

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Ким Дарьи Вячеславовны

«ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ДЕФИЦИТНЫХ ПО ГЕНАМ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ, С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Актуальность темы исследования. Изучение механизмов репарации различных повреждений ДНК в настоящее время является одним из активно развивающихся направлений современной молекулярной биологии, что связано, в первую очередь, с ведущей ролью систем репарации в поддержании генетической стабильности клеток. Эксцизионная репарация оснований (BER) восстанавливает мутагенные или генотоксические повреждения оснований ДНК, вызванные как экзогенными, так и эндогенными химическими соединениями. Снижение активности ферментов BER может лежать в основе канцерогенеза многих органов человека, и, напротив, повышение активности системы BER может быть одной из причин развития резистентности к проводимой химиотерапии. Еще одной важной проблемой является активное использование в современной клинике синтетических летальных подходов, нацеленных на факторы, связанные с BER. Поэтому поставленная в диссертационной работе цель, направленная на получение и характеристику клеточных линий, дефицитных по некоторым генам системы BER человека, а также демонстрацию их потенциала как инструмента для исследования репарации ДНК, является актуальной научной проблемой современной молекулярной биологии.

Научная новизна диссертационной работы Ким Д.В. не вызывает сомнения. Так, автором впервые получены изогенные линии клеток человека 293FT, дефицитные по отдельным генам *APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*, а также одновременно по генам *APEX1* и *APEX2*. Также была впервые получена модифицированная клеточная линия A549, дефицитная по гену *OGG1*. Впервые выявлено несколько новых вариантов белка EGFP с аминокислотными заменами, приводящими к

потере флуоресценции. Впервые показано, что в клетках человека существуют дублирующие системы репарации АП-сайтов, независимые от основной АП-эндонуклеазы APEX1. Впервые проведено исследование репарации аддуктов метоксиамины с АП-сайтами в клеточной системе и показано, что репарация этого типа зависит от бифункциональной ДНК-гликозилазы NTHL1.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Ким Д.В. представляют интерес, как для фундаментальной, так и прикладной науки. Данные о существовании альтернативных путей репарации АП-сайтов в APEX1-дефицитных клетках важны для дальнейшего исследования механизмов репарации ДНК. Показана также роль АП-лиаз, катализирующих реакцию β -элиминирования, в процессе репарации ДНК. Результаты диссертационной работы имеют также и практическое значение, так как полученные линии клеток могут быть использованы для оценки генотоксичности новых соединений, в том числе лекарственных препаратов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Ким Д.В. изложена на 144 страницах машинописного текста и содержит 70 рисунков и 3 таблицы. Она включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 504 источников.

Во введении автор обосновано представляет актуальность выбранного исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы посвящен исследуемой проблеме, а именно: механизмам эксцизионной репарации оснований (BER). В части обзора, посвященной клеточным линиям и мышинным моделям, дефицитным по генам эксцизионной репарации оснований, подробно описываются существующие на сегодня подходы к изучению механизмов репарации различных повреждений ДНК с помощью ферментов BER. Большое внимание уделено описанию имеющихся данных по использованию клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК. В части обзора, посвященной получению клеточных линий и мышинных моделей с генными модификациями, анализируется использование геномного редактирования

CRISPR/Cas9. В отдельной главе приведена информация о клеточных линиях 293 и A549, используемых в настоящей работе. В целом, в обзоре, представлены необходимые и современные данные по исследуемой проблеме. В заключении автор справедливо отмечает перспективность получения изогенной панели нокаутных клеточных линий по генам системы BER с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9.

