

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН

26 октября 2022 года

Защита диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

**Коваленко Татьяны Феликсовны**

**По теме: «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование,  
экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы  
эндометрия»**

**Специальность 1.5.3 – «Молекулярная биология»**

Москва – 2022

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 26 октября 2022 года.

Председатель  
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.,

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 7.

- |     |                        |                                  |         |
|-----|------------------------|----------------------------------|---------|
| 1.  | Академик РАН, д.х.н.   | Мирошников Анатолий Иванович     | (1.5.6) |
| 2.  | Д.физ.-мат.н.          | Ефремов Роман Гербертович        | (1.4.9) |
| 3.  | Д.физ.-мат.н.          | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 4.  | Д.б.н.                 | Ажикина Татьяна Леодоровна       | (1.5.3) |
| 5.  | Д.х.н.                 | Безуглов Владимир Виленович      | (1.4.9) |
| 6.  | Д.х.н.                 | Белогуров Алексей Анатольевич    | (1.5.3) |
| 7.  | Академик РАН, д.х.н.   | Габибов Александр Габибович      | (1.5.6) |
| 8.  | Академик РАН, д.б.н.   | Деев Сергей Михайлович           | (1.5.3) |
| 9.  | Д.б.н.                 | Долгих Дмитрий Александрович     | (1.5.3) |
| 10. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович        | (1.5.6) |
| 11. | Д.б.н.                 | Зарайский Андрей Георгиевич      | (1.5.3) |
| 12. | Д.х.н.                 | Зубов Виталий Павлович           | (1.5.6) |
| 13. | Д.б.н.                 | Лебедев Юрий Борисович           | (1.5.3) |
| 14. | Д.х.н.                 | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 15. | Д.б.н.                 | Сапожников Александр Михайлович  | (1.5.3) |
| 16. | Д.х.н.                 | Смирнов Иван Витальевич          | (1.4.9) |
| 17. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 18. | Д.х.н.                 | Уткин Юрий Николаевич            | (1.4.9) |
| 19. | Член-корр. РАН, д.х.н. | Цетлин Виктор Ионович            | (1.4.9) |
| 20. | Д.х.н.                 | Шахпаронов Михаил Иванович       | (1.4.9) |
| 21. | Д.х.н.                 | Ямпольский Илья Викторович       | (1.4.9) |

**Мирошников А.И., председатель:**

Пожалуйста, давайте начнем с Коваленко Татьяны Феликсовны. «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология». Научный руководитель – Павлюков Марат Самвелович, научный консультант – Патрушев Лев Иванович. Официальные оппоненты: Гаврилов Алексей Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией пространственной организации генома Института биологии гена Российской академии наук (отсутствует, за границей) и второй – Крагяур Максим Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института регенеративной медицины МГУ имени Ломоносова, доцент Кафедры биохимии и молекулярной биологии Факультета фундаментальной медицины МГУ. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Блохина», Научно-исследовательский центр канцерогенеза. Владимир Александрович, давайте.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Материалы личного дела. Коваленко Татьяна Феликсовна, Российская Федерация. Окончила Первый московский государственный медицинский университет имени Сеченова по специальности «фармация» в 1999 году. Далее. С 2000 по 2005 год – инженер-исследователь Лаборатории биотехнологии нашего института (ИБХ РАН) с пятого по девятнадцатый – младший научный сотрудник этой лаборатории и с девятнадцатого по настоящее время – младший научный сотрудник Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем нашего института. Кандидатский экзамен по специальности «молекулярная биология» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в Лаборатории мембранных и биоэнергетических систем Института биоорганической химии. Научный руководитель диссертационной работы – доктор биологических наук Павлюков Марат Самвелович. Научный консультант – профессор Патрушев Лев Иванович. По теме диссертации опубликовано девять печатных работ. Объявление о защите и автореферат размещены на сайте ВАК вовремя (в августе двадцать второго года), и все необходимые документы в деле имеются.

