

УТВЕРЖДАЮ:

И. о. генерального директора
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

канд. мед. наук, доцент

В.Н. Михеев

2015 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Диссертация «Олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека и их влияние на аберрантное гиперметиличивание ДНК в раковых клетках» выполнена в отделе разработки средств ПЦР диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

В период подготовки диссертации соискатель Кузнецов Виталий Викторович работал в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» в отделе разработки средств ПЦР диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний в должности научного сотрудника.

В 2007 г. окончил Новосибирский государственный университет по специальности «Биология» со специализацией «**Медицинская биология**».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов № 324 выдано 02.04.2015 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Научный руководитель: д-р биол. наук, **Нетесова Нина Александровна**, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», отдел разработки средств ПЦР диагностики вирусных и риккетсиозных заболеваний, заведующий отделом.

По итогам обсуждения принято следующее заключение: диссертация, выполненная Кузнецовым В. В. «Олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека и

их влияние на aberrантное гиперметилирование ДНК в раковых клетках», является самостоятельной законченной работой, посвященной конструированию высокоаффинных ингибиторов Dnmt1, исследованию их способности ингибировать процесс метилирования ДНК *in vitro* и подавлять жизнедеятельность раковых клеток, для которых показана гиперэкспрессия Dnmt1 и нарушения системы метилирования. По своей актуальности, новизне полученных результатов и ценности для науки и практики диссертация Кузнецова В. В. соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Все основные эксперименты, представленные в работе, а также анализ полученных данных выполнены автором лично. Дизайн олигонуклеотидных ингибиторов проводился совместно с к.б.н. А.А. Евдокимовым (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»).

Степень достоверности результатов проведённых исследований. Результаты получены с использованием современных молекулярно-биологических и микробиологических методов исследования и сертифицированного оборудования. Качество проведенных экспериментов подтверждалось контрольными образцами и повторами. При теоретическом анализе достоверность полученных результатов проверялась с использованием нескольких методов. Выводы основаны на достаточном экспериментальном материале и являются логическим завершением диссертационной работы.

Научная новизна работы. В данной работе впервые получены высокоаффинные ингибиторы Dnmt1, сконструированные на основе выбранной базовой 22-звенной последовательности 5'-GAAATGGATCCGCTCTAAACTG-3' (и комплементарной ей цепи).

Установлено, что в условиях эксперимента выбранные ОДН характеризуются высокой проникающей способностью и устойчивостью в ядрах опухолевых клеток.

Показано, что полученные синтетические структуры обладают способностью эффективно подавлять рост клеточных культур карциномы шейки матки в сочетании с низкой токсичностью в отношении нераковых клеток.

Для оценки деметилирующего эффекта полученных ингибиторов применен метод GLAD-ПЦР анализа (GlaI digestion and Ligation Adapter Dependent ПЦР), впервые разработанный и запатентованный автором совместно с А.Г. Акишевым, к.б.н. М.А. Абдурашитовым и д.х.н., проф. С.Х. Дегтяревым.

Практическая значимость работы. Результаты, полученные при исследовании влияния ингибиторов Dnmt1 на аберрантное гиперметилование ДНК в клетках карциномы шейки матки, развивают современные представления о роли эпигенетических изменений в патогенезе злокачественных опухолей.

Полученные данные о высокой ингибирующей активности синтезированных ОДН в сочетании с их устойчивостью к действию клеточных экзо- и эндонуклеаз и низкой токсичностью в отношении нераковых клеток (индекс селективности > 100) позволяют рекомендовать данные соединения для дальнейших экспериментов с целью получения эффективных противоопухолевых препаратов.

Высокоспецифичный метод GLAD-ПЦР анализа может быть использован для типирования различных образцов ДНК, включая линии опухолевых клеток.

Высокая чувствительность GLAD-ПЦР, позволяющая детектировать порядка 20 пг метилированной ДНК среди суммарного пула, делает предложенный метод перспективным инструментом ранней диагностики злокачественных новообразований.

