



**МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
МЕДИЦИНСКИЙ
НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР**

Ломоносовский проспект, д.27 кор.10,

Москва, 119991

тел.: 8 (495) 531-27-72

e-mail: info@mc.msu.ru

10.10.2022 № 467-22/237-03

На № _____

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Коваленко Татьяны Феликсовны** на тему «**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"

Актуальность темы исследования

Диссертация Т.Ф. Коваленко посвящена изучению механизмов участия длинных некодирующих РНК в различных аспектах канцерогенеза: возникновения и прогрессии опухоли, а также молекулярно-биологических основ химио- и радиорезистентности опухолей. Множество данных последних лет указывает на то, что тонкая регуляция работы генома, клеток и ткани осуществляется при активном участии микроРНК, длинных некодирующих РНК (днРНК) и ряда других некодирующих РНК. Изменение последовательности или уровня экспрессии некоторых ключевых некодирующих РНК (нкРНК) может служить триггером к изменению поведения клетки, в том числе к ее озлокачествлению. В этом контексте идентификация новых нкРНК, установление их функций и молекулярных партнеров являются важной задачей для более полного понимания физиологических и патологических процессов, происходящих в отдельных клетках и тканях. Накопление таких данных позволит идентифицировать новые диагностические и прогностические маркеры, и даже новые терапевтические мишени в онкологии. Проведение таких исследований является необходимым условием для перехода к высокотехнологичной и персонализированной медицине.

Актуальность данного исследования все больше возрастает с увеличением средней продолжительности жизни, ухудшением экологии и ростом стандартов оказания медицинской помощи.

Научная новизна исследований и полученных результатов

Область науки, изучающая функции некодирующих РНК, в настоящее время активно развивается и пул данных о роли нкРНК в развитии патологических процессов постоянно растет. В то же время данная область исследований достаточно «молодая», что оставляет широкий простор для открытий и интересных находок. Диссертационная работа Т.Ф. Коваленко является тому примером. В ходе выполнения работы были применены современные молекулярно-биологические методы (оверэкспрессия гена, технологии шпилечных РНК, CRISPR/Cas9 и флуоресцентного мечения РНК-транскриптов), позволившие установить функциональное значение и механизмы регуляции днРНК *PTENP1* и *linc-RoR* в патогенезе опухолевых заболеваний.

На момент начала проведения данного исследования из литературы было известно о ряде функций транскриптов *PTENP1* (*lincPTENP1-S* и *lincPTENP1-AS*) и *linc-RoR* в ряде типов опухолей, однако механизмы регуляции экспрессии этих транскриптов, их влияние на прогрессию и тяжесть течения опухолей, механизм этого влияния (на примере, глиобластомы и карциномы эндометрия) были практически не исследованы. Т.Ф. Коваленко было проведено исследование, в результате которого впервые было установлено, что метилирование CpG-островка *PTENP1* и наличие функционально активного белка *PTEN* являются необходимым условием для эффективной экспрессии *lincPTENP1-S* в ткани эндометрия, причем было установлено, что уровень метилирования CpG-островка и экспрессия *lincPTENP1-S* в ткани нормального эндометрия с возрастом увеличивается. У пациентов с карциномой эндометрия и глиомами повышенный уровень метилирования и экспрессии псевдогена коррелировал с более длительной выживаемостью пациентов. В работе Т.Ф. Коваленко впервые было показано, что повышение экспрессии днРНК *linc-RoR* усиливает пролиферацию раковых клеток, снижает их чувствительность к апоптозу под действием радиотерапии и химиотерапии, а также обеспечивает поддержание популяции стволовых раковых клеток глиобластомы, что позволяет рассматривать уровень экспрессии *linc-RoR*, как один из прогностических критериев при глиобластомах. Помимо этого, впервые было показано, что днРНК *linc-RoR* является одним из эффекторов сигналинга через *EGFR*, стимулирует митоз в раковых клетках и в ходе митоза локализуется вблизи хромосом (предположительно, принимает участие в расхождении хромосом).

Достоверность результатов и обоснованность выводов и рекомендаций

Достоверность полученных в этой работе результатов в первую очередь обусловлена адекватным использованием современных молекулярно-биологических, цитологических и культуральных методов. Необходимо отметить чрезвычайную методичность и тщательность в выполнении работы. Во всех разделах работы были поставлены адекватные контроли, а проведение достаточно большого количества дополнительных (дублирующих) экспериментов позволили ответить на все возникающие в ходе ознакомления с работой вопросы. Достаточное количество повторов и адекватная статистическая обработка полученных результатов делают полученные результаты надежными и достоверными.

Материалы исследования были представлены на 4 всероссийских и 4 международных конференциях. По материалам диссертации было опубликовано 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК (из них 8 из списка WoS или Scopus).

Выводы и основные положения диссертации, вытекают из полученных данных и достаточно хорошо аргументированы.

Практическая значимость полученных результатов

Результаты, полученные диссертантом, расширяют представления о механизмах эволюции опухолей и образования стволовых клеток опухоли, о механизмах развития химио- и радиорезистентности, а также о роли днРНК в этих процессах. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы Т.Ф. Коваленко, также позволяют дополнить образовательные курсы по молекулярной онкологии и раздела молекулярной биологии, изучающего некодирующие РНК и их роль в регуляции транскрипционной программы клетки.

