

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: +8(499)135-60-89, +8(499)135-98-84 Факс: +8(499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Коваленко Татьяны Феликсовны

«Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

подавляющая часть эукариотического генома транскрибируется с образованием РНК, кодирующих и некодирующих белок. Некодирующие РНК вовлечены в различные клеточные процессы как в цитоплазме, так и клеточном ядре. Локализованные в ядре длинные некодирующие РНК принимают участие в регуляции транскрипции, пространственной организации генома, функционировании и сборке ядерных компартментов, модуляции активности ферментов, дозовой компенсации, поддержании стабильности генома. Цитоплазматические некодирующие РНК регулируют стабильность мРНК, принимают участие в функционировании аппарата деления клеток, координируют работу сигнальных путей и межклеточную коммуникацию, регулируют работу практически всех цитоплазматических органелл. Специфические некодирующие РНК контролируют клеточную дифференцировку и процессы, связанные с определением клеточной судьбы. Оверэкспрессия, недостаток или мутации в генах длинных некодирующих РНК являются причиной различных, прежде всего онкологических, заболеваний человека. Все эти факты определяют высокую актуальность темы диссертационной работы Коваленко Т.Ф., которая посвящена исследованию длинных некодирующих РНК PTENP1 и Linc-RoR и их роли в патогенезе глиобластомы и карциномы эндометрия.

В работе сделан ряд ярких наблюдений, характеризующихся несомненной научной новизной. При исследовании статуса метилирования CpG-островка, локализованного в 5'-концевой части псевдогена некодирующей РНК PTENP1, обнаружена положительная корреляция между уровнем метилирования CpG-островка и уровнем экспрессии этой некодирующей РНК, что является необычным наблюдением, поскольку метилирование промоторных областей, как правило, сопряжено с дезактивацией транскрипции генов. Для проверки этого наблюдения проведены эксперименты по направленному метилированию и деметилированию CpG-островка псевдогена PTENP1 в различных клеточных линиях

человека, включая клетки глиобластомы, и подтверждено, что метилирование является положительным регулятором транскрипции в данном случае. Биоинформатический анализ и полученные данные позволили автору предложить молекулярный механизм регуляции транскрипции гена PTENP1. Согласно выдвинутой модели неактивный транскрипционный статус гена PTENP1 обеспечивается связыванием с его промоторной областью транскрипционного репрессора EZH2 при участии белков p53 и TET, тогда как метилирование CpG-островка препятствует связыванию репрессора и приводит к активации транскрипции гена PTENP1. Наряду с этим, Коваленко Т.Ф. осуществлен анализ баз данных по метилированию ДНК и выявлена взаимосвязь между повышенным уровнем метилирования гена PTENP1 и выживаемостью пациенток с карциномой эндометрия и глиобластомами, на основании чего сделан вывод о возможных онкосупрессорных функциях данной некодирующей РНК.

Во второй части работы Коваленко Т.Ф. изучает роль в патогенезе глиобластомой другой длинной некодирующей РНК, Linc-RoR. С использованием первичных культур клеток глиобластомы, культивируемых в виде нейросфер, автором продемонстрировано, что Linc-RoR способствует пролиферации раковых клеток, снижает их чувствительность к апоптозу и обеспечивает поддержание популяции раковых стволовых клеток, на основании чего сделан вывод об онкогенной роли Linc-RoR. Кроме этого, автором продемонстрировано, что Linc-RoR экспрессируется преимущественно в делящихся клетках, во время митоза локализован на хромосомах и может быть важен для регуляции митоза. В целом, результаты проведенной работы расширяют наши представления об онкосупрессорных и онкогенных некодирующих РНК, их клеточных функциях, механизмах действия и регуляции их экспрессии. Дальнейшая работа в этом направлении представляет ценность как для раскрытия механизмов развития онкологических заболеваний, так и для расширения спектра диагностических маркеров и терапевтических мишеней для их лечения.

Диссертационная работа включает Введение, «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и выводы. Работа изложена на 144 страницах, содержит 41 рисунок, 9 таблиц и 6 приложений. Список литературы насчитывает 186 источников. Работа обладает внутренним единством и согласованностью. Текст диссертации хорошо вычитан и практически не содержит орфографических или пунктуационных ошибок.

