем они отличаются. Судя по всему, это биологические повторы эксперимента, но это следовало бы отметить.

- В пункте 3.7.1 – нет обоснованного описания, зачем в среду в первые сутки после электропорации добавлялся «активатор RAD51». Что он активирует? По всей видимости, судя по литературному обзору, он должен повышать вероятность гомологичной рекомбинации. Это как-то проверялось?

Список использованной литературы состоит из 119 цитируемых источников.

Материалы собственных исследований представлены также иллюстрациями, фотографиями, таблицами. Прodelан значительный объем методически сложной работы, освоено и развито множество совершенно различных методов экспериментальной

клеточной и молекулярной биологии. Выводы, представленные диссертантом, отражают полученные данные и соответствуют поставленным целям и задачам.

В целом, принципиальных замечаний к работе нет. Работа заслуживает высокой оценки. Автореферат отражает основные положения диссертации.

### **Значимость результатов для науки и практики.**

Работа Артема Александровича Немудрого представляет собой несомненный теоретический и самое главное практический интерес, поскольку в ходе ее была подтверждена принципиальная возможность («доказательство принципа») исправления мутации, ведущей к тяжелому наследственному заболеванию, при помощи перспективной системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Данный подход может быть успешно перенесен на другие модели и другие заболевания. Несомненно, полученные Артемом Александровичем в ходе проведения работ генетические конструкции, разработанные протоколы и стратегии станут основой для целой плеяды дальнейших научно-исследовательских работ по лечению различных тяжелых наследственных заболеваний человека, таких как наследственные формы болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, фенилкетонурии, муковисцидоза и многих других. Полученные Артемом Александровичем данные могут быть использованы в дальнейшем в таких учреждениях науки как Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардат РАН, Институт цитологии РАН, в которых в том или ином виде идут исследования моделей наследственных заболеваний человека и способов их лечения. Также обсуждаемые результаты, методы и подходы могут быть использованы в таких учреждениях высшего образования, как Московский государственный университет им. М.В. Ломоносов, Новосибирский государственный университет, Московский физико-технический институт (государственный университет), Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, где на профильных факультетах осуществляется обучение специалистов в области клеточной биологии, генетики, регенеративной биомедицины.

### **Заключение.**

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что представленная к защите диссертационная работа Немудрого Артема Александровича «ИСПРАВЛЕНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА КРЫС ЛИНИИ BRATTLEBORO *IN VITRO*» является законченным научным исследованием в рамках поставленных задач, в котором получены новые данные, представляющие собой интерес для науки. Диссертация

написана автором самостоятельно, содержит интересные данные и положения, выдвигаемые для публичной защиты. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией (список журналов ВАК). Количество публикаций соответствует требованиям ВАК. Таким образом, по объему, оформлению и качеству полученных данных представленная диссертационная работа соответствует основным квалификационным критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Немудрый Артем Александрович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв на диссертационную работу Немудрый А.А. подготовлен научным сотрудником ИБР РАН Дашинимаевым Эрдэмом Баировичем, заслушан, обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, от 16 февраля. 2016 г., протокол № 30, а также на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по специальности 03.02.07 – генетика от 16 декабря 2016 г., протокол № 4.

Научный сотрудник Лаборатории клеточной биологии  
ФГБУН Институт биологии развития  
им. Н.К.Кольцова РАН, кандидат биологических наук  
по специальности 03.03.04 –

клеточная биология, цитология, гистология,

Дашинимаев Эрдэм Баирович

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26,  
рабочий телефон (499)135-40-81  
e-mail: dashinimaev@gmail.com

Подпись Дашинимаева Э.Б. заверяю  
Ученый секретарь ИБР РАН, к.б.н., доц.



Хабарова М.Ю.