Материалы и методы исследования полностью адекватны поставленной цели и решаемым задачам. В работе использован широкий спектр современных молекулярно-биологических методов и методов клеточной биологии. Это, прежде всего, получение нокаутных по генам BER клеточных линий человека с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9, ТА-клонирование. Для определения содержания мРНК и белковых продуктов использованы методы ОТ-ПЦР и Вестерн блота соответственно, а также различные методы определения активности ферментов BER. Большой раздел этой главы посвящен получению плазмидных конструкторов, содержащих повреждения ДНК.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из семи частей, где последовательно приводятся эксперименты по созданию изогенных линий клеток, дефицитных по различным белкам BER, а также оценке эффективности репарации различных повреждений ДНК. Убедительно показано, что с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 на основе клеточной линии 293FT впервые была получена панель изогенных клеточных линий человека неопухолевого происхождения, дефицитных по генам системы BER: *APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*, и по комбинации генов *APEX1 APEX2*, а также клеточная линия A549, дефицитная по гену *OGG1*. Показано, что устойчивость клеток 293FT к алкилирующему агенту метилметансульфонату зависит от наличия функциональной апурин-апиримидиновой (АП-) эндонуклеазы *APEX1* и ДНК-полимеразы β , но не от минорной АП-эндонуклеазы *APEX2*. Установлено, что устойчивость к окисляющим агентам $KBrO_3$ и H_2O_2 не зависит от активностей *APEX1*, ДНК-полимеразы β и аденин-ДНК-гликозилазы *MUTYH*. Интерес представляют результаты, показавшие, что нуклеотидные замены с.613C>T, с.614A>C, с.617C>A и с.619G>C в кодирующей последовательности гена зеленого флуоресцирующего белка (*EGFP*) приводят к синтезу нефлуоресцирующих

вариантов белка Q205*, Q205P, S206Y и A207P соответственно. Это позволяет детектировать события транскрипционного мутагенеза, т.е. ошибочного включения рибонуклеотидов РНК-полимеразой в ходе транскрипции. Представлены результаты, показавшие, что в клетках человека существуют дублирующие системы репарации АП-сайтов, независимые от основной АП-эндонуклеазы APEX1. Наконец, было установлено, что при отсутствии активности APEX1 АП-лиазная активность бифункциональной ДНК-гликозилазы NTHL1 способна расщеплять АП-сайты, образовавшиеся после действия монофункциональных ДНК-гликозилаз.

В разделе «Заключение» на основании всех экспериментальных данных подводится итог исследования о том, что полученные клеточные линии человека, дефицитные по генам BER, являются подходящей моделью для изучения механизмов репарации ДНК.

В разделе «Выводы» приведены пять утверждений, которые являются обоснованными и полностью соответствуют поставленным целям и задачам.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 4-х всероссийских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных разделах работы и полученных результатов.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Ким Д.В. у меня нет. При ее прочтении у меня появились небольшие замечания и вопросы для научной дискуссии:

1). Хотелось бы знать мнение автора, в чем преимущество использования технологии CRISPR/Cas9 в сравнении с нокаутными технологиями (клонирование, направленный мутагенез и др.). Какие проблемы могут возникнуть при использовании CRISPR/Cas9?

2) В работе не обсуждается, для чего оценивалась продолжительность стадий клеточного цикла.

3) В тексте есть неудачные выражения, иногда затрудняющие понимание смысла: на стр. 6 можно прочесть: «..популярных клеточных линий неракового происхождения» или «..определен генотип этих линий по целевым генам» (с. 7). На стр. 12 можно прочесть «.. белок неправильно направляется к митохондриям», на стр. 14 «.. неправильное метилирование промоторов».

4) Возник вопрос дискуссионного характера: как часто встречаются альтернативные пути репарации ТНФ-аддуктов и АП-сайтов в клетках, дефицитных по APEX1, и что это за системы?

Все указанные замечания не снижают значимости диссертационной работы и моей высокой оценки выполненного исследования.

Заключение. Работа Ким Д.В. соответствует 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. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Ким Дарья Вячеславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — “молекулярная биология”.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
доктор биологических наук, профессор

Гуляева Людмила Федоровна

Дата: «25» января 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7(913)9161272, e-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.03 – Молекулярная биология и 03.01.04 – Биохимия.

Адрес места работы: 630117, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12, тел.
8(383)334-88-40

Подпись д.б.н., профессора Л.Ф. Гуляевой

Заверяю:

Ученый секретарь

ФГБНУ ФИЦ ФТМ

д.б.н.

Пальчикова Наталья Александровна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Адрес:
630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Тимакова 2, Тел. 8383
333-65-37, E-mail: director@frcftm.ru, <http://www.frcftm.ru>.

Дата: «25» января 2024 г.

Личную подпись Гуляевой Л.Ф. заверяю
Пальчиковой Н.А.
Вер. отдела кадров ФИЦ ФТМ
"25" января 2024 г. подпись Е.С. Велицкая

