

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

Созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 октября 2022 г. № 25

о присуждении **Коваленко Татьяне Феликсовне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 15.08.2022 г. (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10) и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель - Коваленко Татьяна Феликсовна, 30 ноября 1975 года рождения. В 1999 году окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ранее – Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова) по специальности «фармация». Справка о сдаче кандидатских экзаменов получена в 2021 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Отдела функционирования живых систем ИБХ РАН. Диссертация выполнена в Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Отдела функционирования живых систем ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук Павлюков Марат Самвелович, ведущий научный сотрудник Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Отдела функционирования живых систем ИБХ РАН.

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Патрушев Лев Иванович.

Официальные оппоненты, Гаврилов Алексей Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией пространственной организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук и Карагяур Максим Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доцент кафедры биохимии и молекулярной медицины Факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина), г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном доктором медицинских наук, заведующим Лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Штилем Александром Альбертовичем и утвержденном директором НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, доктором медицинских наук, профессором, академиком РАН Стилиди Иваном Сократовичем, указала, что диссертационная работа Т.Ф. Коваленко является законченным научно-квалификационным исследованием и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (в том числе п. 9) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 18 опубликованных научных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 9 работ общим объемом 12 печатных листов в рецензируемых научных изданиях (входят в базы данных ELIBRARY, Scopus, Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Т.Ф. Коваленко внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. **Коваленко Т.Ф.** Метилирование генома млекопитающих. *Молекулярная медицина*. 2010; 6, 7 – 18.
2. **Коваленко Т.Ф.**, Сорокина А.В., Озолина Л.А., Патрушев Л.И. Метилирование 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* при раке и гиперплазиях эндометрия. *Биоорганическая химия*. 2013; 39 (4), 1 – 10.
3. **Т.Ф. Коваленко**, К.В. Морозова, Л.А. Озолина, И.А. Лапина, Л.И. Патрушев. Псевдоген *PTENP1*, в отличие от гена *PTEN*, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста. *Acta Naturae*. 2018; 10 (1), 13 – 21.
4. **Т.Ф. Коваленко**, Л.И. Патрушев. Псевдогены как функционально значимые элементы генома. *Биохимия*. 2018; 83 (11), 1643 – 1662.

5. Gularyan SK, Gulin AA, Anufrieva KS, Shender VO, Shakhparonov MI, Bastola S, Antipova NV, **Kovalenko TF**, Rubtsov YP, Latyshev YA, Potapov AA, Pavlyukov MS. Investigation of Inter- and Intratumoral Heterogeneity of Glioblastoma Using TOF-SIMS. *Mol Cell Proteomics*. 2020; 19(6): 960 - 970.

6. **Kovalenko TF**, Morozova KV, Pavlyukov MS, Anufrieva KS, Bobrov MY, Gamisoniya AM, Ozolinya LA, Dobrokhotova YE, Shakhparonov MI, Patrushev LI. Methylation of the *PTENP1* pseudogene as potential epigenetic marker of age-related changes in human endometrium. *PLoS One*. 2021; 16 (1), e0243093.

7. **Т.Ф. Коваленко**, Т.Д. Ларионова, Н.В. Антипова, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Роль некодирующих РНК в патогенезе глиальных опухолей. *Acta Naturae*. 2021; 13 (3), 28 – 41.

8. Т.Д. Ларионова, **Т.Ф. Коваленко**, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Прогностическая значимость белков-регуляторов сплайсинга РНК для пациентов с глиобластомой. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. 2022; 503 (1), 166 –171.

9. **Tatyana F. Kovalenko**, Bhupender Yadav, Ksenia S. Anufrieva, Yury P. Rubtsov, Timofey S. Zatsepin, Evgenya Y. Shcherbinina, Ekaterina M. Solyus, Dmitry B. Staroverov, Tatyana D. Larionova, Yaroslav A. Latyshev, Michail I. Shakhparonov, Amit Kumar Pandey and Marat S. Pavlyukov. Functions of Long Non-Coding RNA ROR in Patient-derived Glioblastoma Cells. *Biochimie*. 2022; 200, 131–139.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н. Гаврилова Алексей Александровича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) Хотелось бы видеть подробное описание ядерных функций белка PTEN в «Обзоре литературы». Здесь дается лишь беглое упоминание, что PTEN участвует в обеспечении правильной сегрегации хромосом, репарации и репликации ДНК и регуляции экспрессии генов.

2) В «Материалах и методах» или «Результатах» следовало бы объяснить дизайн праймеров и принцип метода метил-чувствительной ПЦР.

