

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

КИМ ДАРЬИ ВЯЧЕСЛАВОВНЫ

на тему «Получение и характеристика линий клеток человека, дефицитных по генам эксцизионной репарации оснований, с помощью системы CRISPR/CAS», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

1.5.3. – Молекулярная биология

Актуальность избранной темы

В течение жизни человека постоянно происходит воздействие эндогенных и/или экзогенных факторов на его геном, ведущее к повреждениям в ДНК, которые без соответствующей корректировки могут провоцировать злокачественную трансформацию и рост клеток. Исправлением таких повреждений занимаются системы репарации клетки. Поэтому, исследование вклада нарушений системы эксцизионной репарации нуклеотидов (BER) в развитие онкологических заболеваний крайне актуально. Основным подходом, который традиционно применяли для изучения вклада дисфункциональных белковых факторов и ферментов системы BER в развитие заболеваний, было создание нокаутных по этим белкам клеточных и мышинных моделей. Также описаны клеточные линии, полученные из тканей пациентов с диагностированной недостаточностью репарации BER. Как правило, опухолевые клетки имеют множественные и/или комплексные нарушения контроля гомеостаза и пролиферации, и дополнительная инактивация генов BER не вполне корректно будет отражать ранние стадии заболевания. Поэтому, использование для нокаута генов BER здоровых клеток человека предпочтительно. Получение целой панели клеточных линий, нокаутных по одному или нескольким генам BER, позволит более корректно проводить исследования по выявлению новых механизмов репарации и проводить тестирование генотоксичности новых лекарственных средств.

Именно поэтому, получение панели изогенных клеточных линий, нокаутных по одному или нескольким генам BER, которому посвящена работка Ким Д.В., является актуальной задачей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация Ким Д. В. построена по стандартной схеме, и содержит все необходимые разделы: обзор литературы, материалы и методы исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы.

Работа изложена на 144 страницах, содержит 70 рисунков и 3 таблицы; список цитируемой литературы включает 504 источника.

Основной целью исследования было получение и характеристика клеточных линий, дефицитных по некоторым генам системы репарации человека с демонстрацией их потенциала как моделей для исследования репарации ДНК. Для достижения поставленной цели Дарьей Вячеславовной были сформулированы 4 задачи, которые были успешно решены, что отражено в выводах.

Обзор литературы посвящен описанию механизма репарации BER, основным ферментам, участвующим в этом процессе и существующим клеточным моделям с дефектами системы репарации BER. Кроме того, обзор литературы дает представление о возможностях геномного редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9. Таким образом, обзор позволяет оценить актуальность и значимость исследования, представленного в диссертационной работе, а также соответствие выбранных методов для решения поставленных задач. Обзор написан по 462 первоисточникам, многие из которых - это работы последних 5 лет, что делает его актуальным. Обзор хорошо проиллюстрирован как химическими схемами реакций, катализируемыми ферментами BER, так и упрощенными схемами, отражающими особенности взаимодействия ферментов с субстратами, что облегчает восприятие материала.

Методологически работа выполнена с применением самых современных экспериментальных методов – методов редактирования геномов эукариот с помощью системы CRISPR/Cas9, методов направленного мутагенеза, секвенирования, проточной сортировки клеток и моноклонирования, функционального анализа, а также методов биоинформатического анализа на всех стадиях исследования. Объем проделанной экспериментальной работы и разнообразие методов впечатляют. Качество полученных в работе результатов характеризует Ким Дарью Вячеславовну как сложившегося специалиста в области молекулярной и клеточной биологии.

В главе Результаты и обсуждение выделены 4 основных блока. Первый блок посвящен описанию получения всех нокаутных по белкам BER клеточных линий. Во втором блоке проведена функциональная и фенотипическая характеристика полученных клеточных линий. Третий блок описывает получение новой репортерной системы для исследования репарации *in vivo*, а четвертый блок аккумулирует полученные клеточные линии и репортерные конструкции для исследования процессов репарации. Таким образом, все блоки взаимосвязаны, а исследование производит впечатление цельного и законченного.