**Мирошников А.И., председатель:**

Так: вопросы к Владимиру Александровичу есть? Вопросов нет. Значит, пожалуйста, диссертант. Двадцать минут.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

*(излагает основные положения диссертационной работы)*

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Пожалуйста, вопросы. Да.

**Белогуров А.А.:**

Большое спасибо за ваш доклад. Будьте любезны, верните слайд, пожалуйста, где RoR и p53. У меня два небольших вопроса. Скажите пожалуйста, вот вы изучаете, по сути, уровни мРНК двух белков (MDM2 и p53) в зависимости от оверэкспрессии RoR?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

В данном случае – нокдаун.

**Белогуров А.А.:**

Вы знаете, что MDM2 действует... у него связь с p53 прямая? Это убиквитинлигаза.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Способствует деградации.

**Белогуров А.А.:**

Она его убиквитинирует, и это способствует его деградации в протеасомах. А вот вы говорите все-таки про мРНК. То есть, как вы считаете: здесь регуляция такая вот комбинированная получается?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

На самом деле, вот эти два результата между собой, я думаю, не связаны. То есть здесь мы судим о том, что уровень p53, скорее всего, повышается, поскольку уровень MDM2 снижается. А здесь мы показали, что также снижение уровня RoR способствует повышению уровня мРНК p53. То есть вряд ли это как-то зависит от MDM2. Возможно здесь также механизм каких-то микроРНК или какой-то еще опосредованный механизм. Ну вот, получен такой достаточно интересный результат. В литературе он не был описан, мы решили его представить.

**Белогуров А.А.:**

Ну да, то есть вы понимаете, что если становится MDM2 меньше, то p53 будет точно больше.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Но это белка будет больше.

**Белогуров А.А.:**

Да, белка будет больше. Но еще и стало больше мРНК, которая кодирует.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Да.

**Белогуров А.А.:**

То есть это какая-то синергия уже.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Видимо, да.

**Белогуров А.А.:**

Ну, то есть вы какого-то обсуждения этого факта не приводите? Просто пока не совсем понятно, как это все работает.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Да, не совсем понятно.

**Белогуров А.А.:**

Да, и второй вопрос. Покажите, пожалуйста, следующий, наверное, слайд (или через один), там, где скорость роста клеток. По-моему, следующий. Да. Вот график, который посередине у вас (флуоресценция в зависимости от дней). Вас не смущает, что первые четыре дня клетки вообще у вас не делятся? Или я не совсем правильно понимаю тот метод, который вы использовали.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Здесь мы красили аламаровым голубым. Да, это достаточно интересно, но так вот у нас получилось.

**Белогуров А.А.:**

То есть это только у вас? Или вообще, когда люди используют такую методику, они получают такие результаты?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Нет, это именно данный эксперимент. Но мы его повторяли, мы в его результатах в общем уверены. Но так вот получилось.

**Белогуров А.А.:**

В каком-то стаже они находятся первые четыре дня. Приходят в себя. Спасибо большое.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Еще вопросы? Не вижу. Спасибо, можете отдохнуть. Так, значит, теперь слово руководителю.

**Павлюков М.С., научный руководитель:**

Здравствуйтесь.

**Мирошников А.И., председатель:**

Да, пожалуйста.

**Павлюков М.С., научный руководитель:**

Меня слышно?

**Мирошников А.И., председатель:**

Да-да.

