

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Кузнецова Виталия Викторовича

«ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ДНК-

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА

АБЕРРАНТНОЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Определение структуры ДНК стало одним из основных открытий всей биологии, показав, что именно эта молекула хранит в себе всю генетическую информацию, передающуюся поколениям. В каждой клетке организма человека находится ДНК, одинаковая для всех клеток данного организма, но эти клетки очень различаются фенотипически и выполняют совершенно разные функции – от стволовых клеток, способных дифференцироваться в любые другие клетки, до самых сложных нейронов, практически не способных к делению, но передающих нервные сигналы. Именно эпигенетика определяет функции клеток и паттерн экспрессии всех генов человека в каждой конкретной клетке, что может быть определяющим фактором в процессе развития патологии. По сравнению с последовательностью ДНК, обладающей высокой статичностью, эпигенетический статус генома динамически варьирует в различных тканях. Метилирование ДНК уже долгое время признается важным фундаментальным механизмом эпигенетического контроля экспрессии генов. Оно играет важную роль во многих клеточных процессах, таких как транскрипция, геномный импринтинг и инактивация X хромосомы. Обнаружение эпигенетических аномалий, участвующих в появлении и развитии заболевания, является очень важным для разработки новых подходов к терапии, поскольку, в отличие от генетических мутаций, эпигенетические aberrации потенциально обратимы с помощью фармакологических агентов. Например, для восстановления нормальных эпигенетических паттернов могут использоваться ингибиторы ферментов, ассоциированных с эпигенетическими модификациями, таких как ДНК метилтрансферазы и гистоновые деацетилазы.

В этой связи диссертационная работа Кузнецова В.В., посвященная созданию олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека и изучению их влияния на aberrантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках, является весьма актуальной и своевременной.

Диссертация Кузнецова В.В., объемом в 131 страницу, содержащая 10 таблиц и 17 рисунков, построена в полном соответствии с рекомендованной структурой кандидатских диссертационных работ и состоит из введения, обзора литературы, раздела «материалы и

методы», результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списков используемых сокращений и цитируемой литературы, включающей 305 ссылок.

Во введении автором кратко описана основная проблематика исследования, обоснована актуальность проводимых исследований, четко сформулированы цель и задачи. Обзор литературы является компетентным введением в экспериментальную часть. В нем детально рассмотрена роль метилирования ДНК в различных клеточных процессах, функции ДНК-метилтрансфераз млекопитающих и их ингибиторов. Особое внимание уделено описанию современных подходов к изучению метилирования ДНК и показаны ограничения существующих подходов. Обзор написан достаточно хорошим языком и оформлен иллюстративным материалом.

В разделе «Материалы и методы» диссертант с исчерпывающей полнотой описывает методы, использованные при выполнении данной работы. Эта внушительная методическая часть характеризует автора как зрелого исследователя, способного эффективно использовать большой арсенал современных молекулярно-генетических, инструментальных и теоретических методов. Используемые автором методы современны и адекватны поставленным задачам.

Раздел «Результаты и обсуждение» можно разделить на две большие части. Первая часть посвящена дизайну олигонуклеотидных, специфически ингибирующих Dnmt1, изучению их локализации в клетках млекопитающих при трансфекции, а также оценке токсичности и ингибиторных свойств. В ходе работы, на основе базовой последовательности GAAATGGATCCGCTCTAAACTG, автором было синтезировано множество олигонуклеотидов различной структуры – одноцепочечные, шпилечные и двуцепочечные. В ходе работы автор показал, что наибольший ингибирующий эффект проявляли олигонуклеотиды, у которых сочетались несколько модификаций базовой последовательности, а именно введение в структуру ингибитора высокоаффинных аналогов цитозина, наличие неспаренных оснований в сайте узнавания двуцепочечная или шпилечная структура и замена фосфатов на фосфотиоаты. Поскольку C:A некомплементарность снижает IC₅₀ почти в три раза при сопоставимой эффективности ингибирования дальнейших экспериментах на раковых клетках, автор использовал структуры с неспаренными основаниями в сайте-мишени Dnmt1, дополнительно модифицировав все фосфаты в фосфотиоаты для защиты от экзо- и эндонуклеазной активности ферментов клетки. При изучении локализации олигонуклеотидных ингибиторов метилтрансфераз, автор показал их локализацию, в том числе в ядрах клеток раковых линий человека, т.е. непосредственно в том компартменте, где происходит реакция метилирования ДНК. При оценке цитотоксического действия олигонуклеотидных ингибиторов Dnmt1 в отношении клеточных линий HeLa, CaSki и L-68 автор показал, что

они обладают хорошим терапевтическим потенциалом, имея значения TC_{50} в отношении раковых клеток, более чем в 100 раз превосходящие контроль.

