

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора Федерального государственного
учреждения наук

Институт Цитологии и Генетики СО РАН



д.б.н. Рубцов Н.Б.

О Т З Ы В В Е Д У Щ Е Й О Р Г А Н И З А Ц И И

Института цитологии и генетики СО РАН на диссертационную работу **Черноносковой Веры Сергеевны** *«Последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток»*, представленную в диссертационный совет Д.003.045.01. на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по специальности 03.01.04 – «Биохимия» на соискание ученой степени кандидата химических наук.

Диссертационная работа Черноносковой Веры Сергеевны изложена на 134 страницах и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы (217 источников). Диссертационная работа проиллюстрирована 22 рисунками и содержит 15 таблиц.

Актуальность проблемы. Диссертационная работа Черноносковой В. С. посвящена исследованию взаимодействия эндогенных и экзогенных ДНК с поверхностью эндотелиальных клеток человека. В научной литературе информация о внеклеточных ДНК, связанных с клеточной поверхностью, (скпДНК) ограничена общим описанием и информацией о наличие

маркерных последовательностей в этом пуле циркулирующих ДНК. Показано, что при развитии опухолевого процесса на поверхности клеток крови появляется незначительное количество ДНК из опухолевых клеток, а ДНК, связанные с поверхностью первичных и трансформированных клеток, обогащены фрагментами ДНК прицентромерного района хромосомы 9. Недостаток фундаментальных знаний о нуклеотидном составе скпДНК и природе их взаимодействия с мембраной клеток не позволяет определить ДНК-мишени на поверхности клеток и выявить процессы, в регуляцию которых могут быть вовлечены скпДНК. В связи с вышеперечисленными фактами, получение данных о последовательностях ДНК, обеспечивающих специфическое связывание с клеточной поверхностью, является актуальной задачей.

Новизна и практическая ценность работы. Уникальностью представленной работы является то, что разработан новый метод выделения скпДНК, где в качестве исследуемого биоматериала используются эндогенные внеклеточные ДНК, которые постоянно присутствуют на поверхности клеток и прочно связаны с ней. Автором работы впервые продемонстрировано, что на поверхности эндотелиальных клеток присутствуют короткие ДНК длиной до 34 нуклеотидов. При помощи разработанного метода выделения ДНК из нуклеопротеиновых комплексов с поверхности клеток были выделены скпДНК длиной порядка 6-14 нуклеотидов.

Для определения последовательности коротких одноцепочечных ДНК из нуклеопротеиновых комплексов с клеточной поверхности впервые был разработан протокол лигирования фланкирующих олигонуклеотидов к оцДНК в низкой концентрации (≥ 10 пМ). Этот протокол является универсальным и может быть использован для решения биохимических задач. Используя разработанный протокол лигирования ДНК неизвестных последовательностей с фланкирующими олигонуклеотидами из адапторов с последующей амплификацией, клонированием и секвенированием по

Сэнгеру, автором представленной работы впервые были идентифицированы последовательности коротких скпДНК (6-14 нуклеотидов) и выявлены 3 консенсусных мотива ДНК, участвующие в прочном связывании нуклеиновых кислот с поверхностью клеток.

В заключительной части работы было показано, что олигонуклеотиды, содержащие выявленные мотивы ДНК и комплементарные им ДНК, действительно прочно связываются с поверхностью эндотелиальных клеток по сравнению другими олигонуклеотидами, последовательности которых были взяты из литературных источников. Автором было обнаружено, что процесс связывания синтетических олигонуклеотидов с клетками зависит от комбинации консенсусных мотивов ДНК в их последовательностях. В результате исследования транспорта синтетических олигонуклеотидов в клетки было показано, что консенсусные мотивы ДНК влияют на связывание ОДН с рецепторами и определяют локализацию ОДН в клетках. Таким образом, полученные автором результаты могут быть использованы для решения проблемы целенаправленной доставки нуклеиновых кислот в клетки для реализации их биологической активности.

В «Литературном обзоре» в первой части подробно изложены данные о размере, концентрации и составе ДНК, связанной с поверхностью клеток крови и эукариотических клеток. Из представленных данных следует, что взаимодействия ДНК с белками клеточной поверхности играет важную роль, поэтому во второй части раздела работы обобщены литературные данные о биологических эффектах в результате нуклеопротеиновых взаимодействий на примере «ДНК-ловушек» и ДНК-аптамеров. Заключительную часть раздела автор посвящает обоснованию выбора клеточной модели для исследования ДНК, связанных с клеточной мембраной. Представленный в «Литературном обзоре» материал полностью соответствует целям и задачам диссертации и отражает современное состояние проблемы.

Описание экспериментальной части диссертационной работы дает представление о разнообразии используемых автором методов. В работе

использовались различные биохимические/молекулярно-биологические методы, что обеспечило высокий методический уровень диссертационной работы и позволило автору диссертации получить новые и интересные результаты, изложенные в следующем разделе работы.

В описании полученных результатов автор придерживается порядка поставленных в работе задач. В результатах описаны все этапы работы, данные оптимизационных экспериментов, приведены схемы, позволяющие быстро понять суть экспериментов. Результаты работы не вызывают сомнения в их достоверности и надежности.

Принципиальных замечаний к работе нет, однако встречаются орфографические ошибки и стилистические неточности. Сделанные замечания не умаляют достоинств работы.

«Выводы» диссертационной работы Черноносой В. С. четко и логично изложены, полностью соответствуют полученным результатам. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по данному вопросу.

Диссертационная работа Черноносой В. С. выполнена на высоком научном и методическом уровне, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, актуальных для биохимии ДНК, связанных с клеточной поверхностью. Результаты работы имеют несомненное практическое и теоретическое значение. По своей новизне, научному уровню и объему проведенных исследований работа Черноносой В. С. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении научных степеней» Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, а ее автор – Черноносова Вера Сергеевна заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Работа обсуждена на межлабораторный семинар по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике протокол № 6 Института цитологии и генетики СО РАН 9 июня 2014 года.

Зав. лабораторией
генетики развития,
ИЦиГ СО РАН

д.б.н. Серов О.Л.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, 10

Телефон: +7(383) 363-49-81

E-mail: rubt@bionet.nsc.ru

