

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора біологічних наук,
професора кафедри екології та зоології
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка

ГАРМАНЧУК ЛЮДМИЛИ ВАСИЛІВНИ

на дисертаційну роботу

ЛАВРИНЕНКА КИРИЛА ДМИТРОВИЧА

«Взаємодія Caprin1 і G3BP1 сприяє G3BP1-опосередкованому рекрутуванню
мРНК до стресових гранул»,
подану на здобуття ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 «Біологія»
за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія»

Актуальність обраної теми дослідження

Клітинна відповідь на стрес передбачає швидку перебудову обміну РНК і трансляції. Одним із найпомітніших проявів цієї перебудови є формування стресових гранул – цитоплазматичних немембранних структур, що концентрують мРНК, фактори ініціації трансляції та численні РНК-зв'язувальні білки. Стресові гранули є динамічними, а їх утворення, дозрівання та розбирання залежать від рідинно-рідинного фазового розділення, конформаційної пластичності білків і балансу між білок-білковими та білок-РНК взаємодіями.

Фізіологічне значення стресових гранул полягає у тимчасовій реорганізації трансляційного пулу та захисті частини мРНК. Водночас тривала персистенція або перехід динамічних конденсатів до менш рухливих агрегатів пов'язуються з нейродегенеративними захворюваннями, пухлинною адаптацією, вірусними інфекціями та хронічним запаленням. Тому дослідження молекулярних вузлів, що визначають склад і РНК-наповнення гранул, має фундаментальне і перспективне практичне значення.

G3BP1 вважається центральним організатором арсеніт-індукованих стресових гранул. Він містить домени для димеризації, білкових взаємодій і зв'язування РНК, а також кілька внутрішньо неупорядкованих ділянок. Caprin1 взаємодіє з NTF2-L доменом G3BP1, конкурує з USP10 і сприяє складанню гранул. Однак сам факт спільної локалізації не давав відповіді, чи забезпечує Caprin1 рекрутування мРНК самостійно, чи лише регулює активність G3BP1. Дисертація Лавриненка К. Д. спрямована саме на розв'язання цієї проблеми, а тому її актуальність не викликає сумніву.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертаційна робота виконана у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у тісній співпраці з лабораторією «Structure and Activity of Normal and Pathological Biomolecules» Університету Париж-Сакле, INSERM та Університету Еврі.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та їх достовірність

Дисертація є комплексним експериментальним дослідженням. Її мета – з'ясувати взаємодію G3BP1 і Caprin1 у клітинах та *in vitro*, визначити РНК-зв'язувальні властивості обох протеїнів і їх комплексу та встановити роль комплексу у рекрутуванні мРНК до стресових гранул – конкретна і відповідає назві роботи. Поставлені завдання послідовно розкривають мету та охоплюють білок-білкові взаємодії, залежність складу гранул від G3BP1, доменний аналіз, РНК-зв'язування і формування конденсатів.

Методична база роботи є сучасною і різноплановою. Для клітинних досліджень використано лінії HeLa і HEK293, транзиторну трансфекцію, siRNA-опосередковане зниження експресії G3BP1, add-back підхід, імуофлуоресцентне фарбування, oligo-dT *in situ* гібридизацію, високопродуктивну мікроскопію та конфокальне спостереження. Білок-білкові та білок-РНК взаємодії кількісно аналізували за допомогою microtubule bench recruitment і mixing assays. Біохімічну частину доповнено коімунопреципітацією, вестерн-блот аналізом, EMSA та атомно-силовою мікроскопією.

Важливо, що автор не обмежився надекспресією повнорозмірних білків. Для перевірки функціональної необхідності окремих елементів G3BP1 використано делеції N-кінцевої, C-кінцевої та IDR2 ділянок, а також точкові мутації у функціонально важливих позиціях G3BP1 і Caprin1. Такий дизайн дає змогу відокремити внесок взаємодії з Caprin1 від внеску РНК-зв'язувальних модулів і загальної структурної цілісності G3BP1.