**Павлюков М.С., научный руководитель:**

Уважаемые коллеги, в первую очередь хотелось сказать, что Татьяна Феликсовна пришла к нам в лабораторию в самом начале 2020 года уже таким очень хорошим, подготовленным специалистом и за это время она показала себя, как очень трудолюбивый, очень старательный сотрудник. Она всегда пыталась придумывать какие-то новые эксперименты, разобраться в проблеме. Придумывала различные новые пути, как можно разобраться в полученных данных. Вообще зарекомендовала себя как крайне активный и позитивный человек, и я очень рад, что она работает в нашей лаборатории. Как вы видите, ей удалось опубликовать значительное количество работ, в большинстве из которых она является первым автором. И что очень важно, что Татьяна Феликсовна не собирается останавливаться на полученных результатах. И уже всю мы с ней обсуждаем

и начинаем работать над тем, как дальше развивать эту тематику, дальше продолжать работать над длинными неcodирующими РНК. Потому что сейчас это очень важная и очень интересная тема. В общем я считаю, что Татьяна Феликсовна в нашей лаборатории сделала очень хорошую, очень интересную работу. И я считаю, что она уже полностью сформировалась, как настоящий ученый, который готов изучать какие-то проблемы, молекулярные механизмы. Еще раз хочу сказать, что для меня было большим удовольствием работать вместо с ней. И я считаю, что, безусловно, Татьяна Феликсовна достойна звания кандидата наук, и она будет продолжать свою работу дальше. Большое спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Владимир Александрович, вам слово.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Теперь отзывы. Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. (*Зачитывает заключение организации, где выполнялась работа*). В заключении рекомендована эта работа к защите. Биографические данные были оглашены в самом вводном слове. Ну, я повторю, что Коваленко окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение Первый московский государственный медицинский университет имени Сеченова в 99-м году. Тема диссертационной работы утверждена ученым советом 28 декабря двадцатого года (еще очень давно). Дальше показана актуальность темы исследования. Довольно подробно описаны те вещи, о которых мы слышали сегодня. Довольно важным представляется то, что глиобластома описывается как довольно редкое, но крайне агрессивное заболевание. И это во многом определяет актуальность работы. Конкретно пишется: «Таким образом, выявление молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза данных заболеваний, представляется весьма актуальной задачей». Тут же подробно анализируется научная новизна, теоретическая и практическая значимость (отдельными пунктами). Степень достоверности работы: пишется, что работа проведена с использованием современных методов, выполнена на высоком научно-методическом уровне. Личное участие соискателя в получении результатов в том числе заключается в том, что личный вклад диссертанта состоит в непосредственном проведении исследований и обработке полученных данных, а также в участии в выборе направления научной работы, написании и подготовке к публикации статей и тезисов с результатами исследования. Диссертационная работа соответствует заявленной специальности. Публикации хорошие, а именно – 9 статей. И,

соответственно, работа рекомендована к защите. Заключение принято на открытом заседании семинара Отдела функционирования живых систем нашего института. Подписано: секретарь семинара, Михура Ирина Владиславовна, председатель семинара, Донцова Ольга Анатольевна и зам директора, Ямпольский Илья Викторович. Это что касается заключения. Заключение утверждено директором нашего института, академиком Александром Габибовичем Габибовым.

*(Зачитывает отзыв ведущей организации).* Отзыв ведущей организации, в качестве которой был Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Блохина (это Минздрав Российской Федерации). Отзыв полностью положительный. Опять же подчеркивается актуальность диссертационной работы довольно подробно. Очень интересный пункт – связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства. Новизна исследования анализируется. И тут тоже встречается целая серия слова «впервые». Впервые исследовано метилирование псевдогена в нормальных и патологических состояниях. Впервые установлена зависимость экспрессии lincRoR от активности рецептора. То есть новизна таким образом подчеркивается. Значимость для науки. Общебиологическая значимость работы определяется выявлением механизмов регуляции экспрессии длинных некодирующих РНК. Практический аспект диссертации важен для поиска новых молекулярных маркеров и терапевтических мишеней в опухолевых клетках. Структура. Тут пишется, что классическая структура: 144 страницы, «Введение», «Обзор литературы», в котором обосновывается выбор, собственно, экспериментальных моделей – глиобластома и рак эндометрия, которые являются высокозлокачественными новообразованиями. Далее – «Материалы и методы». Опять же пишется, что яркое впечатление производит разнообразие современных сложных методов. «Результаты и обсуждение» детально представляют подходы к получению данных. Результаты изложены четко, видна глубокая общенаучная подготовка автора. Ну, вот очень интересно, то, что в конце пишется, что отмечены недостатки. Недостатки указаны в соответствующих разделах отзыва. В разделах следующее. Требуется методического пояснения эксперимент, в котором анализируется 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 йодидом. Но пропидия йодид окрашивает лишь клетки с неповрежденной плазматической мембраной и ядра после лизиса. Далее. В разделе «Заключение» Коваленко подводит итог исследования, дает общую оценку полученным результатам, обсуждает их научную и практическую значимость. И все это резюмировано в разделе «Выводы». Этот раздел выиграл бы от некоторого редактирования. Выводы 1 – 4 отражают ассоциативные связи. Выводы 5 – 9