3) На с. 85 диссертации сказано, что метилирование выявлялось в 24% образцов нормального эндометрия, при этом число образцов составляло 69. 24% от 69 составляет 16.5. Выходит, метилирование наблюдалось у шестнадцати с половиной образцов. Это как? Аналогичные вычисления привели рецензента к осознанию, что на рис. 20 перепутаны цвета столбиков для второй и третьей возрастных групп. Автору диссертации следует более внимательно относиться к представлению данных.

4) На рис. 21 статистически недостоверное различие ($p=0.739$) помечено двумя звездочками. Обычно двумя звездочками отмечают значимое различие на уровне $p<0.01$. Выбранная символика неудачна и сбивает с толку без ознакомления с подрисуночной подписью. На рис. 31 с анализом данных РНК-сек нейросфер не расшифровано, что взято за единицу по осям.

5) Имеется вопрос относительно данных по направленному метилированию и деметилированию CpG островка гена PTENP1: проводился ли анализ статуса

метилирования в клетках, подвергнутых редактированию, с целью оценки, сработала ли система редактирования? Каков статус метилирования CpG-островка в клетках U87MG?

6) Касательно представления ChIP-seq данных по связыванию PTEN с хроматином, следовало бы также привести профиль отношения сигнала в преципитированной фракции к сигналу во фракции инпута.

7) Не ясна интерпретация результатов экспериментов по анализу уровня экспрессии linc-RoR в зависимости от стадии клеточного цикла (рис. 40). Анализировались клетки глиобластомы от двух пациентов. Диссертантка утверждает, что в обоих случаях наибольший уровень экспрессии отмечался в G2/M фазе клеточного цикла, тогда как по рисунку видно, что это справедливо только для линии 267, тогда как для линии 011 экспрессия выше в S фазе.

8) На рисунке 41, представляющем результаты визуализации linc-RoR в клетке, не хватает совмещения сигнала GFP и DAPI, а также изображений в фазовом контрасте, по которым было бы проще судить о границах клеток. По результатам, приведенным для интерфазы (левые фотографии), кажется, что сигналы DAPI и GFP не колокализуются, что вызывает недоумение. Автор, однако, описывает эти результаты как «в интерфазных клетках linc-RoR присутствует как в цитоплазме, так и в ядре». Просьба пояснить.

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Карагяура Максима Николаевича. Отзыв положительный. Содержит следующие замечания:

1) В плане более удобного одновременного описания нескольких объектов (например, карциномы и глиобластомы) хотел бы порекомендовать диссертанту начинать описание с общих черт данных объектов с последующим переходом на различия, детали и частности.

2) Большая часть работы проведена с клиническим материалом пациентов, в связи с этим возникает вопрос, было ли получено разрешение этического комитета на проведение работ с материалом пациентов? Есть ли согласия пациентов на работу с их биопсийным материалом?

3) ПЦР-скрининг колоний проводился с использованием прямого и обратного праймеров, комплементарных последовательности клонируемого фрагмента ДНК, что методологически неверно, поскольку один из праймеров должен распознавать последовательность вектора. В противном случае экспериментатор столкнется с обнаружением ложно положительных клонов. Еще одной методологической ошибкой данной работы является криоконсервация трансформированных штаммов *E. coli* (п. 2.2.6). Согласно нашим данным, концентрации глицерола выше 2.5% стимулируют интеграцию плазмидной ДНК или ее фрагмента в геном бактерии, что делает ее резистентной к антибиотикам и на порядок уменьшает выход плазмидной ДНК.

4) Каково функциональное значение роста метилирования CpG-островка *PTENP1* с возрастом? Является ли это компенсаторным механизмом защиты от малигнизации эндометрия? Есть ли данные о том, как влияет на метилирование CpG-островка *PTENP1* популярная сегодня гормональная заместительная терапия (проводили ли учет такой терапии при подборе экспериментальных групп)?

5) Одно из заключений ("Наши результаты показывают, что одним из механизмов, с помощью которых EGFR может влиять на пролиферацию клеток глиобластомы, является повышение уровня linc-RoR") показалось мне слишком радикальным и, с моей точки зрения, должно быть сформулировано менее радикально, поскольку прямого доказательства получено не было, а была обнаружена лишь корреляция.

6) Полученные результаты изложены четко и хорошо проиллюстрированы, однако в подписях к ряду рисунков (23, 26, 27, 29, 33, 35, 36, 38, 40) отсутствуют указания о количестве проведенных измерений (n) и о статистических различиях между группами. Под некоторыми рисунками не хватает расшифровки некоторых аббревиатур/названий белков и более подробного описания изображаемых механизмов. Для более полного понимания методологии данной работы не хватает карт собранных в рамках исследования генетических конструкций: pCDH-PTEN, pCDH-RoR, pCDH-RoR-12×MBS-PBS, pLKO.1-shRoR, pKAN-T-gRNA-PTENP1.

