

Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН
15 мая 2024 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Шляпиной Виктории Львовны

По теме: «Роль белка hTERT в регуляции аутофагии»

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Москва – 2024

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) от 15 мая 2024 года

Зам. председателя
диссертационного совета д.ф.-м.н., профессор Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
диссертационного совета д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

- | | | | |
|-----|------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. | Д.физ.-мат.н. | Ефремов Роман Гербертович | (1.4.9) |
| 2. | Член-корр. РАН, д.х.н. | Липкин Валерий Михайлович | (1.5.6) |
| 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. | Бовин Николай Владимирович | (1.5.6) |
| 7. | Д.х.н. | Генералова Алла Николаевна | (1.5.6) |
| 8. | Д.х.н. | Дзантиев Борис Борисович | (1.4.9) |
| 9. | Д.б.н. | Долгих Дмитрий Александрович | (1.5.3) |
| 10. | Академик РАН, д.х.н. | Донцова Ольга Анатольевна | (1.5.3) |
| 11. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Завриев Сергей Кириакович | (1.5.6) |
| 12. | Д.б.н. | Зарайский Андрей Георгиевич | (1.5.3) |
| 13. | Д.х.н. | Зубов Виталий Павлович | (1.5.6) |
| 14. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (1.5.3) |
| 15. | Член-корр. РАН, д.х.н. | Мирошников Константин Анатольевич | (1.5.6) |
| 16. | Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 17. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (1.5.3) |
| 18. | Член-корр. РАН, д.б.н. | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 19. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (1.4.9) |
| 20. | Д.х.н. | Шапаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |
| 21. | Д.х.н. | Ямпольский Илья Викторович | (1.4.9) |

Ефремов Р.Г., председатель: Добрый день, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги, присутствующие. Мы открываем очередное заседание нашего диссертационного совета, посвященное рассмотрению работы Шляпиной Виктории Львовны под названием «Роль белка hTERT в регуляции аутофагии». Работа диссертационная представлена на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Научный руководитель – доктор химических наук Мария Петровна Рубцова. Официальными оппонентами по диссертационной работе выступают Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Института молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук и Котелевцев Юрий Васильевич, кандидат химических наук, профессор Центра нейробиологии и нейрореабилитации имени Зельмана Сколковского института науки и технологий. Ведущей организацией является Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Кольцова Российской академии наук. По повестке дня вопросов нет у присутствующих? Я не вижу. Тогда, Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, с личным делом соискателя.

Олейников В.А, ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя).* Материалы личного дела. Шляпина Виктория Львовна, Российская Федерация. Бакалавриат в семнадцатом году окончила, девятнадцатый год – окончила магистратуру Биофака МГУ. С 2021 года по настоящее время – младший научный сотрудник Лаборатории молекулярной онкологии Института биоорганической химии имени Шемякина и Овчинникова. Кандидатский экзамен по специальности Молекулярная биология – «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии ИБХ РАН. Научный руководитель – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем нашего института и также профессор кафедры химии природных соединений химфака МГУ – Рубцова Мария Петровна. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 1 марта 2024 года и все необходимые документы в деле есть.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Есть ли вопросы по оглашенным материалам личного дела соискателя? Вопросов нет. Тогда приступаем к рассмотрению основных результатов работы. Виктория Львовна, пожалуйста, Вам слово.

Олейников В.А, ученый секретарь: 20 минут.

Ефремов Р.Г., председатель: Да, регламент 20 минут. Спасибо.

Шляпина В.Л., соискатель: *(излагает основные положения диссертационной работы).*

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Так, вопросы пожалуйста.

Олейников В.А, ученый секретарь: Борис Борисович, Вам можно к микрофону выйти.

Дзантиев Б.Б.: Добрый день еще раз говорю - вопрос от не узкого специалиста. Если Вами показана такая важная биологическая роль hTERP, то есть какие-то возможности регулировать содержание в организме, есть какая-то норма, ниже нормы, хуже нормы там... Вот в этом плане как-то у Вас есть какие-то предположения? Можно влиять на этот процесс? Или это вот как природа поступает, так и поступает?

Шляпина В.Л., соискатель: Большое спасибо за вопрос. Ну мы на самом деле находимся в процессе изучения дальнейших свойств hTERP и того, как он может действовать, функционировать и как можно регулировать содержание hTERP в клетках. Но сразу можно сказать, что его очень мало в клетках содержится и ...

Дзантиев Б.Б.: Ну мало – это сколько? Нано-, пикомоли, фемтомоли? Сколько примерно? Хотя бы порядки понятны?

Шляпина В.Л., соискатель: Ну, так как мы говорим о продукте трансляции теломеразной РНК в обычных клетках, то количество hTERP исчисляется молекулами на клетку. В нашей лаборатории были проведены эксперименты. Это несколько молекул на клетку.

По поводу Вашего вопроса: можем ли мы как-то регулировать содержание hTERP в клетках – на настоящий момент это в процессе изучения, но исходя из данных моей работы и из данных экспериментов, которые проводятся в лаборатории, можно сказать, что hTERP нужен в клетках, когда они находятся в каких-то стрессовых условиях. Он помогает им.