Вторая большая часть раздела посвящена выбору метода для анализа статуса метилирования ДНК и анализу изменения метилирования генов-онкосупрессоров при обработке клеток раковых линий отобранными ранее олигонуклеотидными ингибиторами метилтрансфераз. Для анализа метилирования промоторов генов *CDKN2A*, *DAPK*, *MGMT*, *RARB* и *RASSF1* автор использовал метод GLAD-ПЦР, обладающий рядом несомненных преимуществ перед классическими методами анализа метилирования с помощью бисульфитной конверсии ДНК – простота, скорость и чувствительность. Метод основан на использовании метилзависимых (MD) эндонуклеаз, которые специфически фрагментируют только метилированную ДНК с последующим лигированием адаптеров и ПЦР. Автор показал, что регуляторные районы генов *DAPK* и *RASSF1A* оказались неметилированными в обеих клеточных линиях (HeLa и CaSki), а промотор гена *MGMT* метилирован только в клетках линии CaSki. В ходе исследований уровня метилирования промоторов генов *CDKN2A*, *RARB* и *MGMT* в клетках карцином шейки матки до и после обработки синтетическими олигонуклеотидами, автор выявил значительное (72-90 %) деметилирование изучаемых сайтов, таким образом, показав, что отобранные им олигонуклеотидные ингибиторы Dnmt1 позволяют снизить метилирование ДНК генов-онкосупрессоров, что еще раз подтверждает их терапевтический потенциал.

Диссертация завершается выводами, которые полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам. По результатам проведенной работы соискателем сделаны пять выводов. Все результаты работы тщательно проанализированы и, несомненно, подтверждают обоснованность выводов, сделанных В.В. Кузнецовым в диссертации.

Практическая значимость работы не вызывает сомнений - полученные данные о высокой ингибирующей активности полученных олигонуклеотидных ингибиторов в сочетании с их устойчивостью к действию клеточных экзо- и эндонуклеаз и низкой токсичностью в отношении нераковых клеток позволяют надеяться на получение новых эффективных противоопухолевых препаратов.

Однако к диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. Обзор литературы имело бы смысл слегка переформатировать – начать с биологической роли метилирования ДНК, а потом уже переходить у ферментам, осуществляющим данную модификацию.

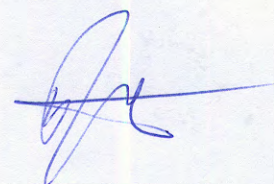
2. Деметилирование промоторов генов онкосупрессоров конечно важная предпосылка для начала их экспрессии, однако было бы целесообразно подтвердить увеличение количества РНК генов *CDKN2A*, *RARB* и *MGMT* с помощью количественной ПЦР при обработке клеток ингибиторами Dnmt1

В целом можно заключить, что диссертационная работа хорошо оформлена. Основные результаты проведенных исследований проиллюстрированы рисунками, результирующими таблицами и схемами. Высказанные в отзыве замечания не носят принципиального характера и не снижают высокой научной значимости полученных результатов.

Содержание автореферата и опубликованных автором оригинальных работ полностью отражают основные положения диссертации. Выводы конкретны, обоснованы приведенными результатами и не вызывают сомнений. В целом, диссертационная работа В.В. Кузнецова безусловно является важным и оригинальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Результаты выполненной работы представляют серьезный практический интерес для получения лекарственных форм для терапии онкологических заболеваний.

Таким образом, диссертационная работа Кузнецова Виталия Викторовича «ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА И ИХ ВЛИЯНИЕ НА АБЕРРАНТНОЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В РАКОВЫХ КЛЕТКАХ» по своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология», а ее автор, Кузнецов В.В. безусловно заслуживает присуждения искомой степени.

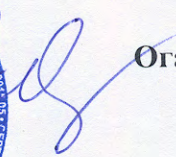
Заведующий лабораторией Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Кандидат биологических наук, доцент



Брускин С.А.

Подпись
удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН,
Доктор биологических наук



Огаркова О.А.

8 сентября 2015г.