Положения диссертации четко сформулированы и полностью подкреплены полученными результатами. Одним из наиболее интересных результатов исследования

является демонстрация активации компенсаторных или дублирующих механизмов в отсутствие основных ферментов репарации. Впервые продемонстрирована роль АП-лиазной активности ДНК-гликозилазы NTHL1 в репарации AP-сайтов в отсутствие AP-эндонуклеазы APEX1.

Помимо выявленных новых особенностей функционирования системы BER и теоретической значимости, работа Ким Д.В. имеет практическую значимость. Полученные клеточные линии, нокаутные по генам *APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*, могут быть использованы другими исследователями, работающими в области репарации, онкологии, нейрологии и геронтологии. Разработанная Дарьей Вячеславовной система на основе флуоресцентного белка EGFP для детектирования событий транскрипционного мутагенеза, усиленного, в том числе, дефектами системы репарации, также может быть полезна для ученых, изучающих процессы транскрипции и репликации.

Выводы, сформулированные в работе Ким Д.В., основаны на полученных результатах. Автореферат отражает все основные результаты исследования, представленные в диссертации.

Достоверность и новизна полученных результатов

Достоверность полученных в работе результатов подтверждена результатами статистической обработки данных, в которой были учтены показатели нескольких повторов экспериментов. По результатам работы опубликованы 3 статьи в высокорейтинговых рецензируемых журналах (все относятся к Q1).

Результаты, полученные по каждой из поставленных в исследовании задач, обладают высокой степенью новизны. В работе впервые создана изогенная панель клеточных линий человека неопухолевого происхождения на основе клеток H293TF, нокаутных по нескольким генам системы BER. Впервые обнаружено несколько новых вариантов белка EGFP с аминокислотными заменами в районе с.607 - с.625, приводящих к потере флуоресценции. Впервые продемонстрирована дублирующая роль АП-лиазной активности ДНК-гликозилазы NTHL1 в репарации AP-сайтов в отсутствие AP-эндонуклеазы APEX1.

Результаты, представленные в диссертационной работе, являются новыми и имеют большой потенциал для клеточной биологии, молекулярной и нейрологии. Данные, полученные Ким Д.С. с соавторами о существовании компенсаторной активации дублирующих путей репарации при инактивации APEX1, высокую теоретическую значимость работы.

Замечания

В результате прочтения работы возникли небольшие замечания, которые имеют дискуссионный или технический характер и не уменьшают значимость исследования:

- На Рисунке 13 приведены расчетные значения целевой активности и специфичности sgРНК, но не описано как их рассчитывали и сами они не обсуждены.

- Хотелось бы узнать мнение автора работы, почему эффективность системы CRISPR/Cas9 с использованием трех выбранных sgРНК для гена *APEX1* была 15%, а для гена *APEX2* 48,9%?

- Рисунок 18 недоработан и мало информативен: не указаны длины усеченных белков на схеме, но обозначен домен EEP, который не обсужден в тексте.

- Не указано, на какой район мРНК *APEX1* были направлены праймеры при определении относительного уровня экспрессии гена в клетках дикого типа и нокаутах.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют научной ценности полученных данных и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Ким Дарьи Вячеславовны на тему: «Получение и характеристика линий клеток человека, дефицитных по генам эксцизионной репарации оснований, с помощью системы CRISPR/CAS» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научно-практическое значение. По своей актуальности, новизне, уровню проведенных исследований и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемых к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Ким Дарья Вячеславовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3. — Молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии



Коваль Ольга Александровна

наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН), доктор
биологических наук (03.01.03 -Молекулярная
биология)

630090, г. Новосибирск,
пр. Ак. Лаврентьева, 8
телефон: 8 (383) 363-51-90
e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю

Учёный секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН

телефон: 8 (383) 363-51-55

e-mail: secretary@niboch.nsc.ru

дата отзыва: 31 января 2024 г.



Логашенко Е.Б.