

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 темы исследования

Исследование В.Шляпиной посвящено установлению роли белка hTERP в процессе аутофагии. hTERP был открыт ранее руководительницей соискательницы доктором М.П.Рубцовой в лаборатории академика О.А.Донцовой. Белок hTERP является необычным. Он кодируется РНК-компонентом теломеразного комплекса hTERC. Ранее в лаборатории О.А.Донцовой с использованием мутантных форм hTERP были получены данные, указывающие на возможное участие этого белка в ответе клеток на стрессовые условия. Одной из таких стресс реакций является аутофагия, важнейший процесс клеточного гомеостаза, направленный на обновление клеточных органелл, за который была присуждена Нобелевская премия по медицине за 2016 году, что не только явилось признанием заслуг первооткрывателя Ёсинори Осуми, но и стимулировало исследования в области изучения аутофагии.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Объем диссертации 119 страниц, материал иллюстрирован 33 рисунками. Список литературы включает 200 источников.

Новизна полученных результатов, положений, выводов и рекомендаций

Автору впервые удалось показать роль белка hTERP в регуляции аутофагии, привести предполагаемый механизм этой регуляции и создать экспериментальную клеточную линию, подтверждающую трансляцию теломеразной РНК человека. Для определения конкретных сигнальных путей затрагиваемых hTERP были созданы линии клеток dhTERP на основе HEK293T с делецией пяти нуклеотидов в начале ORF (линия HEK293T dhTERP) путем геномного редактирования CRISPR/Cas9 обеих аллелей, и линии клеток, экспрессирующих (HEK293T) или не экспрессирующих теломеразу (U2OS) в которых дополнительно экспрессировали hTERP с HA-тегом. Для создания клеточных линий с эктопической сверхэкспрессией белка соискателем была использована система на основе транспозазы Sleeping Beauty. Создание этих клеточных инструментов позволило автору установить, что белок hTERP

принимает участие в регуляции процесса аутофагии и провести сравнение профиля фосфорилирования девяти различных киназ, входящих в сигнальные пути, регулирующие аутофагию. Чтобы определить возможный механизм действия hTERP соискателем был проанализирован профиль фосфорилирования белков сигнальных путей AMPK и АКТ, в клетках дикого типа, дефицитных по hTERP и оверэкспрессирующих hTERP в условиях отличных от стандартных и оказывающих влияние на процесс аутофагии. В данной работе были выбраны условия ингибирования гликолиза, вызванные обработкой клеток 2-DG (2DG является производным глюкозы и при фосфорилировании гексокиназой 2 образует 2DG-фосфат, который не может быть использован в дальнейших этапах гликолиза. Происходит накопление 2DG-фосфата, что приводит к ингибированию гексокиназы 2 и, как следствие, происходит ингибирование гликолиза и снижение содержания АТФ. Низкий уровень АТФ приводит к активации AMPK, стимуляции аутофагии и ингибированию синтеза белка.).

На основании проведенных экспериментов сделаны выводы об участии hTERP в регуляции сигнального пути, ответственного за определение энергетического статуса клетки. Дефицит hTERP приводит к активации биосинтеза белка (повышенное фосфорилирование p70S6K1 и 4E-BP1) с одной стороны и к активации аутофагии (повышенное фосфорилирование ULK1 по Ser 555) с другой стороны. В работе приведены данные о влиянии hTERP на фосфорилирование нижестоящих мишеней mTORC1 - ULK1_S757, p70S6K1 и 4E-BP1. Все вышесказанное позволяет соискателю предполагать участие hTERP в регуляции сигнального пути mTORC1.

Полученные результаты подкреплены последней публикацией В.Л. Шляпиной, в которой показано, что делеция нуклеотидов 184-188 теломеразной РНК человека, инактивирующая открытую рамку считывания hTERP, не влияет на функционирование теломеразы. Все эффекты, наблюдаемые в клетках dhTERP HEK293T, вызваны именно отсутствием белка hTERP, а не изменениями в функционировании теломеразы. Таким образом, все описанные выше эксперименты получают дополнительную обоснованность.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Достоверность, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций не вызывает сомнений – все это подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Проведенные эксперименты соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании и с использованием реактивов, произведенных ведущими мировыми компаниями.

Научно-практическая значимость полученных данных

Несмотря на то, что работа носит фундаментальный характер, полученные результаты несомненно будут полезны при изучении раковой трансформации клеток, нейродегенеративных изменений и других патологических процессах, в которых процесс аутофагии играет важнейшую роль.

Личный вклад автора отражен в авторстве основных публикаций по теме диссертации и не вызывает сомнений.

Замечания

В ходе прочтения работы возникли следующие замечания:

- 1) В тексте присутствуют орфографические ошибки.
- 2) В тексте встречаются стилистические неточности и жаргонизмы.

Не достаточно исследованы следующие вопросы:

- 3) Влияние ли добавление HA-тега к hTERP на профиль фосфорилирования белков сигнальных путей аутофагии?
- 4) Есть ли изменения в функционировании теломеразы после внесения HiViT тега?

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

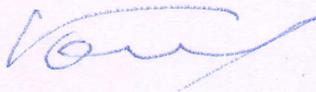
Заключение

Данное исследование является работой, в которой решена актуальная задача – исследование функциональной клеточной модели и экспериментальное доказательство на ее основе роли белка hTERP в регуляции аутофагии.

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

кандидат химических наук,
профессор Центра Нейробиологии и
нейрореабилитации имени В.Л. Зельмана
Сколковского института науки и технологий



Котелевцев Юрий Васильевич

121205, Москва, Большой бульвар, дом 30, стр.1
Территория Инновационного Центра «Сколково»
Телефон: +7 916 438 1903
E-mail: Y.Kotelevtsev@skoltech.ru

Подпись к.х.н. Котелевцева Ю.В.

ЗАВЕРЯЮ

Старший вице-президент по развитию
Сколковского института науки и технологий
кандидат технических наук

А.А. Сафонов

«23» апрель 2024 года

