

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 15.05.2024 г. № 11

О присуждении **Шляпиной Виктории Львовне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль белка hTERT в регуляции аутофагии» по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология» принята к защите 21 февраля 2024 г. (протокол заседания № 4) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, и действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и №561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Шляпина Виктория Львовна, 18 мая 1995 года рождения, в 2019 году окончила биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Физиология человека и животных», в 2023 году окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по направлению подготовки «биологические науки». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор химических наук Рубцова Мария Петровна, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

**Иванов Александр Владимирович**, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук и **Котелевцев Юрий Васильевич**, кандидат химических наук, профессор Центра Нейробиологии и нейрореабилитации имени В.Л. Зельмана Сколковского института науки и технологий, дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ФГБУН ИБР им. Н.К. Кольцова РАН), Москва, в своем положительном отзыве, подписанном руководителем лаборатории эпигенетики человека ФГБУН ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, доктором биологических наук Калмыковой Аллой Ивановной и утвержденном директором ФГБУН ИБР им. Н.К. Кольцова РАН, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук Васильевым Андреем Валентиновичем, указала, что диссертация Шляпиной Виктории Львовны «Роль белка hTERT в регуляции аутофагии» соответствует всем 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; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Соискатель имеет 3 опубликованные работы по теме диссертации объемом 3 печатных листа в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы Scopus и Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Научные работы по теме, в которые Шляпина В.Л. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. **Shliapina V**, Koriagina M, Vasilkova D, Govorun V, Dontsova O, Rubtsova M. Human Telomerase RNA Protein Encoded by Telomerase RNA is Involved in Metabolic Responses. Front Cell Dev Biol, 2021, 9, 754611.

2. **Шляпина В.Л.**, Юртаева С.В., Рубцова М.П., Донцова О.А. На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки. Acta Naturae (русскаяязычная версия), 2021, 13(2), с.106-115.

3. **Шляпина В.Л.**, Донцова О.А., Рубцова М.П. Делеция нуклеотидов 184–188 теломеразной РНК человека не влияет на функционирование теломеразы. Доклады Российской академии наук. Науки о жизни, 2023, 510(1), с.322-328.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. **Иванова Александра Владимировича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

1) В подразделе 1.4.4 «теломераза и аутофагия» можно было бы привести сведения о механизмах влияния обратной транскриптазы теломеразы на активность гексокиназы II и метаболизм аминокислот, достигается ли это напрямую взаимодействием с метаболическими ферментами или косвенно за счет изменения уровней их экспрессии.

2) В разделе «Результаты и обсуждение» на рисунке 20 представлены результаты детекции TERP-NiViT в клетках НЕК293Т иммуноблоттингом. Отмеченная полоса, соответствующая целевому белку, крайне слабая. В связи с этим возникают два вопроса: проводил ли диссертант подтверждение специфичности полосы путем подавления его экспрессии и чему, по его мнению, соответствует вторая имеющаяся полоса, соответствующая белку с массой около 40-50 кДа?

3) Исходя из показанных на рисунке 23 данных, диссертант делает вывод о том, что обратная транскриптаза теломеразы обнаруживается не только в ядре, но и в цитоплазме клеток вне зависимости от делеции нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК. Эти данные согласуются с литературными данными об обнаружении фермента и в цитоплазме. Однако несколько смущает излишне интенсивное свечение цитоплазмы по сравнению с ядрами. Отсюда возникает вопрос о том, проводили ли дополнительные эксперименты по оценке специфичности антител?

4) В разделе «Материалы и методы» было бы корректным привести источники использованных клеточных линий, в подразделе 3.10 указать количество единиц активности Taq ДНК-полимеразы в реакционной смеси, а в подразделе 3.14 – использованную концентрацию антибиотика G418. В качестве дополнительной придирки можно пожелать прояснить в подразделе 3.5.2, фосфорилировали ли олигонуклеотиды до или после отжига (так как полинуклеотидкиназа гораздо менее эффективно фосфорилирует праймеры в составе дуплекса).