Дзантиев Б.Б.: Спасибо.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну я себе позволю тогда вопрос, пока коллеги еще не собрались, может быть не сформулировали свои вопросы. Вот Вы сказали, что несколько молекул на клетку, да, но при этом этот белок регулирует киназную активность. То есть молекул киназ, я так предполагаю, очень много, и уровень фосфорилирования Вы способны измерить интегрально, да, и видите разницу. Вот как это может быть? То есть это какой-то каскад усиления идет - вот несколько молекул оказывают такой... Может быть вопрос, как бы, дилетантский, но просто интересно как несколько молекул могут вызвать такой глобальный ответ.

Шляпина В.Л., соискатель: Большое спасибо за вопрос. Наша схема, которую я привожу – она предполагаемая. Мы предполагаем, что hTERP оказывает такое действие и влияние.

Отвечая на вопрос, можем ли мы увидеть влияние нескольких молекул – нашими экспериментами показано, что да, можем, и мы видим эффекты, как бы, по сравнению с нокаутными клетками, в которых вообще нет белка. Соответственно, возможно, да, происходит усиление каскада на разных этапах.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну тогда следующий вопрос возникает– а структурно вот. Вы говорите, что белок intrinsically disordered, нативным образом не упорядоченный.

Шляпина В.Л., соискатель: Все верно.

Ефремов Р.Г., председатель: Вы на С-конец добавляете некий пептид, так?

Шляпина В.Л., соискатель: Да.

Ефремов Р.Г., председатель: И который нужен для того, чтобы осуществлялось специфическое взаимодействие с мишенью. То есть у Вас каким-то образом еще с люциферазой реагирует Ваш белок и белок с этим же пептидом?

Шляпина В.Л., соискатель: Да, создание вот этой ...

Ефремов Р.Г., председатель: Вот роль этого пептида я может быть не до конца уловил. То есть Вы сказали, что пептид специфический.

Шляпина В.Л., соискатель: Тега, который мы добавили?

Ефремов Р.Г., председатель: Да-да-да.

Шляпина В.Л., соискатель: Да, спасибо за вопрос, создание этой клеточной линии было необходимо для подтверждения трансляции теломеразной РНК и образования в результате трансляции белка hTERP, потому что ранее это было показано непрямыми методами. Да, мы добавляем короткий HiViT-тег, состоящий из 11 аминокислот, и он необходим для взаимодействия с большой субъединицей и образования люциферазы. Это коммерческий набор. Соответственно, мы измеряем в дальнейшем активность уже люциферазы. Вот. И выбор этого тега обоснован тем, что наш белок достаточно небольшой, поэтому мы выбрали такой короткий HiViT-тег, который специфично показывает нам с высокой эффективностью и чувствительностью количество молекул hTERP в клетке.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну то есть с люциферазой взаимодействует сам пептид вот этот, добавленный на С-конец?

Шляпина В.Л., соискатель: Все верно, да.

Ефремов Р.Г., председатель: Да. А сам пептид с люциферазой, вот изолированный пептид, взаимодействует? Потому что у Вас там был, по-моему, слайд в начале, что уровень люминесценции сигнал, для белка без пептида и с пептидом практически одинаковый. Что это означает? Я просто может...

Шляпина В.Л., соискатель: Да, уровень люминесценции вот мы определяли в клеточном лизате. Я думаю, Вы говорите про левый график.

Ефремов Р.Г., председатель: Нет, нет, там раньше еще слайд был. Вот, вот здесь, да, вот этот слева. Синий и зеленый.

Шляпина В.Л., соискатель: Да-да-да. Про левый график говорим. У нас практически нет разницы между клетками дикого типа и клетками, содержащими hTERP меченный HiBiT. Мы можем это объяснить малым количеством белка hTERP в клетках. И сложным для детекции. Поэтому мы все-таки перешли к методу блоттинга, где мы видим на мембранах белок hTERP и его олигомерные формы.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну то есть левая панель, результаты на левой панели – они не являются доказательством Вашей идеи о том, что вот этот белок там транслируется вот так, как Вы предполагаете?

Шляпина В.Л., соискатель: Нет

Ефремов Р.Г., председатель: И Вы решили использовать более чувствительный вестерн-блот, да?

Шляпина В.Л., соискатель: Да-да-да. Доказательством трансляции являются результаты на правой панели.

Ефремов Р.Г., председатель: Ага. Просто вот это не прозвучало... Не совсем. Ну и еще... Коллеги, есть еще вопросы? У меня еще один вопрос остался. А то я так это, узурпировал. Тогда вопрос возникает - вот после всех проведенных исследований, в результате их, Вы можете какую-то на структурном, на молекулярном уровне представить картину, как все-таки работает, по Вашему мнению, вот этот белок? Не просто сказать, что он вот регулирует там киназную активность, меняется уровень фосфорилирования и так далее, и так далее, то что Вы измерили, а предположить. Потому что ну очень интересно, когда неструктурированный природно белок, с добавленным (ну то что пептид добавляли – это Вам нужно было для отдельной задачи, да) ну вот, как он может так специфически регулировать такой сложнейший процесс работы киназ? То есть он какую-то структуру должен видимо принимать? Что-нибудь про это известно? Не в Вашей работе, в литературе.

