

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО  
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Дата защиты 22 ноября 2017 г. протокол № 40

О присуждении Немудрому Артему Александровичу  
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Немудрого А. А. «Исправление мутации в гене аргинин-вазопрессина крыс линии Brattleboro in vitro» по специальности 03.02.07 – генетика, принята к защите 28.06.2017 г, протокол № 26, диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

**Соискатель:** Немудрый Артем Александрович, 1991 года рождения. В 2013 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.

С 08.07.2013 г. по 07.07.2016 г. Немудрый А. А. обучался в очной аспирантуре ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, в настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Закиян Сурен Минович** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Лагарькова Мария Андреевна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной биологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва
2. **Белякин Степан Николаевич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией геномики ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация:** ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, г. Москва (ИБР РАН). В своем положительном заключении, подписанном научным сотрудником лаборатории клеточной биологии ФГБУН ИБР РАН, к.б.н. Дашинимаяевым Э.Б. и утвержденном чл.-корр. РАН, д.б.н. директором ФГБУН ИБР РАН А.В. Васильевым, указано, 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 ИБР 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 ИБР РАН по специальности 03.02.07 – генетика от 16 декабря 2016 г., протокол № 4».

Соискатель имеет 8 опубликованных работы по теме диссертации, общим объемом 52 страницы, в том числе 3 статьи, опубликованных в научных рецензируемых изданиях и 5 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas - инструменты открытий // Acta Naturae, Т. 6, № 3 (22), 2014, стр. 20-42 (IF 1.667)

2. Vaskova E. A., Medvedev S. P., Sorokina A. E., Nemudryy A. A., Elisaphenko E. A., Zakharova I. S., Shevchenko A. I., Kizilova E. A., Zhelezova A. I., Evshin I. S., Sharipov R. N., Minina J. M., Zhdanova N. S., Khegay, II, Kolpakov F. A., Sukhikh G. T., Pokushalov E. A., Karaskov A. M., Vlasov V. V., Ivanova L. N., Zakian S. M. Transcriptome Characteristics and X-Chromosome Inactivation Status in Cultured Rat Pluripotent Stem Cells // *Stem Cells Dev.* 2015. Vol. 24. P. 2912-2924. (IF 3.562)
3. Немудрый А.А., Маланханова Т.Б., Малахова А.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Стратегии редактирования паралогичных генов с помощью CRISPR/CAS9 // *Гены и Клетки* 2016, Т. XI, №2, С. 87-94

На диссертацию и автореферат поступило 17 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Александрова М. А. – д.б.н, главный научный сотрудник лаборатории проблем регенерации ФГБНУ ИБР РАН (г. Москва).
2. Асланян М.М. – д.б.н., профессор кафедры генетики Государственного учебно-научного учреждения Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва).
3. Берсимбай Р.И. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой общей биологии и геномики, директор Института клеточной биологии и биотехнологии Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева (г. Астана, Казахстан).
4. Вершинин А.В. – д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной генетики ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН (г. Новосибирск).
5. Волотовский И.Д. – академик НАН Беларуси, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (г. Минск, Беларусь).

6. Деев Р.В. – к.м.н., заведующий кафедрой патологической анатомии с курсом судебной медицины ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» (г. Рязань).
7. Дыбан П.А. – д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург).
8. Евгеньев М.Б. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов биологической адаптации ИМБ РАН (г. Москва)
9. Иллариошкин С.Н. – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва).
10. Карагяур М.Н. – к.б.н. старший научный сотрудник, Ткачук В.А. – академик, д.б.н., директор Института регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, декан Факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова (г. Москва). «...в ходе ознакомления с авторефератом все же возникло несколько замечаний: 1. в разделе "Материалы и методы" описание процедур селекции и электропорации было бы логично поменять местами; 2. сокращения CR-7 и CR-8 при первом упоминании не расшифрованы. Первое упоминание на странице 6, а объяснение на странице 7; 3. В разделе "Материалы и методы" описывается выделение первичной культуры эмбриональных фибробластов, а далее работы проводятся на линии клеток RNFF1, которая, судя по всему, является производным выделенных фибробластов? 4. в автореферате, к сожалению, не подтверждено восстановление синтеза целевого белка аргинин-вазопрессина методом WesternBlot.»
11. Киселев А.В. – к.б.н., старший научный сотрудник, Баранов В.С. – чл.-корр. РАН, д.м.н., заведующий лабораторией пренатальной диагностики ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (г. Санкт-Петербург)

12. Лавров А.В – к.м.н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (г. Москва). «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 несколько не касаются качества выполненной работы и её научной и практической значимости.»
13. Лядова И.В. – д.м.н., заведующая лабораторией биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (г. Москва).
14. Салмина А.Б. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник и руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, заведующая кафедрой биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России (г. Красноярск)
15. Симонова О.Б. – д.б.н., заведующая лабораторией молекулярно генетических процессов развития ИБР РАН (г. Москва).
16. Томилин А.Н. – чл.-корр. РАН, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). «...Представленную диссертацию можно оценивать, как достаточно законченное научное исследование, не лишённое, однако, некоторых недостатков. Первый из них заключается в том, что, отрабатывая редактирование гена Avr, 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... 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... Например, в начале описания результатов не приведены ни общая схема *Ayp/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 *pX330\_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... Не смотря на указанные недостатки, работа в целом производит хорошее впечатление.»