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) Возможно, достаточно сформулировать единую цель, а не выделять на две. То же справедливо для перечисления задач: их 10, тогда как целесообразно оставить не более 4-5, обобщив отдельные формулировки.

2) Требуется методическое пояснение эксперимента, в котором анализирована роль linc-RoR и пролиферативного антигена Ki-67 в отдельных фазах клеточного цикла. Автор указывает, что эти показатели изучены после сортировки клеток на основе окраски пропидия иодидом. Но пропидия иодид окрашивает лишь клетки с неповрежденной плазматической мембраной или ядра после лизиса клеток.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы (функции некодирующих РНК, эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, редактирование генома эукариот, молекулярные основы патогенеза онкологических заболеваний), что подтверждается сериями их публикаций в ведущих российских и зарубежных научных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской работы и высокой квалификацией, что позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отметил, что на основании выполненных соискателем исследований был впервые описан не известный ранее механизм регуляции транскрипции смысловой РНК псевдогена *PTENP1*, основанный на метилировании CpG-островка псевдогена и активности белка PTEN. Впервые было показано, что в нормальных и опухолевых тканях эндометрия частота метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* и уровень экспрессии его смыслового транскрипта (lncPTENP1-S) увеличиваются с возрастом пациенток. Кроме того, соискателем впервые продемонстрировано, что linc-RoR экспрессируется преимущественно в делящихся клетках, во время митоза локализован на хромосомах и может быть важен для регуляции митоза.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что результаты проведенной работы расширяют представления об онкосупрессорных и онкогенных некодирующих РНК, их клеточных функциях, механизмах действия и регуляции их экспрессии.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что эти исследования позволяют расширить спектр потенциальных мишеней для лечения онкологических заболеваний. Так, проонкогенные функции linc-RoR позволяют рассматривать эту длинную некодирующую РНК в качестве возможной мишени при лечении глиобластомы. Кроме того, выявление ассоциации метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* с более пролонгированной выживаемостью пациентов с карциномой эндометрия и глиомами позволяет рассматривать данную модификацию в качестве потенциального маркера более благоприятного прогноза при указанных заболеваниях.

Достоверность результатов исследования не вызывает сомнений. Исследование проводилось с использованием современных молекулярно-биологических, цитологических и культуральных методов. Экспериментальные данные были получены с применением достаточного количества повторов. Работа выполнялась на сертифицированном оборудовании. При анализе данных использовались современные методы обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в участии в планировании и проведении экспериментов, анализе и обработке полученных данных, представлении результатов работы на российских и международных конференциях, подготовке публикаций по теме исследования. Экспериментальные и теоретические исследования (за исключением РНК-секвенирования, которое проводилось сотрудниками Amity Institute of Biotechnology, Amity University Haryana, Panchgaon, Manesar, Haryana, India) проведены лично соискателем или при его непосредственном участии.

Диссертационный совет 24.1.037.01 постановил, что диссертационная работа Коваленко Татьяны Феликсовны является законченной научно-квалификационной работой, посвященной фундаментальным аспектам молекулярной биологии – установлению роли эпигенетических модификаций в регуляции экспрессии длинных некодирующих РНК, а также исследованию функций некодирующих транскриптов, значимых в патогенезе злокачественных опухолей человека. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа **Коваленко Татьяны Феликсовны** «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650, , 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) Каковы механизмы влияния linc-RoR на уровень белка p53? Связаны ли между собой эти механизмы?
- 2) Каковы причины того, что кривая выживаемости клеток глиобластомы с оверэкспрессией linc-RoR носит такой характер, как представлено на слайде?

Соискатель Коваленко Т.Ф. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) Linc-RoR влияет на уровень p53 опосредованно, за счет повышения уровня мРНК MDM2, который, в свою очередь, способствует деградации p53. Кроме того, мы показали, что linc-RoR снижает уровень мРНК самого p53. Связаны ли между собой эти два способа влияния, на данный момент не исследовано.
- 2) Причины подобного характера кривой не известны. Однако сам результат не вызывает сомнений у диссертанта, поскольку был подтвержден многократным повторением эксперимента.

На заседании 26.10.2022 г. диссертационный совет постановил за решение научной задачи по исследованию регуляции экспрессии и функций длинных некодирующих РНК, имеющей важное значение для развития молекулярной биологии, присудить Коваленко Татьяне Феликсовне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

27 октября 2022 г.