Обзор литературы состоит из трех частей. В первой части представлена общая характеристика и классификация длинных некодирующих РНК, рассмотрены особенности их биогенеза и процессинга, описаны их многочисленные функции в цитоплазме и клеточном ядре, в заключении собраны данные о роли некодирующих РНК в патогенезе онкозаболеваний, с акцентом на некодирующих РНК PTENP1 и Linc-RoR. Во второй и третьей частях литературного обзора описаны молекулярно-генетические аспекты

глиобластомы и карциномы эндометрия, соответственно. Обзор литературы написан лаконично и ясно, хорошо иллюстрирован и дает четкое представление об области исследования.

В «Материалах и методах» содержится описание использованных автором методик. Работа поражает разнообразием и современностью использованных методов. Диссертантка использует такие технически сложные методы как эпигенетическое редактирование с использованием системы CRISPR-dCas, оверэкспрессия и нокдаун с использованием лентивирусных конструкций, проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток, анализ внутриклеточной локализации РНК с помощью введения сайтов распознавания вирусных белков, сопряженных с флуоресцентными конъюгатами, метил-чувствительная ПЦР, РНК-сек и др. Большинство методик описано очень детально.

О результатах работы и их обсуждении уже говорилось выше. Данный раздел написан логично и четко. Автор обосновывает необходимость проведения каждой серии экспериментов и формулирует конкретные экспериментальные задачи. Все эксперименты хорошо продуманы, альтернативные интерпретации исключаются необходимыми контрольными экспериментами. Достоверность результатов не вызывает сомнений. В заключении дана общая характеристика работы и сформулированы основные выводы по результатам исследования. Цели диссертационной работы достигнуты, сделанные выводы полностью обоснованы и соответствуют целям и задачам исследования. Результаты работы опубликованы в 9 статьях в рецензируемых научных журналах, среди которых такие признанные журналы как Biochemie, PLoS One, Molecular and Cellular Proteomics. Результаты работы были доложены автором на многочисленных научных конференциях и симпозиумах. Это подтверждает актуальность и новизну проведенного исследования. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, включая постановку задач, основные результаты и их обсуждение.

По диссертационной работе имеется ряд мелких замечаний и вопросов:

- 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. Функции тезисно просуммированы на рисунке 11Б, но без описания в тексте это повисает в воздухе.
- 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.
- 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? Действительно ли в клетках SKBR-3 на целевом CpG-островке появлялось метилирование, а в клетках SKOV-3 исчезало? Каков статус метилирования CpG-островка в клетках U87MG и как он отвечает на направленное редактирование?
- 6) Касательно представления ChIP-seq данных по связыванию PTEN с хроматином (рис. 30), следовало бы также привести профиль отношения сигнала в преципитированной фракции к сигналу во фракции инпута, что позволило бы составить лучшее представление относительно наличия сайта связывания белка PTEN в пределах изучаемого CpG-островка.
- 7) На рис. 31 с анализом данных РНК-сек нейросфер не расшифровано, что взято за единицу по осям.
- 8) 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.
- 9) 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 вовсе, что вызывает недоумение. Автор, однако, описывает эти результаты как «в интерфазных клетках linc-RoR присутствует как в цитоплазме, так и в ядре». Просьба пояснить.

Все высказанные замечания и вопросы, однако, не носят принципиального характера и не снижают высокой оценки работы. На основании анализа текста диссертации и автореферата можно заключить, что диссертационное исследование Коваленко Т.Ф. является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержатся решения нескольких задач, имеющих важное значение для развития молекулярной биологии и генетики. Учитывая актуальность темы исследования, объем проделанной работы, а также научно-

теоретическую и практическую значимость и новизну полученных результатов и выводов, полагаю, что представленная диссертационная работа «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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, Коваленко Татьяна Феликсовна, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
заведующий Лабораторией
пространственной организации генома
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
E-mail: aleksey.gavrilov@mail.ru
Тел.: 8(499)135-97-87

Гаврилов Алексей Александрович



5 октября 2022 года



подпись Гаврилова А.А.
ЗАВЕРЯЮ
ученый секретарь ИБГ РАН Набирошкина Е.Н.