содержат недостаточно определенные формулировки. Ну, в частности: «высказано предположение», «участвуют в регуляции». Такие формулировки обоснованы при обсуждении результатов. Выводы же следует представлять в более четком виде. Возможно, гипотетические аспекты их выводов исключить, уменьшив количество последних. Ну, опять же, список цитируемой литературы включает 186 источников. Автореферат проиллюстрирован. Опять же статьи. Их 9, и этого достаточно. Ну, и в заключение пишется, что работа является самостоятельным, законченным, научно-квалификационным исследованием, работа соответствует. Отзыв обсужден на совместной конференции лабораторий механизмов гибели опухолевых клеток, механизмов прогрессии эпителиальных опухолей и цитокинетики, регуляции вирусных и клеточных онкогенов, регуляции иммунитета и отдела химического канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский центр онкологии имени Блохина». Соответственно, подписано доктором медицинских наук Александром Альбертовичем Штилем и, соответственно отзыв утвержден директором этого института, академиком РАН, Стилиди. Вот, были замечания.

**Мирошников А.И., председатель:**

Так, Татьяна Феликсовна, будете отвечать про окрашивание?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Значит, что касается окрашивания клеток йодидом пропидия, то известно, что этот краситель является интерколирующим красителем, который взаимодействует с ДНК и окрашивает клетки с поврежденной мембраной. Мы в литературе нашли и оптимизировали методику, которая позволяет, с одной стороны, пермеабиллизировать клетки, фиксировать их. Но, с другой стороны, сохраняет в них РНК, что делает возможным последующее выделение РНК из клеток и анализ уровня экспрессии интересующих нас генов. Я надеюсь, что я ответила на этот вопрос.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Так, Владимир Александрович, на автореферат отзывы?

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Нет, на автореферат не поступали отзывы.

**Мирошников А.И., председатель:**

Хорошо. Тогда слово предоставляется официальному оппоненту. Второму, потому что Гаврилов Алексей Александрович за границей. А Максим Николаевич Карагяур здесь. Пожалуйста.

**Карагяур М.Н., оппонент:**

Добрый день, глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, дорогие коллеги. Для меня честь быть оппонентом такой замечательной диссертации. Я получил, действительно, удовольствие, знакомясь с этой работой.

**Мирошников А.И., председатель:**

Ругать не будете?

