

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
на соискание ученой степени кандидата химических
Сергеева Александра Вячеславовича
на тему «Влияние противоопухолевых препаратов, связывающихся с ДНК, на
функционирование ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a»
по специальности 02.00.10 – биорганическая химия (химические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа Александра Вячеславовича посвящена проверке гипотезы эпигенетического механизма действия ряда ДНК-связывающих низкомолекулярных соединений с противоопухолевой активностью. Более глубокое понимание путей влияния известных лекарственных препаратов на генную экспрессию и расширение соответствующей доказательной базы способствуют рациональному и обоснованному подбору терапевтических стратегий, что определяет высокую практическую значимость работы.

Эпигенетическая терапия онкологических заболеваний – сравнительно новое, но интенсивно развивающееся направление исследований. Оно предполагает корректировку генной экспрессии на эпигенетическом уровне, т.е. за счет изменения профиля метилирования ДНК, модификаций гистонов и т.д. Не исключено, что на эпигенетический профиль влияют и соединения, которые ранее позиционировались исключительно как ДНК-повреждающие агенты неспецифического действия. Прояснение этого вопроса актуально для современной медицины и имеет фундаментальную значимость.

Степень обоснованности и достоверности полученных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Сочетание нескольких механизмов противоопухолевого действия является несомненным преимуществом потенциального препарата. Известным примером являются кураксины, способные одновременно активировать экспрессию онкосупрессора p53 и подавлять экспрессию антиапоптотического ядерного фактора NF- κ B. Кроме того, важным фактором является универсальность противоопухолевого действия. Гиперчувствительность к повреждениям ДНК из-за активной пролиферации и нарушений системы репараций характерна для большинства опухолевых клеток. То же касается гиперметилирования промоторов генов онкосупрессоров при общем гипометилировании. На основании накопившихся данных о влиянии известных противоопухолевых агентов на структуру ДНК, данных о структуре комплекса *de-novo* ДНК-метилтрансферазы DNMT3a с мишенью и проч., Александр Вячеславович предположил, что активность ряда взаимодействующих с ДНК агентов отчасти обусловлена подавлением метилирования CpG. Оригинальность гипотезы определяет высокую новизну работы.

Экспериментальная проверка гипотезы была выполнена Александром Вячеславовичем для представителей трех типов ДНК-повреждающих агентов (нуклеозидные аналоги, бороздочные лиганды, интеркаляторы). Проверка потребовала дизайна модельной мишени (флуоресцентно меченого дуплекса с CpG-сайтами) и подбора удобного метода детекции метилирования. Отказавшись от использования труднодоступного меченого кофактора, диссертант опирался на различие в скоростях нуклеазного гидролиза метилированных/неметилированных дуплексов для мониторинга ингибирования DNMT.

Самым простым подходом виделось применение эндонуклеаз, расщепляющих метилированную ДНК (МЗ ЭР). Подход себя не оправдал, и вместо МЗ ЭР была использована эндонуклеаза, предпочтительно расщепляющая неметилированные фрагменты. Такой вариант не является радикально новым, но достаточно оригинален. Вкупе с двойным флуоресцентным мечением дуплекса он позволил добиться необходимой чувствительности. В итоге *in vitro* было показано подавление CpG-метилирования ДНК-связывающими соединениями. Эффект подтверждали дополнительно на клеточных линиях, анализируя прирост транскрипции подавленных в опухоли генов онкосупрессоров. Для прояснения механизма ингибирующего действия лигандов анализировали их влияние на связывание DNMT с мишенью и возможное влияние на формирование локального открытого состояния ДНК. Полученные результаты убедительны, подтверждают приведенные в работе выводы и подкреплены большим экспериментальным материалом.

Содержание диссертации

Диссертационная работа построена традиционно, состоит из введения, результатов и обсуждения, экспериментальной части и списка использованной литературы.

В главе “Введение” приведены цель и задачи исследования, обоснован выбор объектов, раскрыта актуальность и значимость работы, коротко описана методология и сформулированы положения, выносимые на защиту.

