

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

Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению внеклеточных ДНК в биологических жидкостях, феномен ДНК, связанных с клеточной поверхностью (скпДНК), мало исследован, причем основная часть исследований ориентирована на практическое применение скпДНК в качестве маркерных молекул. При этом фундаментальные аспекты связывания ДНК с клетками, поиск индивидуальных молекул, участвующих в таком связывании, детально не исследованы. Это, в значительной степени объясняется сложностью в создании экспериментальных моделей. Действительно, скпДНК практически всегда обнаруживаются на поверхности клеток, поэтому использование аффинных реагентов – конкурентов связывания скпДНК с клеточной поверхностью не позволяет получить однозначных результатов о связывании скпДНК с клеточной поверхностью (в виду того, что скпДНК могут быть или в прочных комплексах с поверхностью клеток, или в предформированных комплексах с белками). Данные о последовательностях скпДНК, которые необходимы для связывания с клетками, так же сложно получить в силу размера этих молекул и отсутствия подходов к идентификации отдельных внутримолекулярных структур, опосредующих такое связывание.

Известно, что скпДНК могут быть элюированы с клеточной поверхности в составе нуклеопротеиновых комплексов в результате обработки клеток протеолитическими ферментами (например, трипсином). Автор диссертации верно предположила, что исследование таких нуклеопротеиновых комплексов, в частности ДНК, позволит получить информацию о нуклеотидном составе скпДНК, что в дальнейшем приведет к возможности изучения биологических функций скпДНК и механизмов реализации этих функций. Поскольку скпДНК обнаруживаются на всех типах клеток, а потенциальными мишенями для экзогенных ДНК является множество внутриклеточных молекул и процессов, актуальность темы диссертационной работы Черноносовой Веры Сергеевны не вызывает сомнений.

Диссертация Черноносовой В. С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 134

страницах, содержит 22 рисунка и 15 таблиц. Библиографический список включает 217 литературных источников.

В кратком введении сформулированы цели и задачи исследования, охарактеризовано современное состояние проблемы и определена актуальность поставленных задач.

В литературном обзоре изложены современные представления о свойствах ДНК, связанных с поверхностью клеток, а также рассмотрены биологические эффекты активных ДНК (ДНК-ловушек и аптамеров) в результате их взаимодействия с белками. Достаточно полный набор процитированных в литературном обзоре работ с тщательным анализом информации подтверждает перспективность и актуальность собственных исследований автора, которые представлены Черноносковой В.С. во второй (методические подробности эксперимента) и третьей (обсуждение результатов) главах диссертации.

Экспериментальная часть, изложенная во второй главе, содержит достаточную информацию об использованных в работе материалах и методах. В процессе выполнения работы наряду с классическими биохимическими методами автором использованы современные молекулярно-биологические подходы, такие как работа с культурами первичных клеток, лигирование, клонирование и секвенирование ДНК, анализ полученных данных с помощью современных баз данных, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия и другие.

Диссертация Черноносковой Веры Сергеевны посвящена выделению скпДНК из нуклеопротеиновых комплексов, идентификации последовательностей скпДНК и исследованию процессов связывания и транспорта в клетки олигодезоксирибонуклеотидов – аналогов внеклеточной ДНК. Несомненным достоинством работы является разработка **новой методологии** - метода выделения скпДНК из нуклеопротеиновых комплексов с клеточной поверхности и протокола лигирования одноцепочечных ДНК, без которого было бы невозможно идентифицировать последовательности коротких скпДНК. Протокол лигирования фланкирующих олигонуклеотидов к 3'- и 5'-концам одноцепочечных ДНК, присутствующих в концентрации порядка 10^{-12} М, является универсальным и может быть использован для решения других биохимических задач.

В представленной работе был исследован размер скпДНК в составе нуклеопротеиновых комплексов эндотелиальных клеток. Используя разработанную методологию, были выделены и идентифицированы последовательности скпДНК,

участвующие в формировании прочных нуклеопротеиновых комплексов на плазматической мембране клеток. Анализ полученных данных о последовательностях скпДНК позволил соискателю выявить консенсусные мотивы ДНК, что свидетельствует о сиквенс-специфическом взаимодействии скпДНК с белками клеточной поверхности. Был проведен компьютерный анализ для поиска последовательностей ДНК-предшественников, содержащих кластеры идентифицированных скпДНК, в геноме человека. Было обнаружено, что последовательности ДНК-предшественников в основном расположены в эухроматиновых участках генома и наиболее часто локализованы в областях обогащенных простыми повторами и LTR-ретротранспозонами. Эти данные расширяет представления о возможных биологических функциях скпДНК.

Значительный интерес представляет раздел диссертации, посвященный исследованию связывания и транспорта в клетки олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих выявленные ДНК-мотивы. Автором было обнаружено, что связывание олигонуклеотидов с поверхностью клеток зависит от комбинации идентифицированных мотивов ДНК в их последовательностях. В процессе исследования влияния ингибиторов и конкурентов транспорта было показано, что олигонуклеотиды транспортируются путем рецепторопосредованного эндоцитоза, причем за их связывание отвечают разные рецепторы, а идентифицированные мотивы ДНК определяют их внутриклеточную локализацию. Полученные результаты являются фундаментальными и могут быть использованы для эффективной и направленной доставки лекарственных препаратов на основе НК в клеточные компартменты.

Глава "Результаты и их обсуждение" написана логично, экспериментальные данные хорошо скомпонованы и проиллюстрированы. Полученные диссертантом результаты достоверны, выводы корректны и обоснованы, и соответствуют поставленным задачам. Работа представляет собой завершённое целостное исследование, выполненное на высоком методическом уровне, с привлечением большого спектра методов.

Поводов для принципиальной критики работа Черноносковой В.С. не вызывает. Качество оформления диссертационной работы, в целом, - высокое.

Есть несколько формальных вопросов и замечаний.

1. Недоумение вызывает отсутствие при обсуждении результатов ссылок в диссертации на собственные работы – две статьи в рекомендованных ВАК журналах и два патента. Правда, одна работа (патент) все же очень скромно процитирована со словами

«первые попытки исследовать их биологические функции были выполнены только в последнее время» (стр. 18).

2. Работа содержит незначительное количество опечаток (стр. 68, 2-ой абзац, строка 4; стр. 94, 2-ой абзац, строка 1; стр. 98, строка 4; стр. 121, ссылка 71).

3. К обозначению нистатина как полиенового антибиотика (стр.110), следовало бы добавить макроциклический.

Однако приведенные замечания несколько не умоляют значимости диссертационной работы. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертации. Результаты диссертационных исследований достаточно полно опубликованы в научных изданиях и прошли апробацию на конференциях разного уровня.

Результаты работы могут быть использованы в российских и зарубежных институтах, изучающих взаимодействие нуклеиновых кислот с клеточными белками и их транспорт внутрь клеток, а также в лабораториях, исследующих внеклеточные нуклеиновые кислоты.

Диссертационная работа Черноносковой В. С. по объему и значимости полученных результатов представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней", а автор работы Черноносова Вера Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04-биохимия.

Официальный оппонент

доктор химических наук, профессор,
зав. лабораторией медицинской химии

Э. Э. Шульц

Эльвира Эдуардовна Шульц, Новосибирский институт органической химии СО РАН, проспект академика Лаврентьева, 9. Тел. 8(383)330-88-50. E-mail: schultz@nioch.nsc.ru.

Подпись д.х.н., проф., зав. ЛМХ Э.Э. Шульц удостоверяю:

Ученый секретарь НИОХ СО РАН, к.х.н.

И.А. Халфина

04 июня 2014 г.