Результати клітинних і *in vitro* експериментів переважно узгоджуються між собою. Надекспресія Caprin1 підсилює рекрутування мРНК до G3BP1-вмісних структур; суміш очищених G3BP1 і Caprin1 формує більші комплекси з нуклеїновою кислотою; делеції, що порушують зв'язування Caprin1 або мРНК, знижують функціональність комплексу. Отже, основний висновок про регуляторну, але не замісну роль Caprin1 є обґрунтованим.

Новизна наукових положень і результатів

Наукова новизна дисертації визначається кількома взаємопов'язаними положеннями. По-перше, у порівняльному дослідженні взаємодій G3BP1 з набором цитоплазматичних РНК-зв'язувальних білків показано особливо

виражений зв'язок із Caprin1. Виявлено, що після зниження рівня G3BP1 саме рекрутування Caprin1 до стресових гранул зазнає найбільшого негативного впливу серед досліджених партнерів, тоді як G3BP2 частково компенсує дефіцит G3BP1.

По-друге, встановлено, що Caprin1 підсилює залучення поліаденільованої РНК до G3BP1-вмісних конденсатів. Цей результат підтверджено кількома експериментальними підходами. У microtubule bench assay надекспресія Caprin1 підвищує сигнал мРНК біля G3BP1-приманки. У безклітинних системах суміш білків сильніше змінює рухливість нуклеїнової кислоти та утворює більші мРНК-вмісні частинки за даними AFM.

По-третє, визначено функціональну асиметрію компонентів комплексу. Caprin1 сам по собі має обмежену здатність рекрутувати мРНК у клітинній системі, а значне посилення відбувається лише за коекспресії повнорозмірного G3BP1. Видалення С-кінцевих РНК-зв'язувальних елементів G3BP1 не компенсується надекспресією Caprin1, хоча білок-білкова взаємодія частково зберігається. Це дозволяє розглядати Caprin1 як регуляторний кофактор G3BP1, а не як незалежний скафолд для мРНК у дослідженій системі.

По-четверте, встановлено особливу роль IDR2. G3BP1-ΔIDR2 зберігає RRM і RGG-збагачену ділянку, рекрутує Caprin1 і входить до вже сформованих стресових гранул, але практично втрачає здатність залучати мРНК та індукувати нові гранули. Автор обґрунтовує модель, за якою IDR2 потрібна для конформаційної перебудови, що робить РНК-зв'язувальні поверхні доступними. Навіть з урахуванням того, що ця модель потребує прямої структурної перевірки, сам експериментальний фенотип є новим і важливим.

Теоретичне і практичне значення отриманих результатів

Теоретично робота розвиває уявлення про стресову гранулу як конденсат, властивості якого визначає не проста сума компонентів, а кооперація між функціонально різними модулями. Цілісність G3BP1 забезпечує одночасну взаємодію з білковим партнером і мРНК, а Caprin1 підвищує ефективність формування РНК-збагачених комплексів. Таким чином, дисертація демонструє, як доменна архітектура одного скафолдного білка та мультивалентність його партнера спільно формують клітинний конденсат.

Практичне значення полягає насамперед у методичних результатах. Розроблені й оптимізовані кількісні схеми аналізу рекрутування білків і мРНК можуть застосовуватися до інших РНП-гранул. Набір конструкцій G3BP1 створює інструментарій для подальшого вивчення стрес-специфічного складу конденсатів, їхньої рухливості та переходу до патологічних агрегатів. Можливість терапевтичної модуляції комплексу G3BP1-Caprin1 поки що є перспективою, а не безпосереднім результатом роботи, однак отримані дані формують необхідне механістичне підґрунтя.

Повнота викладення результатів у наукових публікаціях

Основні результати дисертації опубліковано у двох статтях, проіндексованих у міжнародній базі Scopus. Перша стаття – «mRNA recruitment by G3BP1 condensates is regulated by Caprin1 but requires G3BP1 binding to mRNA» – опублікована у Scientific Reports у 2025 році і відображає центральну концепцію роботи. Друга стаття – «Intrinsically disordered region 2 of G3BP1 is required for RNA recruitment by G3BP1-Caprin1 complex» – опублікована у Biopolymers and Cell у 2026 році та містить результати щодо IDR2. Крім того, взаємодії G3BP1 з цитоплазматичними РНК-зв'язувальними білками представлено у матеріалах міжнародної конференції 2023 року.