Шляпина В.Л., соискатель: На настоящий момент... Вот моя диссертация - это лишь часть, небольшая часть, тех исследований, которые ведутся в лаборатории по изучению свойств белка, его функций, его роли, вот. Относительно ответа на вопрос, имеет ли он какую-то структуру – пока мы не нашли структуру этого белка и даже с использованием последних вот разработок (и AlphaFold третий мы использовали, пытаюсь предположить какую-то структуру) – пока это не удалось, вот. Ну и, собственно, дальнейшие функции

этого белка продолжают активно изучаться и, возможно, он играет роль не только в процессе аутофагии.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну то есть, если вдруг кто-то Вас попросит или там возникнет задача, каким-то образом, там, внести мутации в этот белок, его как-то направлено видоизменить, чтобы он ну как-то изменил свою активность, то пока рановато, да?

Шляпина В.Л., соискатель: Да, пока, к сожалению, рановато, но исследования ведутся, и, я думаю, в дальнейшем мы сможем вносить мутации, изменяя активность hTERP. Пока просто. В hTERP просто мутации можем вносить.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Коллеги, еще, пожалуйста, вопросы. Больше я вопросов не вижу. Спасибо. Тогда, пожалуйста, можете присесть. Перерыв. Так, Мария Петровна здесь. Пожалуйста, Ваше мнение. Можете на трибуну выйти, чтоб удобнее. О соискателе.

Олейников В.А, ученый секретарь: О Виктории Львовне.

Рубцова М.П., научный руководитель: Добрый день глубокоуважаемые коллеги! Вика к нам пришла в лабораторию уже в аспирантуру. Ну, собственно, уже дипломированным специалистом, и, в общем-то, вот стала заниматься проблемой TERP, в рамках большого проекта, как она уже говорила. Это действительно очень большая, большая у нас тематика такая, сложная. Но, тем не менее, Вике удалось вот внести определенный вклад в решение некоторых задач, в это. Мы сейчас подтверждаем, получаем подтверждение на других уровнях – там на уровне мышинного организма вклад в аутофагию и так далее. Но если говорить о Вике, то, собственно, вот, она показала себя как достаточно легко и быстро обучаемый человек, она легко находит общий язык с коллективом. Всегда готова прийти на помощь, всем, кто нуждается в ее каких-то советах. И, собственно, у меня, в общем-то, только такие, достаточно позитивные, могут быть, наверное, отзывы. И, соответственно, я, конечно же, хочу отметить, что Вика, безусловно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо, спасибо. К научному руководителю вопросов нет у коллег? Нет. Тогда Владимир Александрович, пожалуйста, заключение организации, отзыв ведущей организации.

Олейников В.А, ученый секретарь: *(зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась работа).* Да. Работа выполнена в нашем институте. Поэтому заключение нашего института, соответственно. Семинара. Диссертация. Некоторые добавления к биографическим данным. 2019 год – с отличием окончила Московский университет. Научный руководитель – только что выступала. Тема

диссертационной работы утверждена ученым советом ИБХ РАН 29 марта 2023 года. Ну и далее было обсуждение на этом семинаре отдела и по итогам заключение. Актуальность: аутофагия является одним из фундаментальных клеточных процессов. Нарушение процесса и его регуляции могут приводить к возникновению различных заболеваний. Ну и собственно разобраться в этом деле является задачей актуальной. В работе впервые начато изучение hTERP в регуляции каскада киназ аутофагии, впервые показано что делеция нуклеотидов 184-188 в теломеразной РНК не оказывает влияния на функционирование теломеразы. Полученные данные могут быть использованы при поиске новых противоопухолевых препаратов. Достоверность результатов исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов, статистической обработкой, сомнений не вызывает. Личное участие: исследования проведены лично соискателем или при его непосредственном участии. Опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах. Вот. Если можно все-таки свет.

Ефремов Р.Г., председатель: Свет, пожалуйста, не выключайте.

Олейников В.А, ученый секретарь: Да. Значит, основные результаты. Ну и принято решение, соответственно, рекомендовать эту работу для защиты на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Это все было на семинаре, открытом, межлабораторном. 37 человек присутствовали, все «за», единогласно. И утвержден... утверждено заключение директором нашего института, академиком РАН Александром Габибовичем Габибовым. Это что касается заключения организации.

Теперь далее. Отзыв ведущей организации (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*). Опять же отзыв полностью положительный, отмечается актуальность данного исследования, научная новизна, ну опять же, первое детально исследование функциональной роли hTERP в регуляции аутофагии и поиске мишеней этого белка. Достоверность, опять же большой объем экспериментальных данных сомнений не вызывает. Практическая значимость, научно-практическая, дает возможность выявить новые мишени для противоопухолевой терапии. Сама структура - 119 страниц, 200 ссылок. Обзор литературы написан очень хорошо, содержит все необходимые сведения относящиеся к теме работы. Раздел «Результаты и обсуждение» логично и четко изложены экспериментальные подходы и результаты проведенных исследований. Ну, собственно, далее я так особенно зачитывать не буду, поскольку мы только что все слышали в докладе диссертанта. Вот важным являются замечания по, 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, 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, было бы логично предложить альтернативные модели. Предполагается, 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.