Данное исследование важно не только для развития фундаментальных представлений в онкологии и молекулярной биологии, а также для решения ряда практических задач в онкологии: разработки эффективных подходов к диагностике онкологических заболеваний, прогнозированию их течения, выбора эффективной персонализированной терапии и поиска новых терапевтических мишеней. Полученные в работе данные могут быть рекомендованы в качестве отправной точки для проведения дальнейших исследований механизмов канцерогенеза и прогрессии опухолей, а также основы для разработки подходов высокоэффективной персонализированной терапии онкологических заболеваний.

Содержание работы

Диссертация Т.Ф. Коваленко изложена на 144 страницах. Она состоит из стандартных разделов: Введение, Цели и задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и их обсуждение (две подглавы), Заключение, Выводы и Приложение. Диссертация проиллюстрирована 41 рисунком (и еще 5 в Приложении), некоторые из которых

состоят из нескольких отдельных частей. Список литературы включает около 186 источников (из них 1 на русском языке).

Название работы, вынесенное на титульную страницу, в целом отражает содержание диссертации. Во "Введении" Т.Ф. Коваленко кратко изложила актуальные проблемы современной онкологии (на примере, глиобластомы и карциномы эндометрия), а также отразила прогресс в понимании роли днРНК в развитии онкологических заболеваний. Наличие целого ряда нерешенных задач в области молекулярной онкологии позволили высказать гипотезу о роли и механизмах влияния транскриптов *PTENP1* и linc-RoR в прогрессии и эволюции опухолей (на примере, глиобластомы и карциномы эндометрия), а также о механизме регуляции экспрессии данных днРНК в норме и при патологии. В завершении "Введения" Т.Ф. Коваленко четко сформулировала цели исследования и экспериментальные задачи, которые она далее решила в своем исследовании.

Обзор литературы в диссертации Т.Ф. Коваленко занимает 41 страницу и содержит три раздела. Обзор написан хорошим языком, отличается четкостью изложения и свидетельствует о глубоком знании предмета диссертантом. В первом разделе обзора литературы приведены сведения о длинных некодирующих РНК в физиологических и патологических процессах. Особое внимание уделено изложению известных механизмов участия днРНК псевдогена *PTENP1* и linc-RoR в прогрессии опухолей. Эти данные значительно облегчают понимание экспериментальной части работы, что делает полностью оправданным их включение в теоретическую часть. На основании изложенного диссертант делает выводы о сложности механизмов участия днРНК в процессах канцерогенеза и о необходимости изучения этих механизмов с целью разработки диагностических и прогностических инструментов для онкологии.

Второй и третий раздел обзора литературы посвящены молекулярно-генетическим аспектам таких опухолевых заболеваний, как глиобластома и карцинома эндометрия. Т.Ф. Коваленко приводит сведения мировой литературы об известной роли днРНК в развитии этих заболеваний и приходит к обоснованному выводу, что механизмы регуляции экспрессии днРНК псевдогена *PTENP1* и linc-RoR, механизмы их участия в прогрессии опухолей установлены неполно, а в ряде случаев имеющиеся данные противоречивы. Учитывая последние данные о ключевой роли днРНК в развитии и эволюции опухолей, тем самым диссертант подкрепляет необходимость более глубокого понимания механизмов молекулярного канцерогенеза и роли днРНК в этих процессах.

В целом обзор литературы, написанный Т.Ф. Коваленко, хорошо обосновывает собственное исследование и включает его в контекст мировых работ в данной области. В обзоре выдвинуты собственные предположения автора, сделаны необходимые обобщения, что позволяет считать обзор частью диссертации, имеющей самостоятельное значение и свидетельствующей о компетентности диссертанта в исследуемом им вопросе. Я бы рекомендовал диссертанту на основе обзора литературы подготовить обзорную статью, посвященную роли днРНК в процессах индукции и эволюции опухолей (включая сведения об известных механизмах развития химио- и

радиорезистентности). 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.

Глава **Материалы и методы** диссертации занимает 29 страниц. Она убедительно демонстрирует, что диссертант овладел самыми необходимыми методами современной молекулярной биологии: выделение нуклеиновых кислот, клонирование генов, оценка уровня метилирования геномной ДНК, направленное редактирование эпигенома с помощью системы CRISPR/Cas9, транскриптомный анализ и анализ уровня экспрессии и внутриклеточной локализации отдельных транскриптов, а также клеточными, биохимическими и биоинформатическими методами. Данный раздел содержит подробное описание использованных клеточных линий и оборудования, коммерческих наборов, антител и олигонуклеотидов, использованных растворов, буферов и сред. Методики описаны настолько подробно, что можно порекомендовать на будущее не расписывать стандартные протоколы или протоколы к коммерческим наборам, а сконцентрироваться на описании отличий/модификаций при реализации опубликованных/общедоступных протоколов. Используемые в диссертации методики современны и адекватны поставленным задачам.

