

## Отзыв на автореферат

Ким Дарьи Вячеславовны по теме диссертации  
«ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ДЕФИЦИТНЫХ  
ПО ГЕНАМ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ, С ПОМОЩЬЮ  
СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9»»

на соискание степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.3. «молекулярная биология»

Эффективная репарация повреждений ДНК критически важна для поддержания стабильности генома живых организмов и корректной передачи генетической информации потомству. Необъемные повреждения ДНК, включая повреждения, индуцированные окислительным стрессом, удаляются в ходе эксцизионной репарации оснований (ЭРО). В репарации разных типов повреждений и на разных этапах ЭРО участвуют разные ферменты. Однако детальные механизмы и функции отдельных ферментов ЭРО остаются во многом неизвестными. Из-за эмбриональной гибели модельных животных, дефицитных по генам многих ферментов ЭРО, актуальной задачей является получение модельных нокаутных клеточных линий.

В ходе диссертационной работы Д.В. Ким были получены и фенотипически охарактеризованы клеточные линии, нокаутные по ключевым генам ЭРО: АП-эндонуклеаз *APEX1*, *APEX2*, ДНК-полимеразы *POLB*, ДНК-гликозилазы *OGG1* и *MUTYH*. Автореферат аккуратно оформлен, легко читается и содержит всю необходимую теоретическую информацию, раскрывающую тему исследования. Цель, задачи и выводы работы четко сформулированы.

Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Исследование выполнено на очень высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии и молекулярной генетики: молекулярного клонирования, методов работы с культурами клеток человека и постановки генотоксических экспериментов с ДНК-повреждающими агентами (метилметансульфонатом и модуляторами окислительного стресса), методы реконструкции репарации в клеточных экстрактах с олигонуклеотидными субстратами. Для прямой оценки количества АП-сайтов в клетках использовали тест с альдегидной реактивной пробой. Нокаутные клеточные линии получали с помощью эффективной технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. Целевые мутации подтверждали в геномной ДНК с помощью метода TIDE и секвенированием по Сэнгеру после ТА-клонирования, а на уровне мРНК – с помощью RT-PCR. Отсутствие целевых белков в клетках подтверждали вестерн блотом. Кроме того, в диссертации были сконструированы новые варианты репортерного гена *EGFP*, для оценки эффективности репарации повреждений ДНК *in vivo*.

Полученные результаты обладают очень высокой новизной и научной значимостью. Из созданных в работе клеток наиболее подробно были охарактеризованы две линии с нокаутом гена *APEX1* и двойным нокаутом *APEX1* и *APEX2*. Важным результатом стало открытие в клетках человека дублирующих систем репарации АП-сайтов, независимых от основной АП-эндонуклеазы *APEX1*. Было показано, что в отсутствие *APEX1* расщеплять АП-сайты способна АП-лиазная активность бифункциональной ДНК-гликозилазы *NTHL1*. Кроме того, в работе впервые на культуре клеток была показана роль бифункциональной ДНК-гликозилазы *NTHL1* в репарации аддуктов метоксиамины с АП-сайтами.

Полученная панель модельных клеточных линий может найти применение не только в фундаментальных исследованиях механизмов ЭРО, но и в практических генотоксических экспериментах по оценке эффективности препаратов химиотерапии или оценке тактики лечения пациентов с дефектами конкретных генов системы ЭРО.

Имеются небольшие замечания, не влияющие на общий уровень работы:

- 1) Отсутствие белка было подтверждено с помощью вестерн блота не для всех клеточных линий, что, возможно, объясняется сложностями закупки антител.
- 2) На рисунках 4 и 5 не хватает схемы ДНК-субстрата и продукта реакции для лучшего понимания принципа реконструкции репарации.

В целом работа является целостным законченным научным исследованием, в котором были получены принципиально новые результаты о механизмах репарации АП-сайтов в ходе ЭРО. Выводы и представленные в работе гипотезы хорошо обоснованы. Высокий научный уровень, новизна и значимость полученных результатов подтверждаются тремя статьями в ведущих мировых журналах; еще несколько работ, близких к теме исследования не вошли в автореферат. Результаты диссертации были также представлены автором на четырех конференциях.

Представленная к защите работа и автореферат полностью соответствуют всем требованиям, установленным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Ким Д.В. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «молекулярная биология».

Старший научный сотрудник лаборатории механизмов ответа на повреждения ДНК  
Института биологии гена РАН,  
ул. Вавилова, 34/5, Москва, Россия, 119334

amakarova-img@yandex.ru

к.б.н. Макарова А. В.



Я, Макарова Алена Владимировна, даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с защитой  
Ким Дарьи Вячеславовны

подпись *А.В. Макаровой*

ЗАВЕРЯЮ

ЗАМ. ДИРЕКТОРА ИБГ РАН

МАНСУРОВА Г.В.