Ну и, соответственно, в заключении пишется, что данная работа полностью соответствует положению ВАК о диссертации на соискание степени кандидата наук и сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании объединенного семинара профильных лабораторий ИБР РАН. Да. И руководитель лаборатории подписала, доктор биологических наук Калмыкова Алла Ивановна. И соответственно, утвержден отзыв директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Васильевым.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо.

Олейников В.А., ученый секретарь: Замечания.

Ефремов Р.Г., председатель: Да, Виктория Львовна, были замечания сформулированы, пожалуйста, ответьте на них.

Шляпина В.Л., соискатель: Да, получается... С первыми двумя замечаниями абсолютно согласна, в дальнейшем – учту и буду более стараться избегать большого числа орфографических ошибок. Вот. Отвечая на третий вопрос. Так, сейчас, секунду. Так, так. Третий вопрос был о том, что, получается...

Олейников В.А, ученый секретарь: Большой объем данных

Шляпина В.Л., соискатель: Да, да. Сейчас, я тоже найду, чтобы у меня тоже были перед глазами. Извините. Да, третий вопрос был про слишком большой объем данных и предложение выделить основные моменты. Я это постаралась отразить в презентации, вот, и сейчас в дальнейшем в вопросах. В ответе на дальнейшие вопросы также постараюсь учесть. Четвертый вопрос – как объяснить одинаковый эффект нокдауна и гиперэкспрессии hTERP на фосфорилирование некоторых мишеней? Из графиков мы видим, что одинаковые изменения уровня экспрессии в нокаутных по белку клетках и клетках HEK293T дикого типа мы наблюдаем для двух белков, соответственно это TSC2, при фосфорилировании S1387, и p70S6K1, при фосфорилировании по T389. Эти данные приведены на слайде. Мы видим темно-серые столбики и светло-серые столбики и их отклонения в одну и ту же сторону. Мы в ходе работы предполагаем, что hTERP может участвовать в регуляции взаимодействия между AMPK и TSC2, что, как бы, он приводит к снижению степени фосфорилирования последнего. А отсутствие hTERP стимулирует взаимодействие AMPK и TSC2, и фосфорилирование TSC2, что приводит к стабилизации комплекса. При оверэкспрессии в клетках будет находиться достаточно большое количество молекул hTERP, между ними может возникать конкуренция при участии в этом взаимодействии между AMPK и TSC2, и мы видим эффекты такие же, как и в нокаутных клетках. Ну и эффекты, одинаковые на p70S6K, они логичны, так как этот белок располагается ниже в каскаде белков регуляции аутофагии, поэтому мы также видим его одинаковым. Дальнейший пятый вопрос звучал следующим образом: описание данных по исследованию роли hTERP в модуляции метаболических путей в клетках U2OS слишком кратко, не содержит пояснений и сравнения их с данными, полученными на клетках HEK293T. Да, мы проводили эксперименты на клетках U2OS и на слайде приведены данные, графики проведенных экспериментов. Мы видим, что в условиях голода по аминокислотам в клетках U2OS с оверэкспрессией hTERP наблюдается снижение аутофагии, точно также, как и снижение аутофагии у нас наблюдается в U2OS, оверэкспрессирующих hTERP, в случае обработки клеток AICAR. Данные по обработке AICAR – они согласуются с клетками HEK293T. Ну, в данных по голоду, данные, в случае обработки, в случае выращивания клеток в условиях голода по аминокислотам – они отличаются в этих клетках. Дальше постараюсь это пояснить. И также мы проводили

эксперименты в клетках U2OS – определяли профиль фосфорилирования белков, точно также, как и в клетках HEK293T. И мы видим, что при оверэкспрессии белка в клетках U2OS увеличивается экспрессия фосфорилированных форм AMPK. Также мы видим изменение в фосфорилировании, экспрессии, мы видим фосфорилирование, изменение фосфорилирования p70S6K и видим изменение в фосфорилировании ULK как по S555, так и по S757. И изменение в фосфорилировании TSC2. Эти данные согласуются с данными на клетках HEK293T, так как мы видим изменение фосфорилирования в том же узле схемы, как и на клетках HEK293T. Соответственно, затрагиваются пути, связанные с TSC2 и с ULK1. Далее. Шестой вопрос заключался в том, что 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. Влияние hTERP на вышестоящие относительно AMPK мишени мы в работе не исследовали, но исключить этого мы не можем, поэтому возможно такое влияние есть. Относительно альтернативной модели и того, что не все эффекты описаны – мы в своей работе сосредоточились именно на направлении действия hTERP через TSC2, однако он, возможно, действует не через TSC2, а через ULK. Это мы также видим в наших экспериментах, что происходит изменение фосфорилирования ULK1 по S555 в отсутствие белка hTERP. А если он, возможно, действует через оба пути, то мы будем видеть кумулятивный эффект, и как раз таки вот этим кумулятивным эффектом можно объяснить некоторые разногласия, возникающие в результатах экспериментов на разных клеточных линиях. На этом у меня все.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Владимир Александрович, были ли еще какие-то отзывы на работу?

