

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание степени кандидата химических наук

Черноносовой Веры Сергеевны

«Последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток»

Диссертационная работа Черноносковой Веры Сергеевны посвящена исследованию эндогенных ДНК, специфично связывающихся с поверхностью эндотелиальных клеток. Феномен внеклеточных нуклеиновых кислот (внДНК), обнаруженный первоначально в культуральной среде эукариотических клеток, является универсальным для многоклеточных организмов. Несмотря на отсутствие прямых доказательств функциональной роли существующих в организме внеклеточных нуклеиновых кислот, накопленные к настоящему моменту экспериментальные данные свидетельствуют в пользу их биологической значимости. Показано, что при развитии опухолевого процесса на поверхности клеток крови появляется небольшое количество ДНК из опухолевых клеток (*Fleischhacker, M., et al., 2007*), а ДНК, «прочно» связанные с поверхностью первичных и трансформированных клеток, обогащены фрагментами ДНК прицентрамерного района хромосомы 9 (*Морозкин Е. и др., 2010*). Однако биологические причины/последствия такого связывания, равно как и биологические функции ДНК, Элюируемых с поверхности клеток (скпДНК) до сих пор остаются малоисследованными. Решение этих задач позволило бы исследователям не только найти оптимальные мишени для диагностических методов, но и значительно продвинуться в изучении механизмов, участвующих в генерации внеклеточных нуклеиновых кислот и реализации их функций. В связи с этим, выделение, идентификация последовательностей ДНК, «прочно» связанных с клеточной поверхностью, а также исследование связывания с клетками и транспорт в клетки олигонуклеотидов, содержащих выявленные последовательности ДНК, представляются весьма актуальными.

Целью представленной работы является выделение и идентификация последовательностей ДНК, «прочно» связанных с поверхностью первичных эндотелиальных клеток человека. В качестве основных задач диссертации автор выносит следующие положения:

- определение размера фрагментов ДНК, «прочно» связанных с поверхностью эндотелиальных клеток человека;
- разработка метода выделения фрагментов ДНК, отвечающих за «прочное» связывание с поверхностью эндотелиальных клеток;
- идентификация последовательностей, участвующих в «прочном» связывании с поверхностью эндотелиальных клеток;
- исследования связывания с клетками и транспорт в клетки олигонуклеотидов, содержащих выявленные последовательности ДНК.

Без всякого сомнения, эти положения вполне оправданы для кандидатской диссертации. Так как дезоксирибонуклеиновые кислоты постоянно присутствуют во внеклеточной среде культивируемых клеток *in vitro*, а также в биологических жидкостях и в межклеточном пространстве *in vivo*, но их концентрации в норме и при патологиях различны, то не вызывает сомнений, что развитие работ в этом направлении может привести не только к расширению знаний о роли и функции внеклеточных нуклеиновых кислот в процессах жизнедеятельности человека, но и представляет определенный клинический интерес, так как будет способствовать разработке новых диагностических и прогностических тестов и созданию новых лекарственных средств.

На основании вышеизложенного вполне логичной представляется заявленная цель настоящего исследования. **Однако следует обратить внимание**, что задачи, сформулированные Верой Сергеевной Черноносковой, несколько шире, чем сама цель. В данной работе не только получены данные о последовательностях ДНК, отвечающих за прочное связывание с поверхностью клеток, разработан метод выделения фрагментов ДНК, отвечающих за «прочное» связывание, но и исследовано при помощи флуоресцентной микроскопии и ингибиторов/конкурентов транспорта взаимодействие олигонуклеотидов с клетками. На примере дезоксирибоолигонуклеотидов – аналогов внеклеточных ДНК, автором выявлено связывание и проникновение их внутрь первичных эндотелиоцитов. Впервые полученные данные о последовательностях ДНК, отвечающих за прочное связывание с поверхностью клеток, могут стать начальной базой для исследования биологических функций таких ДНК и клеточных механизмов, в которых они участвуют. Результаты исследования настоящей работы продемонстрировали, что процесс связывания и транспорт олигонуклеотидов в клеточные компартменты зависит от присутствия и комбинации 5-7 нуклеотидных мотивов в их последовательностях.

Полученные данные могут быть использованы для решения целенаправленной доставки лекарственных препаратов на основе нуклеиновых кислот.

