

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ
диссертационной работы **Немудрого Артема Александровича**
«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.

Репрограммирование соматических клеток в плюрипотентные стволовые (иПС) клетки под действием транскрипционных факторов и затем открытие революционной технологии генного редактирования на основе системы CRISPR/Cas9 явились важными вехами в современной биологии. Они, в числе прочих важных приложений, открыли ранее невиданные возможности для создания клеточных и животных моделей наследственных заболеваний человека. В своей диссертационной работе А.А.Немудрый поставил целью отработать подход к исправлению с помощью системы CRISPR/Cas9 точечной мутации в локусе гена аргинин-вазопрессина (*Avp*), имеющей место у крыс линии Brattleboro. Эффективное и высокоспецифичное исправление точечных мутаций в геноме является актуальным не только с точки зрения будущей генотерапии у человека, но и при моделировании заболеваний человека *in vitro*, а именно созданию контрольных изогенных линий иПС дикого типа. По этой причине тема кандидатской диссертации А.А.Немудрого является несомненно актуальной.

В рассматриваемой работе автором был создан набор генетических конструкторов, экспрессирующих элементы системы CRISPR/Cas9, для внесения двуниевых разрывов в различные участки локуса гена аргинин-вазопрессина крыс, проведена оценка целевых и побочных модификаций гена *Avp* и его паралога *Oxt* в эмбриональных фибробластах крыс линии Brattleboro. Автору удалось добиться исправления мутации в гене, являющегося следствием гомологичной рекомбинации с донорским вектором, но также выявлены некоторые побочные активности CRISPR/Cas9. Полученные автором результаты подчеркивают необходимость дальнейших исследований механизмов работы этой системы в клетках млекопитающих, имеющих целью усовершенствование её эффективности и специфичности.

Представленную диссертацию можно оценивать, как достаточно законченное научное исследование, не лишённое, однако, некоторых недостатков. Первый из них заключается в том, что, отрабатывать редактирование гена *Avp*, как мне кажется, было бы намного легче не на ограниченных в своем пролиферативном потенциале эмбриональных фибробластах, а на иПС клетках, полученных из этих фибробластов. Другое замечание касается выбора стратегии исправления точечных мутаций. Для таких целей более эффективным представляется подход с использованием ssODNs (single-stranded oligo-deoxynucleotides), поскольку при таком подходе отпадает необходимость в использовании селективных маркеров, а также не меняется состояние хроматина в исследуемом локусе. Далее, отсутствие следов ДЦР в гене *Oxt* (п. 3.1, Результаты) может быть следствием ограниченной чувствительности T7 эндонуклеазы и, тем самым, не отражать реальную ситуацию в клетках; этот метод скорее качественный, чем количественный. Помимо высказанных замечаний по смыслу автореферата, есть замечания по стилю написания, структуре и оформлению автореферата. Автореферат, как известно, должен полностью отражать суть проблемы, ход работы, полученные результаты, выводы из них, не вынуждая прибегать к ознакомлению с полным текстом диссертации или иной литературой. В случае же рассматриваемого автореферата это порою не так. Например, в начале описания результатов не приведены ни общая схема *Avp/Otx* локуса, ни расположение на этом локусе плеч гомологии и протоспейсеров. Такая информация приведена много ниже, да и то в неполном виде (Рис. 7А). В п. 1 Материалов и Методов

нет упоминания созданных автором плазмид рХ330_CR(7,8,N), оно появляется только при описании результатов. В тексте есть ссылка на Таблицу 12 в Диссертации, а в автореферате самой таблицы вообще нет. Наконец, имеется множество опечаток, часто используются сомнительные обороты и термины, как, например, «точковые замены», «схематичное», «индивидуальная культуральная посуда», «произошли из клеток», «неканоничными» т.д.

Не смотря на указанные недостатки работа в целом производит хорошее впечатление. Видно, что автор разбирается в сути проблемы. Работа выполнена на хорошем научно-техническом уровне, с использованием современных методов генетики, молекулярной биологии, а также с применением адекватных биоинформатических средств. Исследование грамотно спланировано и четко направлено на решение поставленных задач. Полученные результаты изложены достаточно подробно и корректно интерпретированы. Выводы логично вытекают из экспериментальных данных.

Подытожив, хочу отметить, что представленная 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

Санкт-Петербург, 20 октября 2017 г.

Алексей Николаевич Томилин
д.б.н., чл.-корр. РАН,
Зав. лаб. молекулярной биологии стволовых клеток,
Институт цитологии РАН,
Тихорецкий пр. 4,
194064 Санкт-Петербург
antom111@gmail.com