

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Шляпиной Виктории Львовны

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

Актуальность

Долгое время считалось, что роль метаболических процессов в клетке заключается только в обеспечении различными строительными блоками для репликации и транскрипции ДНК, биосинтеза белков, компонентов мембран и других клеточных компонентов. Изменение биохимических процессов воспринималось исключительно как следствие адаптации клетки к различным воздействиям. В последние полтора десятилетия исследования метаболизма клетки интенсифицировались, в результате чего были получены данные о функциях ряда низкомолекулярных соединений в качестве сигнальных молекул и регуляции ими процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Более того, были открыты протеинкиназы, активность которых меняется в ответ на изменение пула природных метаболитов (напр., определенных аминокислот или АТФ). К их числу относятся протеинкиназы AMPK и mTORC1 – ключевые регуляторы аутофагии, трансляции мРНК, биогенеза митохондрий, а также биосинтеза липидов, нуклеотидов и глюкозы. Поэтому высоко актуальными являются исследования механизмов их регуляции в клетке в норме и патологии, в том числе для выяснения механизмов развития ассоциированных патологий и создания фармакологических средств для их терапии.

Основные исследования механизмов регуляции AMPK, mTORC1 и аутофагии были до сих пор сосредоточены на низкомолекулярных метаболитах (в т.ч. аминокислотах и АТФ), а также на участии протеинкиназ и других компонентах комплекса mTOR. В то же время имеется крайне мало данных о возможной регуляции белками, основная роль которых состоит в принципиально других процессах, например в репликации ДНК. И представленная диссертационная работа показывает возможность регуляции аутофагии активности связанных с ней протеинкиназ недавно открытым белком, который кодируется теломеразной РНК. Более того, диссертант показал, что данный белок является именно метаболическим регулятором, так как он не влияет на функционирование теломеразы.

Новизна и научная значимость

Диссертационная работа В.Л. Шляпиной выполнена на высоком научном уровне с применением современных методов молекулярной биологии, в том числе технологий геномного редактирования. Диссертант получил абсолютно новые данные о функциях белка hTERP, кодируемого теломеразной РНК. В частности, Виктория Львовна Шляпина смогла продемонстрировать экспрессию эндогенного белка в клетках и показала, что сам hTERP не оказывает влияния на экспрессию, локализацию или ферментативную активность ключевого компонента теломеразы – обратной транскриптазы TERT. В то же время диссертант установил взаимосвязь белка hTERP с процессами аутофагии и связанными с ними сигнальными каскадами. В работе впервые показано, что кодируемый теломеразной РНК белок является регулятором аутофагии, усиливая ее при истощении аминокислот и подавляя этот процесс, вызванный фармакологическим активатором протеиназы AMPK – нуклеозидным аналогом AICAR. Более детальный анализ выявил, что белок hTERP оказывает влияние не только на саму аутофагию, но и на связанные с ней протеинкиназы. В частности, В.Л. Шляпина установила, что уровень hTERP влияет на статус фосфорилирования AMPK и киназы p70S6K в норме и при ингибировании гликолиза, интенсивность которого регулирует активность AMPK через модуляцию уровня АТФ. В таких условиях было выявлено, что экспрессия hTERP меняет статус фосфорилирования еще двух протеинкиназ: ULK1 и TSC2. Исходя из этих экспериментальных данных, диссертантом была предложена модель регуляции белком hTERP аутофагии и биосинтеза белка. Согласно этой модели, роль hTERP заключается в ингибировании фосфорилирования белка TSC2 киназой AMPK, что нарушает их взаимодействие, активации GTPазной активности регулятора mTORC1 – белка Rheb и, как следствие, к изменению интенсивностей регулируемых белком mTORC1 процессов аутофагии и биосинтеза белков.

По результатам работы опубликовано 3 статьи в российских и международных рецензируемых научных журналах: *Front Cell Dev Biol*, *Acta Naturae* и Доклады Академии наук.

Структура диссертации

Диссертация построена по классическому плану и содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, в котором обоснована актуальность и ясно сформулированы цели и задачи исследования, Обзор литературы, Результаты и обсуждение, Материалы и методы, Заключение, Выводы и список литературы. Работа

изложена на 119 страницах и включает 33 рисунка, список цитируемой литературы состоит из 200 наименований. Материал диссертации изложен подробно и логично, все разделы взаимосвязаны с друг с другом, все выводы диссертации подтверждены представленными на рисунках результатами экспериментов.