5) В подписях к графикам 19, 27Д, 28Д, 29Г,Д и 30Б правильным было бы привести данные о размерах выборок, так как представленные на графиках величины стандартной ошибки среднего зависят от количества анализируемых точек.

Отзыв официального оппонента к.х.н. **Котелевцева Юрия Васильевича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания стилистического характера:

1) В тексте присутствуют орфографические ошибки.

2) В тексте встречаются стилистические неточности и жаргонизмы.

3) Оказывает ли влияние добавление HA-тега к hTERP на профиль фосфорилирования белков сигнальных путей аутофагии?

4) Есть ли изменения в функционировании теломеразы после внесения HiViT тега?

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и 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. 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.

Отзыв **на автореферат** к.х.н., доцента химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Скворцова Дмитрия Александровича. Отзыв *положительный*, не содержит замечаний.

Отзыв **на автореферат** д.х.н., профессора кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Зверевой Марии Эмильевны. Отзыв *положительный*, не содержит замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: биология теломераз, молекулярная биология, сигнальные пути и метаболизм в различных типах клеток, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают высокой квалификацией и большим опытом исследовательской и экспертной работы, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые было показано, что делеция нуклеотидов 184-188 в теломеразной

РНК, которая приводит к отсутствию белка hTERP, не оказывает влияния на функционирование теломеразы; впервые была создана клеточная линия с эндогенным hTERP меченным HiBiT тегом, подтверждающая трансляцию теломеразной РНК человека; начато изучение роли hTERP в регуляции каскада киназ аутофагии и показана его роль в регуляции этого каскада. На основании полученных данных диссертант приводит предполагаемый механизм действия hTERP в передаче сигналов AMPK-mTORC1.

**Теоретическая значимость** исследования заключается в том, что результаты данной работы расширяют наше понимание функций белка hTERP, кодируемого теломеразной РНК, и вносят вклад в изучение регуляции процесса аутофагии.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования **для практики** состоит в том, что в будущем полученные в ходе работы данные могут быть использованы при поиске новых противоопухолевых препаратов, исследовании проблем старения и долголетия. Созданная диссертантом линия hTERP-HiBiT может быть использована для выполнения любых других задач, связанных с изучением белка hTERP.

**Достоверность результатов** исследований сомнений не вызывает. Исследования проводились с использованием современных научных методов и подходов; экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована и подкреплена статистической обработкой данных. Материал, представленный в работе, опубликован в российских и зарубежных рецензируемых научных журналах.

**Личный вклад** соискателя состоит в активном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы. Автор принимал участие в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении экспериментов с применением современных методов молекулярной биологии, биохимии и генной инженерии, а также в обработке, анализе и оформлении полученных результатов. Автор представлял результаты на научных конференциях и принимал участие в подготовке и написании публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством д.х.н. Рубцовой М.П., за исключением получения клеточной линии dhTERP HEK293T (получена ранее М.П. Рубцовой).

Диссертационный совет 21.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Шляпиной Виктории Львовны является законченной научно-квалификационной работой, которая расширяет знания о функциях белка hTERP и его участии в регуляции аутофагии.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Таким образом диссертационная работа Шляпиной Виктории Львовны «Роль белка hTERP в регуляции аутофагии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»,

соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

В ходе защиты диссертации соискателю Шляпиной В.Л. были заданы следующие вопросы:

1. А если Вами показана такая важная биологическая роль hTERP, то есть какие-то возможности регулировать содержание в организме этого белка? Есть какая-то норма/ниже нормы, вот в этом плане есть какие-то предположения? Можно влиять на этот процесс? Или как природа поступает, так и поступает?

2. Малое содержание в клетках – это сколько? Нано-, пико- или фемто- моли? Известен хотя бы примерный порядок?