В главе “Обзор литературы” рассмотрены известные противоопухолевые препараты, действующие на геномную ДНК – нуклеозидные аналоги, бороздочные лиганды и интеркаляторы. Обсуждаются структурные особенности каждого типа соединений и предполагаемый механизм противоопухолевого действия; приводятся примеры конкретных соединений с обзором опубликованных данных по их активности и токсичности.

Глава “Обсуждение и результаты” начинается с краткого обзора ДНК-метилтрансферазы DNMT3a – ключевого объекта исследования – и получения функционально активного С-концевого домена данного фермента, а также отработки электрофоретического метода мониторинга ингибирования метилирования модельного дуплекса метилтрансферазой по эффективности нуклеазного гидролиза. С помощью этого метода показано, что на эффективность метилирования ДНК оказывают влияние 6-тиогуанин (нуклеозидный аналог), оливомицина А и его производное оливамид (бороздочные лиганды), а также кураксин CBL0137 (интеркалятор). Соединения проявляют преимущественно ингибирующую активность. Однако, механизм их действия, по-видимому, различен (частичное подавление связывания с ДНК или – в случае оливомицина/оливамида – подавление образования ковалентного интермедиата). На заключительном этапе для подтверждения выявленных эффектов Александр Вячеславович оценивал действие соединений на транскрипцию генов онкосупрессоров в клетках линии рака молочной железы. Как и ожидалось, обработка соединениями снизила уровень экспрессии метилированных в опухоли CpG, т.е. способствовала реактивации генов.

Экспериментальная часть содержит информацию об использованных реактивах, ферментах, олигонуклеотидах, а также достаточно подробное описание методов и экспериментальные протоколы. Список использованной литературы включает 130 источников.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Основные положения диссертационной работы раскрыты в 4 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus. Промежуточные результаты доложены на отечественных и международных конференциях

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат Александра Вячеславовича соответствует основным положениям диссертации; в автореферате отражены актуальность научной проблемы, степень разработанности темы, значимость исследования, методология и все ключевые результаты, представленные в диссертации.

Замечания по представленной работе

- 1) Работа обрела бы большую законченность, если бы исследования на модельном дуплексе были дополнены аналогичным экспериментом с последовательностью из промотора/энахансера онкосупрессора, гиперметиличированного в опухолевых клетках. В идеале это должны быть последовательности из цис-регуляторных элементов генов, реактивацию которых проверяли на завершающем этапе на клеточной линии MCF7. Биоинформатический анализ опубликованных ранее данных по метилированию промоторов выбранных генов в MCF7 (а также контрольной неопухолевой линии) был бы нелишним. Наконец, в тексте диссертации указано, что выбранные гены описаны в литературе как гиперметиличированные и транскрипционно молчащие, но ссылки не приведены.
- 2) Александр Вячеславович упоминает в обзоре литературы, что часть бороздочных лигандов и интеркаляторов может проявлять более или менее выраженную селективность к неклассическим структурам ДНК -- G-квадруплексам (G4). Учитывалось ли это в работе? Например, связывание кураксина с G4 описано недавно испанскими исследователями [Exploring the Interaction of Curaxin CBL0137 with G-Quadruplex DNA Oligomers. IJMS 2021, 22(12):6476]. Сродство к G4 может отчасти сказываться на профиле метилирования.
- 3) Насколько мне известно, нет прямых доказательств того факта, что кураксин CBL0137 является интеркалятором. Вероятно, этот вопрос заслуживает дальнейшего исследования. Подходящим методом представляется, в частности, анализ линейного дихроизма.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10. – «биоорганическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно приложениям №5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Сергеев Александр Вячеславович безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия (химические науки).

Официальный оппонент: доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории искусственного антителогенеза ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

ВАРИЖУК Анна Михайловна



12.09.2021

Адрес места работы: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Тел. +7 (499) 246-44-09; E-mail: annavarizhuk@rcpcm.org

Подпись Варижук А.М. заверяю

Т.Н. Грибова,

к.б.н., ученый секретарь

ФГБУ ФНЦ ФХМ ФМБА