Раздел "Обзор литературы" состоит из четырех частей. В первой части представлены основные сведения о теломерах, их структуре, механизмах репликации ДНК и синтеза теломер, а также об основных белках, участвующих в поддержании длины теломер. Во втором подразделе приведены базовые сведения о теломеразном комплексе, его биогенезе, локализации и регуляции активности. Диссертантом подробно описана структура обратной транскриптазы теломеразы и ее каталитический цикл, а также структура и внутриклеточная локализация теломеразной РНК. В третьей части рассмотрены имеющиеся в литературе данные об альтернативных функциях теломеразы – способности этого фермента регулировать такие значимые сигнальные пути как Wnt/ β -катенин, NF- κ B, Мус и VEGF. Кроме того, в этом разделе рассмотрены и данные о неканонических функциях теломеразной РНК: регуляции ряда сигнальных путей и как следствие изменения пролиферации клеток и продукции цитокинов, а также обеспечения экспрессии кодируемого ею недавно открытого белка – hTERP. Именно этот белок и представляет собой основной объект исследований данной диссертационной работы. Наконец, в четвертом подразделе «Обзора литературы» сформулированы современные представления о различных типах аутофагии, механизмах ее протекания и регуляции. В завершении раздела представлены сведения о взаимосвязи теломеразы с аутофагией аутофагии и связанными с нею метаболическими путями клетки.

В разделе «Результаты и обсуждение» описано получение клеточной линии, в которой кодируемый теломеразной РНК эндогенный белок hTERP экспрессируется с HiViT-тэгом и показано отсутствие регуляции этим белком экспрессии, локализации и ферментативной активности самой обратной транскриптазы теломеразы. Для внесения кодирующей тэг последовательности, а также для «выключения» экспрессии белка hTERP диссертант использовал технологию редактирования генома CRISPR/Cas9. Стоит отметить выбор в качестве тэга короткого пептида HiViT – кофактора нанолюциферазы, который позволяет детектировать малые количества меченых им белков измерением биолюминисценции.

Наибольшая часть раздела «Результаты и обсуждение» посвящена обнаруженной способности белка hTERP преодолевать ингибирование аутофагии, вызванной истощением аминокислот и подавлять аутофагию, индуцированную фармакологическим активатором

АМПК. Эти результаты были получены на типах клеток: HEK293T и заведомо не экспрессирующих hTERP линии остеосаркомы человека U2OS. Наконец, в заключении исследования диссертант выяснил, что белок hTERP оказывает влияние на фосфорилирование и, как следствие, на активность регулирующих аутофагию протеинкиназ, включая mTORC1, p70S6K в норме и в ответ на ингибирование гликолиза (который оказывает влияние на регулятор mTORC1 – киназу АМПК). Эти данные указывают на возможность регуляции белком hTERP процессов биосинтеза белка, учитывая роль некоторых исследованных нижестоящих мишеней mTORC1 в трансляции. На основании этих данных диссертантом предложена схема предполагаемого механизма регуляции передачи сигнала путем АМПК-mTORC1 кодируемым теломеразной РНК белком hTERP.

В главе «Материалы и методы» очень подробно перечислены все использованные в работе материалы и их источники, изложены практически все использованные диссертантом методики, в том числе описаны последовательности работы с коммерчески-доступными наборами реагентов. Особо следует отметить наличие подраздела «Статистический анализ», в котором перечислены методы статистического анализа первичных данных, а также адекватность выбора этих методов диссертантом.

Замечания и вопросы в работе

По сути работы замечаний нет, есть скорее вопросы, касающиеся результатов и отчасти формы их представления:

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 в метаболическими ферментами или косвенно за счет изменения уровней их экспрессии.
2. В разделе «Результаты и обсуждение» на рисунке 20 представлены результаты детекции TERP-HiViT в клетках HEK293T 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

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, 28В, 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.

Тем не менее, стоит особо подчеркнуть, что все эти вопросы и указания недочетов ни в коей мере не ставят под сомнение выводы диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа В.Л. Шляпиной выполнена на высоком научном и техническом уровне. Она заметно расширяет представления о роли кодируемого теломеразной РНК белком процессов аутофагии и связанных с ней протеинкиназ. Кроме того, она демонстрирует отсутствие регуляции этим белком самой обратной транскриптазы теломеразы. Работа является логичным научным исследованием, а достоверность сделанных в ней выводов подтверждена представленными экспериментальными данными. Все выносимые на защиту положения диссертации являются новыми и полностью отражены в публикациях диссертанта. Автореферат отражает основное содержание диссертации и выносимые на защиту положения.

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».

Официальный оппонент


доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций
Федерального государственного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

 Иванов Александр Владимирович

119991, Москва, ГСП-1, улица Вавилова, дом 32
Телефон: +7-925-068-3630
E-mail: aivanov@yandex.ru

Подпись д.б.н. Иванова А.В. удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
учреждения науки Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
К.В.Н.

 Бочаров Александр Анатольевич

«24» апреля 2024 года

