

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Черноносовой Веры Сергеевны

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

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Как известно, кровь человека содержит свободно циркулирующие и связанные с поверхностью клеток крови внеклеточные нуклеиновые кислоты (вНК). Установлено, что состав вНК может меняться при заболеваниях, связанных с нарушением функционирования генетического аппарата клеток и, в частности, при онкологических заболеваниях. Это свойство вНК имеет несомненный диагностический потенциал, который, однако, до сих пор не вполне реализован из-за недостатка фундаментальных сведений о механизмах формирования и поддержания пула вНК в норме и при патологиях. Целью диссертационной работы В.С.Черноносовой было исследование той части внеклеточной ДНК, которая прочно связана с поверхностью клеток (далее скпДНК). В качестве модели автор использовала первичную культуру клеток эндотелия. В задачи В.С.Черноносовой входили разработка методов выделения скпДНК, определение их состава, а также тестирование роли выявленных структурных мотивов во взаимодействии с клетками и внутриклеточном транспорте при их включении в синтетические олигонуклеотиды. Актуальность диссертационной работы Черноносовой Веры Сергеевны «Последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток» не вызывает сомнений.

Исследования проведены на модели первичной культуры эндотелиоцитов пупочной вены. Выбор этого типа клеток обоснован и обусловлен желанием автора избежать влияния на результат хромосомных нарушений, характерных для трансформированных клеточных линий. На начальном этапе работы были оптимизированы условия выделения и культивирования эндотелиальных клеток и с помощью ОТ-ПЦР, фазово-контрастной микроскопии и флуоресцентной гибридизации *in situ* охарактеризованы полученные культуры клеток. Для выделения ДНК из состава нуклеопротеиновых комплексов, связанных с поверхностью клеток, В.С.Черноносова с соавторами разработала оригинальный и высокоэффективный метод. Для идентификации скпДНК был разработан и оптимизирован протокол лигирования к 3'- и 5'-концам одноцепочечных ДНК фланкирующих олигонуклеотидов. Было продемонстрировано, что структура адаптора влияет на выход продукта лигирования. Подобранные условия

реакции позволили автору надежно получать продукт лигирования в условиях, когда концентрация ДНК мишени не превышала 10^{-12} М.

При помощи разработанных методов В.С. Черноносова впервые выделила и определила последовательности коротких ДНК, прочно связанные с поверхностью эндотелиоцитов человека. В этих последовательностях были выявлены мотивы, предположительно отвечающие за специфическое связывание с белками на клеточной поверхности. Затем автором был проведен поиск в геноме человека последовательностей ДНК, которые могли бы быть источниками идентифицированных коротких ДНК с клеточной поверхности. С учетом полученных результатов, были синтезированы 14 олигонуклеотидов для исследования их связывания с клеточной мембраной и внутриклеточной доставки. Автор обнаружила, что выявленные ДНК-мотивы могут действительно влиять на связывание олигонуклеотидов с клеточной поверхностью и внутриклеточную локализацию. При использовании конкурентов и ингибиторов транспорта было продемонстрировано, что олигонуклеотиды, содержащие различные идентифицированные мотивы ДНК, связываются с разными рецепторами, но в основном транспортируются в клетки по механизму эндоцитоза.

Таким образом, результаты работы В.С. Черноносовой имеют фундаментальное значение для развития представлений о феномене вНК и открывают новые возможности для дальнейшего исследования биологических функций и механизмов транспорта внеклеточных ДНК. Практическое значение полученных результатов заключается в том, что идентификация мотивов, обеспечивающих прочное связывание с поверхностью клеток и внутриклеточную локализацию ДНК может быть использована для направленной доставки ДНК в клеточные компартменты.

Диссертация оформлена по классическому образцу и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы (всего 217 литературных источников). Работа изложена на 134 страницах, содержит 22 рисунка и 15 таблиц. Во **Введении** кратко охарактеризована актуальность исследования, обозначены проблемы и сформулированы цели и задачи исследования. **Обзор литературы** состоит из трех частей. В первой части суммированы имеющиеся данные о ДНК, связанных с поверхностью клеток различного происхождения. Из этих данных следует, что ДНК на поверхности клеток связана через белки мембраны, поэтому вторая часть литературного обзора посвящена рассмотрению механизмов и эффектов взаимодействия ДНК с белками клеток. Третья часть описывает перспективность эндотелиальных клеток в качестве модели изучения скпДНК.

Представленный в обзоре материал полноценно отражает современное состояние проблемы.

Для решения поставленных задач автор использовала широкий спектр разнообразных методов. Их подробное описание представлено в главе **Материалы и методы**. Этот раздел демонстрирует высокий методический уровень работы и ее автора. Глава **Результаты и обсуждение** содержит экспериментальные данные, которые логично скомпонованы и проиллюстрированы. Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений, выводы корректны, обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Вся диссертационная работа написана ясным языком. Автореферат соответствует диссертации. Хотя в оформлении диссертации имеются некоторые погрешности, они не умаляют ее достоинств и не снижают общего благоприятного впечатления о работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, можно заключить, что диссертация В.С. Черноносой «Последовательности эндогенных ДНК, специфично связывающиеся с поверхностью эндотелиальных клеток» является научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальных задач, имеющих существенное значение для биохимии внеклеточных нуклеиновых кислот. Автором разработаны новые методы выделения и характеристики прочно связанных с поверхностью клеток ДНК и определены структурные мотивы, ответственные за это связывание и внутриклеточный транспорт ДНК. Диссертационная работа Черноносой Веры Сергеевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункт 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности «03.01.04 – биохимия».

Официальный оппонент
Зав. лабораторией иммуногенетики,
ИМКБ СО РАН, д.б.н.
taranin@mcb.nsc.ru
тел: 8(383)363 90 73

Александр Владимирович Таранин

ФГБУН «Институт молекулярной и
клеточной биологии СО РАН», Лаврентьева 8/2
Новосибирск 630090,
тел: 8(383)363 90 41

9 июня 2014г

Подпись Таранина А. В. заверяю:
Ученый секретарь ИМКБ СО РАН



к.б.н. Е. Б. Кокоза