Особистий внесок здобувача в публікації включає виконання основної частини експериментів, збір, обробку й аналіз даних, підготовку ілюстрацій та участь у написанні рукописів. Опубліковані праці достатньо повно відображають результати дисертації і відповідають її темі.

Відсутність порушень академічної доброчесності

У дисертації використані ідеї та результати інших авторів супроводжуються бібліографічними посиланнями. Спільно виконані дослідження і внесок закордонних колег зазначено у вступі та публікаціях. Відкрито повідомлено, що рукопис адаптовано з дисертації, раніше захищеної в Університеті Париж-Сакле. За результатами ознайомлення з текстом підстав для висновку про порушення академічної доброчесності не виявлено.

Структура й обсяг дисертації, оцінка її змісту та завершеності

Дисертація містить анотації українською та англійською мовами, перелік публікацій, список скорочень, вступ, чотири основні розділи, висновки, бібліографію і додаток. Заявлений обсяг становить 136 сторінок, у роботі наведено 38 рисунків і 5 таблиць, список використаних джерел включає 127 найменувань. Основний текст дисертації викладено англійською мовою.

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет, наведено методи, наукову новизну, практичне значення, особистий внесок, публікації та структуру роботи. Особливу увагу приділено ролі стресових гранул у перерозподілі мРНК і патологічній агрегації РНК-зв'язувальних білків.

Перший розділ – огляд літератури – охоплює принципи організації РНК-білкових гранул, склад і динаміку стресових гранул, структуру та функції G3BP1, регуляцію його активності, будову Caprin1, взаємодію G3BP1-Caprin1 та значення цих білків у нейрональних процесах, інфекціях і раку. Огляд містить сучасні джерела та безпосередньо підводить до постановки експериментальних завдань.

Другий розділ присвячено матеріалам і методам. Описано плазмідні конструкції, клітинні культури, recruitment і mixing assays на microtubule bench, імунофлуоресценцію, RNA-FISH, high-content imaging, add-back експерименти, очищення білків, коімунопреципітацію, EMSA, AFM і статистичний аналіз. Методичний розділ загалом достатній для розуміння дизайну та відтворення ключових етапів.

У третьому розділі наведено основні експериментальні результати. Підрозділ 3.1 демонструє вибірковість взаємодій G3BP1 та залежність рекрутування партнерів від його рівня. Підрозділ 3.2 характеризує РНК-зв'язувальні властивості комплексу G3BP1-Caprin1 і містить аналіз делеційних та точкових мутантів. Підрозділ 3.3 пов'язує доменну будову G3BP1 із формуванням стресових гранул та інтегральним накопиченням мРНК. Розділ містить значний масив кількісних даних, які супроводжуються обговоренням.

У четвертому розділі автор узагальнює результати, зіставляє їх із сучасними моделями конформаційної регуляції G3BP1 та пропонує модель функціонування G3BP1-ΔIDR2. Висновки відповідають поставленим завданням і відображають основні результати. Робота є завершеною за логікою, обсягом і рівнем узагальнення.

Основний текст викладено англійською мовою у зв'язку з міжнародною спільною підготовкою. Загалом стиль науковий, матеріал подано послідовно. Водночас у тексті наявні окремі граматичні, термінологічні й технічні неточності, а деякі формулювання потребують редакційного уточнення. Ці недоліки не впливають на достовірність результатів.

Особистий внесок здобувача

Здобувач особисто або за безпосередньої участі виконав більшість експериментів, здійснив кількісний аналіз, статистичну обробку, інтерпретацію даних і підготовку ілюстрацій. Атомно-силову мікроскопію виконано у співпраці з професором Лоїком Амоном, а одержання та очищення рекомбінантних білків - у співпраці з доктором Хуаном Карлосом Ренгіфо-Гонсалесом. Мета, дизайн і обговорення роботи формувалися за участю наукових керівників та міжнародної групи, що є природним для програми спільної аспірантури. Особистий внесок Лавриненка К. Д. є достатнім для кваліфікаційної роботи доктора філософії.