Автореферат занимает 20 машинописных страниц. При описании актуальности проблемы соискатель приводит аргументы и факты, указывающие на правильность выбора клеток эндотелия пупочной вены новорожденных (HUVES) в качестве модели для исследования молекул ДНК, «прочно» связанных с клеточной поверхностью. Действительно, эти клетки обладают рядом свойств, предъявляемых к модельным объектам: их культивирование не требует особых условий, они быстро пролиферируют и не склонны к накоплению хромосомных aberrаций в ходе культивирования. Следует отметить, что источником первичных эндотелиальных клеток доступный биологический материал. Благодаря своему физиологическому расположению между кровотоком и тканью клетки эндотелия сосудов выполняют ряд важных функций: барьерную, гемостатическую, вазомоторную, сосудообразующую, транспортную, рецепторную и секреторную (*Rajendran, P., et al., 2013*). Для этих клеток исследована динамика изменения концентрации вДНК и скпДНК (*Морозкин, Е., и др., 2009*). Такой набор свойств делает эндотелиальные клетки важной и удобной моделью для исследования молекул ДНК, «прочно» связанных с их поверхностью.

В первой части работы автор разрабатывает подходы для идентификации последовательностей, участвующих в «прочном» связывании с поверхностью эндотелиальных клеток. Несомненным достоинством работы является разработка новой методологии – метода выделения коротких фрагментов ДНК, отвечающих за «прочное» связывание с поверхностью эукариотических клеток, из нуклепротеиновых комплексов и протокола лигирования фланкирующих олигонуклеотидов к оцДНК, без которого было бы невозможно идентифицировать последовательности коротких скпДНК. Благодаря данной методологии соискателем были выделены одноцепочечные ДНК длиной 6-14 нуклеотидов, связанные с поверхностью первичных эндотелиоцитов человека и определены их последовательности.

Вторая часть работы Веры Сергеевны Черноносковой посвящена изучению связывания с клетками и транспорта в клетки олигонуклеотидов, содержащих выявленные последовательности ДНК. При проведении данных исследований соискатель проявил себя не только как грамотный биохимик, но и как прекрасный научный работник в

области молекулярной биологии. Работа выполнена на высоком уровне с использованием современных физико-химических, биохимических и молекулярно-биологических методов, что обеспечивает достоверность полученных результатов. С использованием метода радиоизотопного анализа соискателем обнаружено, что процесс связывания олигонуклеотидов с клеточной мембраной зависит от комбинации идентифицированных мотивов ДНК. При помощи флуоресцентной микроскопии и ингибиторов/конкурентов транспорта продемонстрировано, что олигонуклеотиды транспортируются путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, причем за их связывание отвечают разные рецепторы, а идентифицированные мотивы ДНК определяют их внутриклеточную локализацию. Представленные в автореферате данные оригинальны.

При прочтении автореферата возникает следующее замечание: сокращения, которые используются автором для обозначения одного и того же объекта, даны как в русской (ЭДТА, стр. 5), так и в английской (EDTA, стр. 6) транскрипции. Данное замечание не носит принципиального характера и не влияет на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов. Результаты исследований В.С. Черносовой опубликованы в ведущих международном и отечественном журналах (Ann. N. Y. Acad. Sci.; Бюл. эксперим. биологии и медицины, Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина), доложены на международных и российских конференциях высокого уровня, соискателем получено 2 патента РФ на изобретение. Они достаточно полно отражают содержание автореферата диссертации. Выводы диссертации адекватны полученным автором результатам.

Таким образом, диссертационная работа Черносовой Веры Сергеевны «Последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток» является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне, и представляет собой законченное исследование, в котором решены важные научные задачи: выделены и идентифицированы последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток, а также исследовано связывание с клетками и транспорт в клетки олигонуклеотидов, содержащих выявленные последовательности ДНК. Полученные соискателем результаты могут быть использованы для развития работ в области изучения структуры и функций внеклеточных нуклеиновых кислот и их комплексов в норме и при

патологии, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, НИИ физико-химической биологии МГУ им. А.Н. Белозерского, Институте молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического профиля.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Черноносковой Веры Сергеевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник, д.х.н., доцент  Годовикова Татьяна Сергеевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

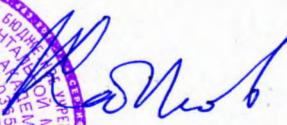
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Телефон 8-906-994-2612

Почтовый адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

E-mail: godov@niboch.nsc.ru

Подпись д.х.н., доц., в.н.с. ЛИМБ ИХБ СО РАН Т.С. Годовиковой удостоверяю

Ученый секретарь ИМБФМ СО РАН, к.б.н.  М.Р. Кабилов

10.06.2014