Специальность: 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа соответствует специальности молекулярная биология, п. 2 «Геномы, их структура и функция», п. 4 «Молекулярная биология клетки» и п. 5 «Молекулярная энзимология».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По материалам диссертации опубликованы четыре печатные работы (включая две в журналах, входящих в перечень ВАК) и два патента РФ. Также материалы работы были представлены на пяти российских и международных конференциях.

1. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Создание ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Достижения современной биотехнологии: Сб. науч. тр. / Под ред. проф. И. Г. Дроздова. – Новосибирск, 2008. – С. 264–270. (не входит в перечень ВАК)
2. Евдокимов А. А., Зиновьев В. В., Кузнецов В. В., Нетесова Н. А., Малыгин Э. Г. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы Dnmt1 человека // Сборник трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск, 2008. – С. 58
3. Evdokimov A. A., Kuznetsov V. V., Zinoviev V. V., Netesova N. A., Malygin E. G. Specific oligonucleotide inhibitors of the human DNA methyltransferase 1 // Russian-European

Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability International conference. – St. Petersburg, June 24–26, 2008.

4. Petruseva I. O., Khodyreva S. N., Nazarkina Z. K., Ilina E. S., Maltseva E. A., Malygin E. G., Zinov'ev V. V., Evdokimov A. A., Kuznetsov V. V., Lavrik O. I., Netesova N. A. Methylation as epigenetic factor in progression of human tumors associated with HPV infection. DNMT1 and DNA replication proteins - search for selective DNMT1 inhibitors // Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability International conference. – St. Petersburg, June 24 – 26, 2008.

5. Евдокимов А. А., Зиновьев В. В., Кузнецов В. В., Нетесова Н. А., Малыгин Э. Г. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43, №3. – С. 455-463.

6. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Акишев А. Г., Дегтярев С. Х., Нетесова Н. А. Влияние олигонуклеотидов-ингибиторов Dnmt1 человека на рост раковых клеток Hela и уровень метилирования генов-онкосупрессоров // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». 23-26 11.2010, Санкт-Петербург, Россия / под ред. А. П. Кудинова, Б. В. Крылова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. – 2010. – Т. 4 – С. 70-74.

7. Кузнецов В. В., Землянская Е. В., Дегтярев С. Х. GluI-qPCR анализ — новый инструмент количественной оценки метилирования ДНК и его применение для изучения генов-супрессоров опухоли // XXV Международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 11–15 февраля 2013 г. – С. 29.

8. Kuznetsov VV, Akishev AG, Abdurashitov MA, Degtyarev SKh GLAD PCR analysis of aberrant DNA methylation in cancer // Cell Symposia: Cancer Epigenomics 2013. Sitges, Spain. October 6-8, 2013. – P. 63.

9. Кузнецов В. В., Акишев А. Г., Абдурашитов М. А., Дегтярев С. Х. Способ определения нуклеотидной последовательности Pu(5mC)GPy в заданном положении протяженной ДНК // Патент РФ №2525710 C1, опубл. 20.08.2014, Бюл. № 23.

10. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Олигодезоксирибо-нуклеотидный ингибитор ДНК-метилтрансферазы 1 человека // Заявка на патент РФ №2014118673 от 13.05.2014, решение о выдаче патента от 24.03.2015.


11. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Олигонуклеотидные ингибиторы Dnmt1: Проникновение и ингибирование роста клеток Hela и Caski // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2015. – №1(29). – С. 155-163.

11. Кузнецов В. В., Евдокимов А. А., Нетесова Н. А. Олигонуклеотидные ингибиторы Dnmt1: Проникновение и ингибирование роста клеток Hela и Caski // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2015. – №1(29). – С. 155-163.

Диссертация «Олигонуклеотидные ингибиторы ДНК-метилтрансферазы 1 человека и их влияние на aberrантное гиперметилование ДНК в раковых клетках» Кузнецова Виталия Викторовича рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заключение принято на заседании объединённого научного семинара Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Присутствовало на заседании 30 чел. Результаты открытого голосования: за – 30; против – нет; воздержавшихся – нет, протокол № 52 от 26 марта 2015 г.

/  /

Локтев Валерий Борисович
д-р биол. наук, профессор
председатель научного семинара

/  /

Кононова Юлия Владимировна
канд. биол. наук
секретарь научного семинара

председатель научного семинара