Зауваження щодо змісту та оформлення, питання до здобувача

Дисертація справляє позитивне враження, а наведені зауваження не знижують її наукової цінності. Вони стосуються меж інтерпретації та можливих способів посилення доказової бази.

1. Ідентифікацію стресових гранул у частині експериментів здійснено за локальним накопиченням G3BP1 та полі(A)+ РНК. Чи використовувалися

додаткові канонічні маркери, наприклад, TIA-1, eIF3b або PABP, і чи перевірялося пригнічення трансляції?

2. За яким методом було трансфіковано компетентні клітини плазмідною GFP/RFP-MBD?
3. Після siRNA-обробки рівень цитоплазматичного G3BP1 знижувався приблизно на 29 %. Чи достатній такий ступінь зниження для висновків про функціональну необхідність G3BP1? Наскільки результати могли б змінитися у G3BP1/2 knockout клітинах із подальшим add-back повнорозмірних і мутантних конструкцій?
4. Microtubule bench assay є потужним кількісним підходом, але примусово підвищує локальну концентрацію білка на мікротрубочках. Як контролювали вплив рівня експресії bait і prey білків на recruitment score та mixing score? Наскільки, на думку автора, отримані результати можуть залежати від локальної концентрації G3BP1 та Caprin1 у цій експериментальній системі? Будь ласка, більш детально охарактеризуйте протокол MT bench assays, оскільки це новітня технологія в молекулярній біології і які побічні ефекти можуть впливати на рівень експресії цільових продуктів?
5. Усі основні експерименти зі стресовими гранулами виконано після дії арсеніту натрію. Чи можна очікувати аналогічної ролі комплексу G3BP1-Caprin1 за теплового, осмотичного, гіпоксичного або вірус-індукованого стресу? Які компоненти механізму, на думку автора, є універсальними, а які можуть бути стрес-специфічними?
6. У high-content imaging аналізуються сотні або тисячі клітин. Яка одиниця була використана як незалежна біологічна репліка під час статистичного тестування - окрема клітина, поле зору чи незалежний експеримент? Як уникали впливу міжекспериментальної варіабельності. Що слугувало незалежним контролем у проведених експериментах?
7. Використаний oligo-dT-зонд дає інтегральну оцінку полі(A)+ РНК, але не дозволяє визначити її функціональний склад. Чи можуть Caprin1 і G3BP1 вибірково залучати мРНК, пов'язані з виживанням, апоптозом або відновленням клітини? Які транскрипти є найперспективнішими для подальшої перевірки?
8. Основні експерименти проведено на малігнізованих клітинах раку шийки матки людини лінії HeLa. Проте відомо, що малігнізовані клітини є більш стресостійкими. Чи відомо Вам подібні результати, які було би проведено на нормальних клітинах щодо рівня експресії чинників, задіяних у накопиченні стресових гранул?
9. Було б непогано назвати переваги та недоліки проведеного експериментального дослідження та наголосити на науково-практичному

значенні ідентифікації стресових гранул як можливого маркера за різних типів стресових чинників.

Висновок

Дисертаційна робота Лавриненка Кирила Дмитровича «Взаємодія Caprin1 і G3BP1 сприяє G3BP1-опосередкованому рекрутуванню мРНК до стресових гранул» є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому отримано нові експериментально обґрунтовані дані про механізми рекрутування мРНК до стресових гранул. Автор встановив кооперативну роль Caprin1, довів необхідність безпосередньої РНК-зв'язувальної активності та структурної цілісності G3BP1 і визначив функціональне значення внутрішньо неупорядкованої ділянки IDR2.

За актуальністю, науковою новизною, обсягом досліджень, методичним рівнем, достовірністю результатів, теоретичним і практичним значенням, повнотою публікацій та оформленням дисертація відповідає Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України № 40 від 12 січня 2017 року (зі змінами), і Порядку присудження ступеня доктора філософії, затвердженому постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами). Лавриненко Кирило Дмитрович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук,

професор кафедри екології та зоології

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса

Шевченка

Людмила

ГАРМАНЧУК