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? Также при изучении диссертационной работы было выявлено несколько методических неточностей. Так, 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 с высокой долей вероятности 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 антибиотику и на порядок уменьшает выход плазмидной ДНК.

Глава, посвященная **результатам** собственного исследования и их обсуждению, занимает 35 страниц. Очевидно, что диссертант провел большую экспериментальную работу и получил внушительный объем данных о механизмах регуляции экспрессии днРНК псевдогена *PTENP1* и *linc-RoR*, о корреляции уровня экспрессии данных днРНК с тяжестью течения и формой онкологического заболевания, а также о механизмах участия этих днРНК в прогрессии и эволюции опухолей. Из текста диссертации видно, что Т.Ф. Коваленко тщательно подбирала образцы для анализа и уделяла особое внимание постановке всех необходимых контролей.

В работе было показано, что метилирование *PTENP1* может отражать возрастные изменения, происходящие в эндометрии после 45 лет, и косвенно указывать на приближение или начало менопаузы. В связи с этими результатами возникает ряд вопросов: 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)?

Важной находкой данной работы является установление роли PTEN и его физиологической функции в регуляции экспрессии собственного псевдогена. Т.Ф. Коваленко убедительно подтвердила этот факт с помощью восстановления экспрессии нормальной копии гена в клетках U87MG. В работе была лишний раз продемонстрирована сложность и неоднозначность эпигенетической регуляции работы генома: метилирование CpG-островка *PTENP1* при функциональной активности PTEN приводит к увеличению экспрессии смысловой днРНК *PTENP1 lncPTENP1-S*, причем это было установлено как для клеток карциномы эндометрия, так и для клеток глиобластомы. Для изучения роли метилирования CpG-островка псевдогена *PTENP1* были использованы модификации системы редактирования генома CRISPR/Cas9, позволяющие вносить направленные эпигенетические модификации в геном. Из полученных результатов вытекает предположение, что сама по себе степень метилирования CpG-островка *PTENP1* не может быть использована в качестве прогностического критерия: необходимо учитывать активность и уровень экспрессии PTEN, а, возможно, и других молекул.

Другой важной находкой является установление новых механизмов действия linc-RoR при глиобластоме, Т.Ф. Коваленко продемонстрирован один из возможных механизмов формирования стволовых клеток глиобластомы, а также развития радио- и химиорезистентности ее клеток, что может быть использовано для разработки перспективных подходов, сенсibiliзирующих опухолевые клетки перед химио- и лучевой терапией.

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.

Сразу при описании полученных результатов Т.Ф. Коваленко делает промежуточные выводы и заключения. Все заключения и выводы, сделанные диссертантом, логично вытекают из полученных результатов. Однако 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.

В тексте диссертации встречаются единичные орфографические ошибки, что допустимо при таком объеме печатного труда.

Отмеченные недостатки несколько не снижают качество исследований и не влияют на главные практические результаты диссертации.

Наиболее любопытными оказались полученные диссертантом данные о механизмах регуляции экспрессии онкосупрессорной днРНК lincPTENP1-S, а также данные о роли linc-RoR в образовании стволовых опухолевых клеток и развитии химио-/радиорезистентности глиобластомы, что позволяет рассматривать полученные результаты, как основу для последующих исследований, как фундаментальных, так и нацеленных на диагностику, прогнозирование развития и терапию опухолей. Это достоверные, важные и интересные данные, полученные впервые.

Выводов в диссертации 9, они в целом достоверны и логично следуют из приведенных экспериментальных данных. В то же время наблюдается некоторое несоответствие между формулировками поставленных задач и формулировками выводов. Особое внимание на себя обращает вывод 5, который подчеркивает новизну полученных данных, но не содержит экспериментально обоснованного заключения о взаимосвязи/корреляции изучаемых объектов и процессов.

Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами. Компьютерная печать четкая, текст достаточно хорошо выверен. Иллюстрации отличного качества. Ссылки на оригинальные исследования приведены в соответствии с текстом и по существу. Автореферат соответствует содержанию диссертации, содержит все необходимые разделы. Как уже было сказано, материалы исследования были представлены на 4 всероссийских и 4 международных конференциях, а по материалам диссертации было опубликовано 9 статей в журналах, входящих в перечень журналов и изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (из них 8 входят в научные базы WoS или Scopus).

Принципиальных замечаний по самой работе и по ее оформлению нет.

Заключение

Диссертация 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 специальностям 1.5.3 - "Молекулярная биология", является фундаментальной и законченной работой, которая полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук: (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 сам автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук.

Старший научный сотрудник
Института регенеративной медицины
Медицинского научно-образовательного центра
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова,
кандидат биологических наук

07 октября 2022 г.

Карагяур Максим Николаевич

Контактные данные:

телефон: +7(926)593-68-77

e-mail: m.karagyaur@mail.ru

адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д.27 кор.10,

Институт регенеративной медицины

Подпись Карагяура Максима Николаевича удостоверяю

Ученый секретарь
Медицинского научно-образовательного центра
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова,
д.м.н., профессор

Орлова Артуровна Анна