Олейников В.А, ученый секретарь: Да, в диссертационный совет поступили два отзыва на автореферат. Оба отзыва положительные, слова замечательные в них сказаны, поэтому я зачитаю только откуда это. Значит, первый отзыв – кандидат химических наук, доцент химфака МГУ Скворцов Дмитрий Александрович, полностью положительный отзыв. И второй отзыв, тоже полностью положительный, значит, все говорится что, хорошая работа и соответствует. Подписано – доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений химфака МГУ Зверева Мария Эмильевна. Без замечаний.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Так, уважаемые коллеги, теперь переходим к отзывам официальных оппонентов. Пожалуйста, слово предоставляется Иванову Александру Владимировичу.

Иванов А.В., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный).*

Здравствуйте. Во-первых, огромное спасибо, что дали возможность прооппонировать эту работу. Работа, очень интересная и замечательная. Наша лаборатория занимается биохимией, поэтому наш фокус, скорее, он всегда есть не на теломеразе и связанных процессах, но на метаболомике. Одно из направлений в метаболомике заключается в том, что пытаются установить связи о статусе тех или иных метаболических процессов со скоростью пролиферации клеток, с процессами дифференцировки клеток и их функциональностью. И за последние десять-пятнадцать лет возникает огромное количество данных, говорящих о том, что метаболические перестройки могут быть не только следствием для адаптации клеток, но и важной, важными процессами именно в регуляции функции клеток и её дифференцировки и, возможно, гибели. Поэтому крайне важным направлением в этой области является поиск тех белков и процессов, которые могут связывать метаболические процессы со стандартными биохимическими, со стандартными молекулярными биологическими процессами. И в данной работе было предложено и показано, что существует связь между белками, участвующими или кодирующими обратную транскриптазу теломеразы или теломеразной РНК, с такими процессами биохимическими как аутофагия и регуляция на недостаток или избыток тех или иных метаболитов. В работе было прекрасно показано, что теломеразная РНК кодирует белок, единственно – уровни, конечно, крайне низкие, что четко следует из отсутствия повышения уровней детекции люциферазы в очень интересной модели по использованию тега, который я раньше не встречал. При этом подтверждено методом вестерн-блота существование этого белка. Ну и, конечно, все могут видеть, что уровень этого белка в клетках крайне маленький, но он, тем не менее, оказывает влияние на процессы аутофагии. Что интересно, что этот белок, было найдено диссертантом, что этот белок не оказывает влияния на экспрессию обратной транскриптазы теломеразы или на ее активность, но он влияет на такой базовый процесс, как аутофагия. Он может усиливать аутофагию при условиях недостатка аминокислот или подавлять ее при действии нуклеозидного аналога AICAR, который воздействует на вышестоящую протеинкиназу АМРК. И эти результаты являются крайне важными. Наконец, диссертант предложил действительно достаточно сложные модели по влиянию белка, кодируемого рибосомальной РНК, на связанные протеинкиназы, и мы только что слышали это обсуждение. Работа, с моей точки зрения, достаточно хорошо написана. Я не обращал внимания на орфографические ошибки – извините, ребенок с дисграфией и это вводит вклад... вводит определенное... эффект. Что мне показалось интересным, что литобзор очень интересный, действительно рассказано о теломеразе, о том, как она работает, о том,

что такое рибосомальная РНК, теломеразная РНК, что у нее есть возможный продукт, и какие данные существовали на момент начала работы. Были представлены очень интересные данные о том, что обратная транскриптаза теломеразы может воздействовать на процесс гликолиза и гексокиназы. И здесь у меня возникает первое не замечание, но скорее пожелание, что мне бы хотелось видеть то, влияет ли это на локализацию гексокиназы или на ее активность, потому что гексокиназа безумно интересный белок и ее локализация в клетке может регулировать процесс гликолиза и связанный с ней процессы, например, пентозофосфатный путь. Это одно из таких, очень интересных направлений в метаболомике в настоящее время. Раздел «Экспериментальная часть» написан замечательно, с моей точки зрения там есть все, практически все данные, необходимые для воспроизведения этой работы. Здесь существует тоже ряд технических недостатков, где-то пропущена концентрация антибиотика использованная, но на этом можно не заострять внимание во время этого рассказа. В «Результаты и обсуждения», естественно, два основных раздела. Первый раздел по доказательству экспрессии белка, кодируемого теломеразной РНК, и здесь показано, что белок может быть детектирован исключительно методом вестерн-блоттинга и здесь возникает вот уже сутевой вопрос о том, насколько специфичными являются полосы, показанные вестерн-блотом, и главное - чему соответствует полоса с большим молекулярным весом. И диссертант здесь во время доклада ответил, что это, по-видимому, является олигомерной формой белка. Следующий. В разделе, с моей точки зрения, представлены убедительные данные о том, что уровень экспрессии белка, кодируемого теломеразной РНК действительно воздействует на аутофагию, на процессы трансляции и на, показано, то что это влияет на статус фосфорилирования связанных с этими процессами протеинкиназ и здесь нету никаких замечаний. Наконец, есть уже такой, еще одно как замечание-пожелание, на большинстве рисунков с графиками диссертант показывает не стандартное отклонение, а стандартную ошибку среднего. Этот параметр зависит от размера выборки и поэтому здесь, наверно, корректнее было бы в подписях к тем или иным рисункам показывать размер выборки в каждом случае. Тем не менее, работа Виктории Шляпиной выполнена на высоком научном и техническом уровне. Она действительно расширяет представление о роли кодируемой теломеразной РНК белком и его функциях на регуляции клеточного метаболизма, в частности аутофагии. Работа является логичной, достоверность достаточно высокая. Реферат полностью отражает содержание диссертации, выносимые на защиту положения. Работа, все основные положения описаны в публикациях по теме диссертации и представлены на научных конференциях, поэтому диссертационная работа Шляпиной соответствует критериям утвержденным Положением о присуждении ученых