**Карагяур М.Н., оппонент:**

Ругать не буду, только хвалить. Но есть, конечно, небольшие замечания, как в любой работе, но они не являются критичными. Если позволите, я бы отметил еще и сильные стороны работы. Опять-таки уже было сказано о том, что многие моменты, которые отражены в диссертационной работе были установлены впервые (про метилирование островка CpG). Была показана роль повышения экспрессии linc-RoR в пролиферации раковых клеток, а также в снижении их чувствительности к апоптозу под действием радио- и химиотерапии. Результаты, полученные диссертантом расширяют представления о механизмах эволюции опухолей, образовании стволовых клеток опухоли, о механизмах развития химио- и радиорезистентности, а также о роли длинных некодирующих РНК в этих процессах. И с моей точки зрения, данное исследование важно не только для развития фундаментальных представлений в онкологии и молекулярной биологии, но также для решения ряда практических задач (разработки эффективных терапевтических подходов, прогнозирования течения онкологических заболеваний и выбора эффективной персонализированной терапии, поиска новых терапевтических мишеней). Опять-таки, было сказано, что работа изложена на 144 страницах. Литературный обзор написан хорошим языком, достаточно цельный. На основании обзора я бы порекомендовал диссертанту подготовить обзорную статью, в которой была бы отражена роль длинных некодирующих РНК в процессах индукции и эволюции опухолей (включая сведения об известных механизмах развития химио- и радиорезистентности). Мне кажется, такая работа была бы очень интересна. Важной находкой данной работы является установление роли PTEN в регуляции экспрессии собственного псевдогена. И это лишний раз демонстрирует сложность и неоднозначность эпигенетической регуляции работы генома.

Причем функции длинной некодирующей РНК *PTENP1* были установлены как для клеток карциномы, так и для клеток глиобластомы. Что касается замечаний, то вот у меня возникло несколько вопросов при ознакомлении с работой. Каково функциональное значение роста метилирования CpG-островка *PTENP1* с возрастом? Является ли это компенсаторным механизмом защиты от малигнизации эндометрия с возрастом? И есть ли данные о том, как влияет на метилирование CpG-островка *PTENP1* популярная сегодня гормональная заместительная терапия? Проводили ли учет таких данных при подборе экспериментальных групп? Если позволите, я сразу все вопросы перечислю.

**Мирошников А.И., председатель:**

Конечно.

**Карагяур М.Н., оппонент:**

У меня возник вопрос: поскольку большая часть работы была выполнена с клиническим материалом пациентов, было ли получено разрешение этического комитета на проведение работ с материалом пациентов и есть ли согласие пациентов на работу с их биопсийным материалом? Ну, некоторые замечания, которые не имеют существенного значения. Например, под некоторыми рисунками не хватает расшифровки аббревиатур, а также не хватает карт полученных при исследовании генетических конструкций. И по поводу выводов тоже возник вопрос. Один из выводов сформулирован слишком радикально: «Наши результаты показывают, что одним из механизмов, с помощью которых EGFR может влиять на пролиферацию клеток глиобластомы, является повышение уровня *lic-RoR*». Однако мне показалось, что прямого доказательства там нет, а была обнаружена лишь корреляция. По выводам. Выводов 9, они достоверны, логически следуют из полученных экспериментальных данных. Однако наблюдается некоторое несоответствие между формулировками поставленных задач и формулировками выводов. Особенно на себя внимание обращает вывод пятый, который подчеркивает новизну полученных данных, но не содержит экспериментально обоснованного заключения о корреляции изучаемых объектов и процессов. В целом отмеченные недостатки несколько не снижают качества исследования и не влияют на главные практические результаты диссертации. Диссертация Коваленко Татьяны Феликсовны «Гены длинных некодирующих РНК: их метилирование, экспрессия и функции в развитии глиобластомы и карциномы эндометрия» является фундаментальной законченной работой, которая полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям. И, с моей точки зрения, автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо, Максим Николаевич. Татьяна Феликсовна, будете отвечать?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Что касается замечания относительно раздела «Материалы и методы» про пациентов. Да, пациенты, включенные в наше исследование, давали свое письменное согласие, и проведение работы было одобрено этическими комитетами Института акушерства, гинекологии и перинатологии имени Кулакова, а также Национального медицинского исследовательского центра имени Бурденко. Что касается замечания относительно функционального значения метилирования, увеличения его с возрастом (является ли это компенсаторным механизмом, препятствующим малигнизации эндометрия). Да, насколько я помню, в тексте диссертации я это упоминала. Возможно, это не очень четко прозвучало. Но я полностью с этим согласна. Мы тоже полагаем, что изменение метилирования с возрастом служит неким защитным механизмом, направленным на предотвращение малигнизации ткани эндометрия. Но, к сожалению, этот механизм не всегда срабатывает. Относительно данных о влиянии заместительной гормональной терапии на метилирование CpG-островка псевдогена. Вообще упоминания в литературе практически отсутствуют о регуляции экспрессии псевдогена. И в том числе нет никакой информации о влиянии гормональной терапии и вообще уровня гормонов на метилирование псевдогена. Поэтому в нашей работе мы этот фактор не учитывали. То есть у нас нет такой информации. В плане замечаний, касающихся задач и выводов, я полностью согласна с замечаниями оппонента. Некоторые формулировки я в тексте доклада постаралась смягчить. Относительно EGFR. Своими словами говоря, я полагаю, что уровень RoR может регулироваться с помощью сигнального каскада, запускаемого с участием EGFR. Наверное, действительно, в выводах слишком радикально это звучит. Постараюсь в последующих презентациях, докладах учесть такие замечания. Ну, и в плане оформления постараюсь также быть более внимательной в плане подписей под рисунками и так далее. Спасибо за замечания.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Максим Николаевич удовлетворен ответом? Окей.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

