



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334

Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru

ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001

<http://idbras.ru>

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова (ИБР РАН)
Д.б.н., член-корреспондент РАН

№ 03.04.2024 № 12506/01-105
На № 4.10-48-225 от 07.03.2024



А.В. Васильев

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу **Шляпиной Викторией Львовны** «Роль белка hTERP в регуляции аутофагии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Актуальность диссертационной работы

Тематика диссертационной работы В.Л. Шляпиной относится к большому направлению современной науки о жизни, связанному с биологией теломер. Актуальность этого направления очевидна в связи с ключевой ролью теломер в процессах развития, старения, онкогенеза. Теломерные белки и РНК выполняют неканонические функции в клетке, тем самым устанавливая функциональную связь между состоянием теломер и судьбой клетки.

Работа В.Л. Шляпиной посвящена изучению пептида, кодируемого РНК-субъединицей теломеразы, и его роли в процессе клеточной аутофагии, тесно связанной с метаболизмом клетки.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования, а также его оригинальность, обусловлены в большой степени тем, что белок, кодируемый РНК компонентом теломеразы, hTERP, был обнаружен в лаборатории, где выполнялась работа. Это первое детальное исследование функциональной роли hTERP в регуляции аутофагии и поиске мишеней этого белка.

Обоснованность и достоверность научных результатов и выводов диссертационной работы

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы подтверждается большим объемом экспериментальных данных, их воспроизводимостью, подкрепленной статистическим анализом, а также публикациями полученных результатов в рецензируемых зарубежных и российских научных журналах. Во всех публикациях автор работы является первым соавтором, что указывает на ключевую роль диссертанта в получении и анализе данных.

Научно-практическая значимость работы

Компоненты теломер и теломеразы являются объектами пристального внимания, как мишени диагностики и терапии онкологических заболеваний. Роль исследуемого белка hTERP, являющегося продуктом биогенеза РНК компонента теломеразы, в клеточном метаболизме и регуляции процесса аутофагии дает возможность выявить новые мишени противоопухолевой терапии, а также исследовать связь метаболизма клетки и теломер в процессе старения.

Структура и содержание

Текст диссертации изложен на 119 страницах и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы в количестве 200 ссылок. Диссертация проиллюстрирована 33 рисунками, из которых 17 рисунков содержат экспериментальные данные. Обзор литературы написан

очень хорошо и содержит все необходимые сведения, относящиеся к теме работы, в нем представлено описание структуры теломер, теломеразы, охарактеризованы неканонические функции ее компонентов. Отдельная глава посвящена описанию процесса аутофагии и сигнальных путей, регулирующих этот важный клеточный процесс.

В разделе «Результаты и обсуждение» логично и четко изложены экспериментальные подходы и результаты проведенных исследований. Автором работы были получены клеточные линии, позволяющие исследовать функции белка hTERP, с использованием современных подходов на основе редактирования генома. На первом этапе была проведена работа, показывающая, что модификация теломеразной РНК, нарушающая экспрессию белка hTERP, не влияет на активность теломеразы, что позволило использовать эту модель для изучения функций hTERP. Второй моделью служила линия клеток с гиперэкспрессией hTERP, полученная в ходе выполнения работы. Стратегия работы состояла в оценке изменений статуса аутофагии, которые вызваны либо отсутствием hTERP, либо его гиперэкспрессией. По динамике накопления белка LC3II, маркера развития аутофагии, показано влияние hTERP на этот процесс. На следующем этапе работы исследовался статус фосфорилирования основных компонентов сигнальных путей AMPK и АКТ, регулирующих процесс аутофагии. Был исследован уровень фосфорилирования порядка 10 белков, вовлеченных в регуляцию аутофагии, на фоне отсутствия или гиперэкспрессии hTERP, а также при использовании модуляторов метаболизма, таких как ингибитор гликолиза 2DG, недостаток аминокислот, активатор активности AMPK. К наиболее ярким эффектам относится увеличение в клетках, нокаутных по hTERP, уровня фосфорилированной формы AMPK, ключевой киназы сигнального пути AMPK. Выявлены также изменения в фосфорилировании других белков, вовлеченных в регуляторные каскады AMPK и mTORC1, что позволяет сделать вывод об участии hTERP в модуляции активности этих путей. На основе полученных данных предложена модель, согласно которой hTERP модулирует активность AMPK, что влияет на последующий каскад развития аутофагии.

Методически работа выполнена на высоком уровне, диссертант продемонстрировал владение многими современными методами молекулярной биологии, включая клонирование, редактирование генома, работу с клеточными линиями, вестерн-блот

анализ белков, иммуноокрашивание, определение активности теломеразы, статистический анализ данных и другие. Все методы подробно изложены в соответствующем разделе.

В целом, работа носит характер фундаментального исследования, содержит большой объем новых экспериментальных данных и их подробный анализ, выводы корректны и полностью отражают полученные результаты.

Замечания по содержанию диссертации

В ходе прочтения работы возникли следующие замечания:

1. В тексте содержится множество орфографических ошибок.
2. Неудачно выбран формат подписей к рисункам – текст отформатирован по центру и шрифт курсивом, в результате чего подписи к некоторым рисункам растянуты на несколько страниц.
3. Рисунки 27 и 29 содержат слишком большой объем данных, что затрудняет сопоставление экспериментальных данных с их описанием в тексте. Было бы целесообразно разбить их на несколько рисунков, выделить на рисунках цветными рамками наиболее яркие эффекты, обсуждаемые в тексте, а также дать графический результат.
4. Как объяснить одинаковые эффекты нокдауна и гиперэкспрессии hTERP на фосфорилирование некоторых мишеней?
5. Описание данных по исследованию роли hTERP в модуляции метаболических путей в клетках U2OS на рисунках 28 и 30 слишком кратко, не содержит пояснений и сравнения их с данными, полученными на клетках HEK293T.
6. Глава 2.5, которая посвящена обсуждению механизма действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1, слишком лаконична. Предложенная модель не объясняет все полученные данные, и было бы логично предложить альтернативные модели. Предположено, что hTERP влияет на взаимодействие AMPK и TSC2, однако нет указаний на взаимодействие hTERP с этими белками. Вполне допустимо, что hTERP оказывает влияние на вышестоящие относительно AMPK мишени.

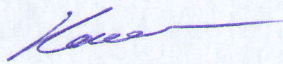
Высказанные замечания носят рекомендательный характер и не влияют на положительную оценку работы в целом.

Заключение

Диссертационная работа Шляпиной Виктории Львовны «Роль белка hTERP в регуляции аутофагии» соответствует критериям (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 диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Отзыв на диссертационную работу Шляпиной В.Л. обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ИБР РАН (протокол № 2 от 03.04.2024).

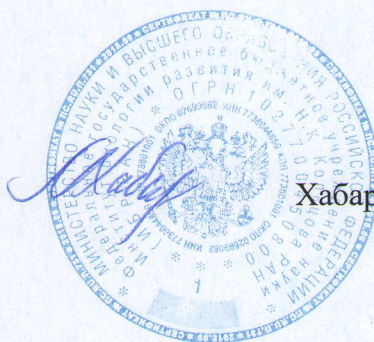
Руководитель лаборатории
эпигенетики человека ФГУБН
Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
д.б.н.



Калмыкова Алла Ивановна

119334, Москва, Вавилова, 26
Тел: +7 (499) 135-33-22
E-mail: allakalm@gmail.com

Подпись Калмыковой А.И. заверяю,
ученый секретарь ИБР РАН, к.б.н.



Хабарова Марина Юрьевна