степеней правительства РФ 842 с последующими изменениями, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо большое.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо большое, Александр Владимирович. Так, Виктория Львовна, пожалуйста. В отзыве оппонента были замечания, ответьте на них.

Шляпина В.Л., соискатель: Да, большое спасибо за отзыв. И отвечая на высказанные замечания. Ну, первое это не замечание, а пожелание, вопрос про взаимодействие TERT и гексокиназы II. Из литературы известно, что TERT может взаимодействовать с промотором гексокиназы II, однако точных молекулярных механизмов на настоящий момент не известно, но абсолютно согласна, что эту информацию можно было дополнить и внести в литобзор. Далее вопрос относительно детекции белка hTERT методом блоттинга – действительно, я упоминала об этом в докладе и еще раз повторю, что мы видим как сам белок, так и его олигомерные формы в более высоких молекулярных массах. Далее, был вопрос по поводу того, что смущает излишне интенсивное свечение цитоплазмы по сравнению с ядрами и был вопрос, возникает ли, были ли проведены дополнительные эксперименты по оценке специфичности антител? Да, мы в работе использовали коммерческие антитела на TERT, это были антитела производства Abscam и вторичные антитела, конъюгированные с меткой Cy5, так же коммерческие, производства Invitrogen. И на слайде я привожу проведенные нами эксперименты, где мы видим фотографии клеток, которые были окрашены как первичными, так и вторичными антителами и фотографии клеток окрашенных только вторичными. Соответственно, вопрос был в специфичности, ну и из фотографий мы видим, что в левой части слайда вот мы видим красные точки, возможно на большом экране их не так хорошо видно, но на мониторах их достаточно хорошо видно, а в правой части этого свечения нет, поэтому антитела работают специфично. И далее, относительно замечаний по разделу «Материалы и методы» - большое спасибо, действительно, я не указала, но могу сейчас ответить, что активность Taq ДНК-полимеразы была 5 ед./мкл; концентрация антибиотика G418, использованная для отбора, была 1 мкг/мкл и в качестве ответа на вопрос про фосфорилировали ли олигонуклеотиды до или после отжига – мы их фосфорилировали до отжига. В подписях к графикам правильно было бы указать размер выборок – да, согласна, но во всех случаях размер выборок был не менее трех экспериментов, то есть три, четыре или пять. В дальнейшем в работах буду обязательно их указывать. Все у меня, с моей стороны.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Александр Владимирович, Вы удовлетворены ответами соискателя? Спасибо. Так следующий отзыв, Котелевцев, я думаю правильно произношу или нет, Юрий Васильевич.

Котелевцев Ю.В., официальный оппонент: Не совсем, но это не страшно.

Ефремов Р.Г., председатель: А как лучше произносить?

Котелевцев Ю.В., официальный оппонент: Котелевцев.

Ефремов Р.Г., председатель: Котелевцев. Извините, пожалуйста.

Котелевцев Ю.В., официальный оппонент: Фамилия географическая, происходит от местечка Котельва в Полтавской области.

Ефремов Р.Г., председатель: А, все.

Котелевцев Ю.В., официальный оппонент: Ничего страшного, мало кто с первого раза запоминает. *(Излагает отзыв, отзыв положительный.)* Большое спасибо, что пригласили меня принять участие в оценке этой диссертации. Всегда приятно выступать на этом ученом совете, который удостоил меня звания кандидата химических наук в восемьдесят втором году и с которым я не расстаюсь вот уже почти сорок лет. Значит, я буду так крупными мазками, но все у меня написано в отзыве. Я хочу немножко крупными мазками рассказать, что эта работа не сама по себе, она, естественно, связана с тем, что было сделано до того. И ключевой работой является публикация Марии Рубцовой в восемнадцатом году в NAR, где они показали, что существует рамка считывания. Но это, наверно, и другие люди видели, которые в Ensemble смотрели, что есть рамка считывания. Но они нашли в себе силы и мужество положить много сил для того, чтобы доказать, что действительно этот белок существует и экспрессируется, этот вот hTERP. Это очень важно, потому что уже в этой работе было показано также, что в условиях, когда клетка оказывается в состоянии стресса вызванном доксорубицином, вот, идет, значит, активация mTOR. Значит mTOR – это центральная такая киназа на которая, для простоты она, в общем, когда клетке хорошо и надо делиться, она открывает ворота. TOR по-немецки – ворота, хотя это название не от ворот происходит, а так совпало. А это, это рецептор рамапицина. Рамапицин – это цитостатик такой, который используется при пересадке почек, например, активно. Так вот, когда mTOR начинает активно работать и обычно в это время и теломераза активно работает, клетка делится. И как бы открываются ворота для того, чтобы и синтез белка шел, который активируется за счет фосфорилирования белка S6 рибосомы, вот то, что у нее было показано p70S6K. Но в этой первой работе, конечно, механизм не был показан. Это просто был statement такой. И удивительно, что в работе, которая через год была опубликована в Nature Communications американцами, которые сделали нокаут рибосомального компонента теломеразы, они увидели активацию mTOR.