17. Чуриков Н.А. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ИМБ РАН (г. Москва).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области генетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Институтов в нашей стране по редактированию геномов.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработана стратегия редактирования паралогичных генов с близкой нуклеотидной последовательностью с помощью системы CRISPR/Cas9, которая позволила *in vitro*, в культуре клеток эмбриональных фибробластов крыс линии Brattleboro, моделирующей наследственный нейрогипофизарный несахарный диабет, исправить мутацию в гене аргенин-вазопрессина *Avp*.**

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые изучена возможность использования системы CRISPR/Cas9 для направленного исправления мутации в целевом сайте гена *Avp* эмбриональных фибробластов крыс Brattleboro.**

**Доказано**, что система CRISPR/Cas эффективно вносит двунитевые разрывы в целевой сайт, репарация которых в отсутствие донорной плазмидной ДНК происходит преимущественно с инсерцией одного нуклеотида – аденина.

**Доказано**, что используемая система не вызывает детектируемых нецелевых двунитевых разрывов в паралогичном гене окситоцина *Oxt*.

**Доказано**, что при репарации двунитевого разрыва в гене *Avp* с помощью гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором происходит замена мутантной последовательности на последовательность дикого типа и, как следствие, исправление мутации.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, впервые создана линия эмбриональных фибробластов крыс Brattleboro RNFF1\_t2.2, у которых восстановлен дикий вариант гена *Avp*, что открывает возможность их использования в качестве материала при разработке технологий клеточной терапии наследственных заболеваний человека с помощью редактирования генома *ex vivo*.**

**Разработаны** практические подходы к редактированию паралогичных генов, которые могут быть использованы в аналогичных случаях применения технологии редактирования геномов с помощью системы CRISPR/Cas.



Полученные в ходе диссертационной работы результаты представляют интерес для научно-исследовательских организаций медико-биологического профиля, изучающих вопросы терапии наследственных заболеваний, в частности, терапии с помощью новейших методов редактирования геномов *ex vivo*, и могут быть использованы в образовательном процессе на биологических и медицинских факультетах высших учебных заведений.

**Применительно к проблематике диссертации результативно** использованы методы и подходы молекулярной и клеточной биологии, а также генетической и геномной инженерии (полимеразная цепная реакция, секвенирования по Сенгеру, методы молекулярного клонирования, направленное внесение двунитевых разрывов в ДНК *in vitro* с помощью CRISPR/Cas9, методы культивирования клеточных культур млекопитающих, методы трансфекции ДНК в клетки млекопитающих, биоинформатические методы оценки эффективности CRISPR/Cas9 и выявления потенциальных нецелевых эффектов), что позволило разработать стратегию редактирования паралогичных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 и исправить мутацию в гене аргенин-вазопрессина в эмбриональных фибробластах крыс линии Brattleboro.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила** высокую воспроизводимость полученных данных и наличие всех необходимых экспериментальных контролей. Результаты получены на сертифицированном оборудовании с использованием современных методов геномной инженерии, молекулярной и клеточной биологии, адекватных поставленным задачам. Результаты анализа мутаций, возникающих при репарации двунитевых разрывов в целевом сайте гена *Avp*, соответствуют закономерностям, выявленным ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии в планировании, проведении и обсуждении всех экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных, представлении материалов на

## конференциях и подготовке публикаций. Основные результаты получены

автором самостоятельно. Донорный плазмидный вектор для гомологичной рекомбинации в гене *Aur* был сконструирован к.б.н. С.П. Медведевым. Качественный анализ действия CRISPR/Cas в эмбриональных фибробластах и рестрикционный анализ проводился совместно с Т.Б. Маланхановой.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 10. «Генетическая и клеточная инженерия. Трансгенные организмы» и п. 17. «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни. Генотоксикология. Генотерапия.» паспорта специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация Немудрого А.А. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям пункта 9, абзац 2, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, и принято решение присудить Немудрому Артему Александровичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 7 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель  
диссертационного совета,  
академик РАН



В.К. Шумный

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова  
22.11.2017 г.