*(Зачитывает отзыв отсутствующего оппонента д.б.н. Гаврилова А.А.).* Так, ну и второй оппонент. Это доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий

Лабораторией пространственной организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук, Гаврилов Алексей Александрович. Отзыв полностью положительный. Тоже подчеркивается актуальность и новизна. Довольно подробно изложено то, что мы сегодня уже слышали. И тут, конечно, очень трогает фраза: «По диссертационной работе имеется ряд мелких замечаний и вопросов». Ну, он берет не большими замечаниями, он берет количеством. Всего их 9, этих замечаний. Значит, первое. Хотелось бы видеть подробное описание ядерных функций белка PTEN а обзоре литературы. Здесь дается лишь беглое упоминание, что PTEN участвует в обеспечении правильной сегрегации хромосом, репарации, репликации ДНК, регуляции экспрессии генов. Функции тезисно просуммированы на рисунке 11Б. Без описания в тексте это повисает в воздухе. Второе. В «Материалах и методах» или «Результатах» следовало бы объяснить дизайн праймеров и принцип метода метилчувствительной ПЦР. Третье. На странице 85 диссертации сказано, что метилирование выявляется в 24% образцов нормального эндометрия. При этом число образцов составляет 69. 24% от 69 составляет 16,5. Выходит, метилирование наблюдалось у 16,5 пациентов. Это как? Аналогичные вычисления привели рецензента к осознанию, что на рисунке 20 перепутаны цвета столбиков для второй и третьей возрастных групп. Автору диссертации следует более внимательно относиться к представлению данных. Четвертое. На рисунке 21 статистически недостоверное различие помечено двумя звездочками. Обычно двумя звездочками отмечают значимые различия (меньше 0.01%). Выбранная символика неудачна и сбивает с толку без ознакомления с подрисуночной подписью. Пятое. Имеется вопрос относительно данных по направленному метилированию и деметилированию CpG-островка псевдогена *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? Шестое. Касательно представления данных ChIP-seq по связыванию PTEN с хроматином (рисунок 30) следовало бы также привести профиль отношения сигнала преципитированной фракции к сигналу фракции инпута, что позволило бы составить лучшее представление относительно наличия сайта связывания белка PTEN в пределах изучаемого CpG-островка. Седьмое. На рисунке 31 с анализом данных РНК-сек нейросфер не расшифровано, что взято за единицу по осям. Восьмое. Не ясна интерпретация результатов экспериментов по анализу уровня экспрессии linc-RoR в зависимости от стадии клеточного цикла (рисунок 40). Анализировались клетки

глиобластомы от двух пациентов. Диссертантка утверждает, что в обоих случаях больший уровень экспрессии отмечался в G2/M-фазу клеточного цикла, тогда как по рисунку видно, что это справедливо только для линии 267. Тогда как для линии 11 экспрессия выше в S-фазе. Девятое. На рисунке 49, представляющем результаты визуализации linc-RoR в клетках не хватает совмещения сигналов GFP и DAPI, а также изображения в фазовом контрасте, по которому было бы проще судить о границах клеток. По результатам, приведенным для интерфазы (левая фотография), 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. Ну, все высказанные замечания, однако, не влияют, и диссертация соответствует, а автор заслуживает присуждения искомой степени. Как я уже сказал, официальный оппонент – доктор биологических наук, Гаврилов Алексей Александрович.