Вот. И должны были, конечно, процитировать работу Марии, где было сказано, что это идет активация не за счет нокаута рибосомального компонента, а именно за счет того, что, видимо, одновременно, отсутствует этот белок, который кодируется, рамка считывания которого в рибосомальном компоненте. Значит, Виктория получила задание разобраться в механизме того, что же происходит, регуляция аутофагии и mTOR. Да, mTOR кроме того, что он вызывает усиленный синтез белка, вот, он, его деактивация наоборот, усиливает аутофагию. То есть мы, и сейчас это очень интересная тема, потому что вы знаете, что за аутофагию была тоже Нобелевская премия присуждена, где-то в десятые годы, за теломеразу, в две тысячи, по-моему, шестом году, когда все расстраивались, что Оловников не был включен. Ну так вот, то есть mTOR действует и на аутофагию, и на синтез белка и действие это разнонаправленное, что заметил кто-то из рецензентов, почему такая схема сложная получается. Ну как бы в реальной жизни, когда начинаешь исследовать что-то, не всегда все получается, как по стандартной схеме. И вот здесь я хочу отметить, что защищающаяся, Виктория, она нашла в себе силы и мужество нарисовать вот такую нетривиальную схему, да. То есть другой бы сказал, ну вот это не так, это не соответствует механистической схеме и это все нужно выбросить в педальное ведро. А она доказала, и, мне кажется, очень элегантно, что, действительно, ну не сказала, а предположила, что кроме фосфорилирования белка TRC, такой есть еще одна там киназа, что есть еще элемент стабилизации комплекса. И вот не только фосфорилирование может влиять, а и стабилизация комплекса. Поэтому вот такая нетривиальная, значит, получилась схема, когда, казалось бы, разнонаправленное действие через TORC наблюдается при нокауте этого белка. И ну, и это вот для меня. Как бы, меня наверно пригласили потому, что я специалист вообще в анализе фенотипов после нокаутов, нокадаунов. Я больше люблю это делать, конечно, *in vivo*, на живых моделях. Но вот здесь, что я вижу, что очень хорошая, грамотная школа по изучению фенотипа. Пускай здесь нокаут не на животном, а на клетке. Вы должны выявить этот нокаут, да. Как выявляет претендент это? Она исследует разные модели аутофагии, значит, и разные модели клеточного стресса. Значит, для этого она использует деокси-д-глюкозу, для того чтобы привести клетки в условия голодания – гликолиз не возможен и тогда возникают эффекты, связанные с pathway, которые идут через mTOR, вот. Либо она действует вот при помощи этого AICAR, который напрямую стимулирует. Ну то есть вот человек не только делает нокаут и смотрит как бы базовую, фенотипирует базу, так сказать, физиологию состояния той клеточной линии, которую она создала. Но и она создает как бы shift в разные стороны, чтобы выявить эти фенотипы. И ей это удалось сделать и это, как бы, вот, показывает высокий класс, ну и школу, конечно. Уж не надо забывать, что это молодой

ученый, которого мы, значит, сейчас работу рассматриваем, он прошел очень хорошую школу, очень хорошей лаборатории Марии Рубцовой и Ольги Донцовой, вот. Мне приятно видеть, как молодого человека проводят через правильную схему постановки экспериментов и анализа, очень приятно, вот. У меня там был небольшой вопрос по HiViT, но она ответила. По-моему, Вы тоже спросили насчет HiViT, она, в общем, все про это сказала, вот. Ну как бы еще один вопрос, который я решил, так сказать, придумать чтобы покрасоваться перед публикой, и посмотрел, что действительно на это не обращали внимание, ну если есть желание – можете ответить на этот вопрос без подготовки. Вот. Нас всегда спрашивали, а вот в чем физический смысл этой формулы? Вот в физике есть физический смысл. Есть и биологический смысл. В чем биологический смысл, вот? Вот про химический смысл очень редко говорят, ну ладно, тут и химический, и биологический. В чем биологический смысл того, что hTERP белок кодируется в РНКовом компоненте теломеразы? Вот Вы можете пофантазировать? Почему-то на этот вопрос ни в каких статьях Ваших коллег, которые, так сказать, этот вопрос исследуют, ни у Вас – этот вопрос ни у кого не возник. А мне кажется он важным. Еще раз его повторю, да. hTERP мог локализоваться в геноме где угодно, геном очень большой. Но почему-то во всех млекопитающих и в позвоночных тоже, в *Danio rerio*, он локализуется именно в рибосомальном компоненте теломеразы, вот. Ну значит этот вопрос, запомните его. Сейчас я повторю мантру, что, значит, работа соответствует требованиям ВАК, диссертация, автореферат полностью ее, значит, отражает и диссертант полностью заслуживает присуждения звания кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо, благодарю за внимание.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо, Юрий Васильевич. Так, Виктория Львовна, ну вот пожалуйста, импровизируйте.