3. Вот Вы сказали, что содержание hTERP - несколько молекул на клетку, но при этом этот белок регулирует киназную активность. То есть молекул киназ, я так предполагаю, очень много и уровень фосфорилирования Вы способны измерить интегрально и видите разницу. Вот как это может быть? То есть это какой-то каскад усиления идет - вот несколько молекул оказывают такой глобальный ответ?

4. Вы говорите, что белок нативным образом не упорядоченный. Вы на С-конец добавляете некий пептид, какова его роль?

5. У Вас в начале был слайд, что уровень люминисценции сигнала, для белка без пептида и с пептидом практически одинаковый. Что это означает?

6. Какие результаты являются доказательством Вашей идеи о том, что этот белок транслируется вот так, как Вы предполагаете?

7. Есть ли какие-то данные относительно структуры белка? Очень интересно, когда неструктурированный природно белок может так специфически регулировать такой сложный процесс работы киназ. То есть он какую-то структуру должен видимо принимать? Что-нибудь про это известно?

8. Если вдруг возникнет задача каким-то образом внести мутации в этот белок или как-то направленно его видоизменить, чтобы он как-то изменил свою активность, то пока рановато?

Соискатель Шляпина В.Л. ответила на задаваемые в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. Мы находимся в процессе изучения дальнейших свойств hTERP и того как он может действовать, функционировать и как можно регулировать содержание hTERP в клетках. Но сразу скажу, что в клетках его содержится очень мало. 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.

2. Так как мы говорим о продукте трансляции теломеразной РНК в клетках, то количество hTERP исчисляется молекулами на клетку. В нашей лаборатории были проведены эксперименты, в результате которых были получены данные о том, что содержание hTERP – это несколько молекул на клетку.

3. 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 по сравнению с нокаутными клетками где вообще нет белка. Соответственно, возможно да, происходит усиление каскада на разных этапах.

4. Создание клеточной линии hTERP-HiBiT было необходимо для подтверждения трансляции теломеразной РНК и подтверждения образования в результате трансляции белка hTERP, потому что ранее это было показано непрямыми методами. Мы добавляем короткий HiBiT-тег, состоящий из 11 аминокислот и он необходим для взаимодействия с большой субъединицей и образования активной люциферазы. Соответственно мы измеряем в дальнейшем активность уже люциферазы. Выбор этого тега обоснован тем, что наш белок достаточно небольшой, поэтому мы выбрали такой короткий HiBiT тег, который показывает нам с высокой эффективностью и чувствительностью количество молекул hTERP в клетке.

5. На графике, приведенном на слайде, мы практически не видим разницы между клетками дикого типа и клетками, содержащими hTERP-HiBiT. Мы можем это объяснить малым количеством hTERP в клетках. Поэтому мы все-таки перешли к методу блоттинга, где мы видим на мембранах белок hTERP и его олигомерные формы.

6. Доказательством трансляции являются результаты блоттинга. В результате эксперимента установлено, что белок hTERP-HiBiT (и его олигомерные формы) экспрессируются и детектируются в полученной клеточной линии.

7. Моя диссертация это лишь небольшая часть тех исследований которые ведутся в лаборатории по изучению свойств белка, его функций, его роли. Относительно ответа на вопрос имеет ли он какую-то структуру – пока мы не нашли структуру этого белка и даже с использованием последних разработок (таких как AlphaFold) – пока это не удалось. Функции этого белка продолжают активно изучаться и возможно он играет роль не только в процессе аутофагии.

8. Да, пока, к сожалению, рановато, но исследования ведутся и в дальнейшем мы сможем вносить мутации изменяя активность hTERP. Пока мы можем просто вносить мутации в hTERP.

На заседании 15 мая 2024 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по исследованию роли белка hTERP в регуляции аутофагии, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии, присудить Шляпиной Виктории Львовне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. - Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович



Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

15.05.2024 г.