**Мирошников А.И., председатель:**

Татьяна Феликсовна, где он за границей-то?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Не знаю.

**Мирошников А.И., председатель:**

Не знаете? Ну, отвечайте.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Я благодарна оппоненту за столь подробные замечания. Постараюсь так же подробно на них ответить. Значит, по поводу первого замечания, касающегося недостаточно детального описания функций PTEN в ядре клетки. В принципе я с этим замечанием согласна. Но подобная краткость отчасти обусловлена недостаточностью информации в литературе относительно механизмов функционирования PTEN в ядре. Вообще PTEN известен в качестве фосфатазы двойной специфичности, дефосфорилирующей вторичный мессенджер. А вот функции в ядре начали исследоваться относительно недавно, и было показано, что эти функции не связаны, по большей части, с фосфатазной активностью белка, а обусловлены его способностью взаимодействовать с другими белками. Он, например, может взаимодействовать с таким транскрипционным фактором, как p53. Или взаимодействовать с белками, участвующими в формировании кинетохора. Но вот механизм, по которому PTEN влияет на эти белки (за счет чего реализуются эти функции),

совершенно пока не описан и не известен. Поэтому в литобзоре я не стала заострять внимание на этих моментах. Далее, значит, относительно того, что я не указала принцип метода метилчувствительной ПЦР в «Материалах и методах» или «Результатах». На самом деле, я в экспериментальной части диссертации постаралась более подробно описать те методы, которые были разработаны и внедрены в научную практику относительно недавно. Как, например, метод определения внутриклеточной локализации с помощью трехкомпонентной системы или метод направленного редактирования метилирования. А метилчувствительная ПЦР – это уже достаточно хорошо известный метод, даже включенный в методические пособия для студентов. Он основан на способности бисульфита натрия дезаминировать остатки цитозина и превращать их в урацил. И в последующих раундах ПЦР урацил заменяется на тимин. Это в случае неметилированного цитозина. А метилирование препятствует такому превращению. И, соответственно, при дизайне праймеров к неметилированной и метилированной матрицам эти превращения учитываются. Также мы учитывали значительную степень гомологии между псевдогеном и самим геном *P TEN*. Тоже мы это учитывали при дизайне праймеров. Так, следующий вопрос касался нецелого числа пациентов в одном пункте. Такое нецелое число (это, конечно, мое упущение) получилось в результате того, что я округляла значения процентов. Поэтому при обратном пересчете получилось 16,5 пациентов. Учту на будущее такие вещи. И, действительно, там в одном месте была перепутана подпись к картинке. Да, это мой недостаток. Буду внимательна. Так. Относительно того, проводили ли мы оценку эффективности нашего направленного метилирования и деметилирования. К сожалению, мы в этом плане потерпели неудачу, поскольку трансфекция вот этими вот конструкциями... Сейчас я еще раз к ним вернусь. Вернуться не получается... Так, да, вот это вот. Когда мы трансфицировали клетки деметилирующей и метилирующими плазмидами, у нас была очень низкая эффективность трансфекции. И поэтому мы проводили сортировку наших клеток по GFP. И в результате мы получали очень небольшое количество клеток (порядка 10 – 15 тысяч клеток). И, к сожалению, этого количества оказалось недостаточно для дальнейшего проведения бисульфитной конверсии. То есть количества выделенной ДНК оказалось недостаточно для проведения бисульфитной конверсии. Поэтому мы судили об эффективности того, что у нас соответствующие процессы прошли, по изменению экспрессии. Мы проводили деметилирование, дополнили направленным метилированием, и, в общем, эти результаты согласовались друг с другом. Таким вот образом.