Олейников В.А, ученый секретарь: Если хочет.

Ефремов Р.Г., председатель: Если есть желание, конечно.

Шляпина В.Л., соискатель: Да, большое спасибо за вопрос. Ну, наверно, точного ответа почему hTERP локализуется именно в теломеразной РНК, думаю, что на настоящий момент нет и это будет в дальнейшем изучаться. Но попробую предположить, что этот белок, все-таки, оказывает важную функцию. Ну вот как принимает участие в процессе аутофагии, как мы сейчас обсуждаем. Этот процесс очень важен для клеток и для всего организма, на разных уровнях и все-таки теломеразная РНК достаточно консервативная и, видимо, hTERP, имея важные функции, вот кодируется именно этим участком, именно, кодируется именно в теломеразной РНК, но в дальнейшем его роль, функции и свойства будут изучаться, и мы сможем более точно и конкретно ответить на этот вопрос.

Ефремов Р.Г., председатель: Юрий Васильевич, Вы удовлетворены? Или мы, у нас сейчас начнется научная дискуссия. Мы можем там Ваше мнение услышать.

Котелевцев Ю.В., официальный оппонент: Да, в целом я удовлетворен.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо, спасибо. Так, коллеги, теперь мы приступаем к дискуссии по работе Виктории Львовны. Кто хотел бы выступить? Пока не вижу. Ну мы уже много тут аспектов обсудили, много было вопросов. Так, хорошо. Тогда, пожалуйста, Виктория Львовна, Вам предоставляется возможность для заключительного слова.

Шляпина В.Л., соискатель: Да, большое спасибо за вопросы, за прослушивание моего доклада и презентации. И я хочу выразить искреннюю благодарность своим научным руководителям, Марии Петровне Рубцовой и Ольге Анатольевне Донцовой, за терпение, за помощь в постановке экспериментов, возможность к ним всегда обратиться, они всегда смогут ответить, подсказать, показать, как делать, научить как это лучше. Также я хочу выразить благодарность коллегам из лаборатории химии нуклеопротеидов химфака МГУ. Мне было очень комфортно работать во время диссертационного исследования, всегда могла к ним обратиться они мне также могли помочь. Хочу высказать благодарность коллегам из лаборатории молекулярной онкологии и всему отделу функционирования живых систем ИБХ РАН за возможность выступать на семинарах и за ценные советы и комментарии, которые на них были высказаны. Хочу также выразить благодарность всем своим друзьям и родственникам, в частности своей семье, родителям, которые поддерживали меня во всех моих начинаниях. Ну на этом все, спасибо.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Так, уважаемые коллеги, члены диссертационного совета нам необходимо определиться с составом счетной комиссии. Предлагается следующий состав комиссии: Дзантиев Борис Борисович, Ажикина Татьяна Леодоровна и Олейников Владимир Александрович. Есть ли какие-то отводы, самоотводы? Кто за то, чтобы избрать счетную комиссию в таком составе? Против, воздержалось? Нет. Единогласно. Так, тогда мы начинаем процедуру тайного голосования. И просьба во время этого голосования решить следующий вопрос повестки дня. Будет принятие к защите диссертации Байрамова Андрея Вячеславовича. Но пока начинается голосование.

(Идет тайное голосование)

Ефремов Р.Г., председатель: Счетная комиссия закончила свою работу. Владимир Александрович, огласите, пожалуйста, итоги.

Олейников В.А., ученый секретарь: Да, счетная комиссия закончила свою работу. Значит, вот, диссертация Шляпиной Виктории Львовны. Присутствовал на заседании 21 член совета. Роздано бюллетеней – 21. В урне оказалось – 21. «За» - 21. Против, недействительных бюллетеней – нет. Так что, надо утвердить.

Ефремов Р.Г., председатель: Кто за то, чтобы утвердить результаты работы счетной комиссии? Против, воздержались – нет. Единогласно. Ну тогда поздравляем Викторию Львовну с успешной защитой. И надо рассмотреть проект заключения диссертационного совета. Он у всех членов совета на руках.

(Проходит обсуждение проекта заключения совета. Бовин Н.В. предлагает внести небольшую орфографическую корректировку. С учетом этого диссертационный совет единогласно принимает заключение.)

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо большое. Тогда на этом мы заканчиваем наше заседание диссертационного совета и большое всем спасибо за участие в работе. Спасибо. Еще раз поздравляем соискателя.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н., проф. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