**Мирошников А.И., председатель:**

Все?

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Да, с дальнейшими замечаниями я могу просто согласиться и учту на будущее.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Так, теперь мы открываем дискуссию. Алексей Анатольевич, вы там активность проявляли. У вас не было желания высказаться?

**Белогуров А.А.:**

Я считаю, что работа, действительно, очень интересная. Вопросы были заданы довольно правильные, но они не меняют того, что работа выполнена замечательно. Результаты, я думаю, дадут возможность автору продолжать эту прекрасную работу. Потому что много того, что есть непонятного, много интересного, что еще есть покопать в этой тематике. Поэтому я считаю, что работа достойная, заслуживает искомой степени. Сам буду голосовать «за» и призываю всех поддержать.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Татьяна Феликсовна.

**Коваленко Т.Ф., соискатель:**

Благодарю за лестный отзыв. В заключение я хотела бы выразить благодарность всем причастным к данной работе. Прежде всего, хотела бы поблагодарить своего научного руководителя, Марата Самвеловича Павлюкова, за такое очень внимательное, доброжелательное руководство и всеобъемлющую помощь в работе. Я считаю, что за то время, когда я работала под руководством Марата Самвеловича, я очень многому научилась. И мне еще очень многому предстоит научиться. Поэтому надеюсь на продолжение совместной работы. Также я бы хотела поблагодарить научного консультанта Льва Ивановича Патрушева, затем – руководителя нашей лаборатории, Михаила Ивановича Шахпаронова и руководителя Лаборатории молекулярной вирусологии, Юрия Петровича Рубцова за помощь в работе. Хочу поблагодарить коллектив моей лаборатории и коллектив Отдела функционирования живых систем в целом за помощь, поддержку. Также данная работа была бы просто невозможна без клиницистов, предоставивших клинический материал. Я также им очень благодарна. Благодарю наших коллабораторов и соавторов: Ануфриеву Ксению Сергеевну, которая помогала с биоинформатическим анализом и нашего индийского партнера, доктора Amit

Kumar Pandey, который проводил секвенирование РНК. Также благодарю коллег, сотрудников ИБХ, которые на разных этапах работы помогали. Одолжить реактив, дать поработать на приборе – такая дружеская помощь для меня очень ценна. Хочу поблагодарить Татьяну Леодоровну Ажикину, Елену Викторовну Свирщевскую, Юрия Михайловича Ходаровича, Михаила Геннадьевича Акимова. Также благодарю Татьяну Игоревну Яковлеву за помощь в оформлении документов и руководителя отдела аспирантуры, Арпеник Акоповну Захарянц, за помощь в подготовке к сдаче всех кандидатских экзаменов. Большое спасибо.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо вам, Татьяна Феликсовна. Так, коллеги, тут предложение есть по счетной комиссии: Дмитрий Александрович Долгих, Виталий Павлович Зубов и, соответственно, Владимир Александрович Олейников, неперменный председатель счетной комиссии. Так, пожалуйста, голосуем. *(Комиссия избрана единогласно)*

*(Далее объявляется перерыв на тайное голосование. Идет голосование).*

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Счетная комиссия отработала: просмотрела бюллетени все, проверила, пересчитала. По ходу защит. Коваленко Татьяна Феликсовна. Присутствовал на заседании 21 член совета. Роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне – 21, «за» - 21, против, недействительных нет.

**Мирошников А.И., председатель:**

Спасибо. Мы поздравляем новых кандидатов. Есть предложение утвердить. Есть другие предложения? Других предложений нет.

*(Далее идет голосование по проекту заключения совета. Проект заключения совета принимается единогласно.)*

Большое всем спасибо.

Председатель  
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.,

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.