

РЕЦЕНЗІЯ

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 роботи

Дисертаційна робота Лавриненка К. Д. присвячена дослідженню молекулярних механізмів взаємодії білків G3BP1 та Caprin1 у процесах рекрутування РНК та формування стресових гранул. Обрана тема є актуальною, оскільки стресові гранули є ключовими регуляторами клітинної відповіді на різні види стресу, а порушення їхньої динаміки пов'язують із розвитком нейродегенеративних, онкологічних та вірус-асоційованих патологій.

Зв'язок дисертації з науковими програмами та міжнародною співпрацею

Роботу виконано у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Значну частину досліджень проведено у співпраці з лабораторією SABNP Університету Париж-Сакле, INSERM та Університету Еврі в межах програми IDEX Paris-Saclay Doctoral Action. Міжнародний характер роботи відобразився у використанні у дослідженнях розробленого у французькій лабораторії методу microtubule bench, а також атомно-силової мікроскопії.

Ступінь обґрунтованості та достовірності результатів

Дисертаційне дослідження виконано на сучасному методичному рівні із застосуванням комплексу взаємодоповнювальних біохімічних, молекулярно-біологічних та клітинних методів. Автор використовує аналіз мутантних конструкцій, експерименти з **knockdown** та **add-back**, EMSA, атомно-силову мікроскопію, а також сучасний метод **Microtubule Bench Assay**, який дозволяє оцінювати рекрутування білків і РНК до штучно сформованих платформ на мікротрубочках та досліджувати білок-білкові й білок-РНК взаємодії, залучені до формування стресових гранул. Важливою перевагою роботи є використання кількох незалежних експериментальних підходів для перевірки певних наукових положень, що забезпечує високий рівень достовірності отриманих результатів. Наукові результати ґрунтуються на достатньому обсязі статистично достовірних експериментальних даних, є логічно взаємопов'язаними та загалом належним чином обґрунтованими.

Наукова новизна отриманих результатів

Отримані результати розширюють сучасні уявлення про молекулярні механізми клітинної відповіді на стрес і мають важливе фундаментальне значення для розуміння принципів організації та регуляції стресових гранул. Дисертаційна робота суттєво поглиблює існуючі моделі функціонування комплексів G3BP1–Caprin1, уточнюючи їхню роль у контролі РНК-асоційованих процесів та адаптації клітин до несприятливих умов. Зокрема показано, що Caprin1 функціонально підсилює рекрутування мРНК повнорозмірним G3BP1, вперше показана роль внутрішньо неупорядкованої ділянки G3BP1 у зв'язуванні нуклеїнової кислоти, зокрема, завдяки її ролі у підтриманні певної конфігурації просторової організації цього білка.

Теоретичне та практичне значення

Отримані результати є фундаментальними і доповнюють сучасну концепцію стресових гранул як динамічних багатокомпонентних систем, у яких властивості окремого білка визначаються не лише наявністю окремих мотивів, а цілісною доменною архітектурою, конформаційною пластичністю та взаємодіями з партнерами. Запропонована модель G3BP1-Caprin1 узгоджує білок-білкову взаємодію, РНК-зв'язування та фазову поведінку в єдиному механістичному описі.

Повнота опублікування та апробації результатів

За темою дисертації опубліковано дві статті, що індексуються у Scopus. У статті в журналі Scientific Reports (Q1, IF 4.9) викладено основний масив даних щодо регуляції рекрутування мРНК комплексом G3BP1-Caprin1. У статті в журналі Biopolymers and Cell (Q4, категорія А українських фахових журналів) висвітлено роль IDR2 у функціонуванні комплексу. Матеріали також апробовано на міжнародній науковій конференції. Публікації достатньо повно відображають положення, що виносяться на захист.

Оцінка структури й оформлення дисертації

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, узагальнювального розділу, висновків, бібліографії та додатка. Заявлений обсяг становить 136 сторінок; роботу ілюстровано 38 рисунками і 5 таблицями, список літератури охоплює 127 джерел. Структура відповідає логіці експериментального дослідження.

Огляд літератури є змістовним і охоплює як загальні принципи фазового розділення та організації РНП-гранул, так і доменну будову G3BP1,

особливості Caprin1 та їхню роль у патологічних процесах. Методичний розділ містить необхідні відомості для відтворення основних процедур. Результати подано за проблемним принципом, а не як простий перелік методів, що полегшує розуміння причинно-наслідкових зв'язків. Рисунки загалом інформативні, а висновки відповідають меті і завданням.

Основний текст англomовний, що відповідає міжнародному формату підготовки роботи; анотації подано двома мовами. У рукописі є поодинокі редакційні неточності, неповні речення та випадки недостатньо уніфікованої термінології, однак вони не змінюють наукового змісту.

Особистий внесок і академічна доброчесність

Лавриненко К. Д. виконав основний обсяг експериментальної роботи, здійснив обробку та аналіз даних, підготував ілюстрації та брав участь у написанні публікацій. Спільно виконані етапи – атомно-силова мікроскопія та одержання рекомбінантних білків – чітко зазначено. Посилання на літературні джерела оформлено належним чином. Ознак порушення принципів академічної доброчесності під час ознайомлення з дисертацією не виявлено.

Зауваження і питання до здобувача

Попри загальне позитивне враження, дисертаційна робота містить окремі недоліки та дискусійні положення, що потребують додаткового уточнення.

1. У тексті огляду літератури трапляються окремі неточності, зокрема щодо опису механізму функціонування комплексу eIF2/eIF2B. Зокрема, автор зазначає, що зв'язування фосфорильованого eIF2 α з eEF1B перешкоджає здатності eIF2 α каталізувати перетворення GDP на GTP. Насправді eIF2 α не каталізує процес синтезу GTP з GDP, а лише регулює активність eIF2B. Водночас і eIF2B не здійснює синтез GTP з GDP, а виконує функцію фактора обміну гуанінових нуклеотидів, прискорюючи заміну GDP на GTP у γ -субодиниці комплексу eIF2, про яку в тексті дисертації взагалі не згадується. Відповідно, наведена на рис. 1.2 схема містить неточності. Посилання на опубліковане джерело не звільняє автора від необхідності критичної оцінки запозиченого матеріалу.

2. Автор пояснює слабку взаємодію G3BP2 із G3BP1 у Microtubule Bench Assay відсутністю стресових умов. Водночас у цьому ж експерименті Caprin1 демонструє ефективну взаємодію з G3BP1 за аналогічних умов. У зв'язку з цим виникає питання, чи пов'язана відсутність взаємодії G3BP2 виключно з біологічними особливостями досліджуваних білків, чи певною мірою також з обмеженнями самого методу Microtubule Bench Assay?

3. Використання EMSA з одноланцюговою ДНК як моделі РНК потребує більш ґрунтовного обговорення можливих обмежень такого підходу. Незважаючи на схожість окремих фізико-хімічних властивостей, одноланцюгова ДНК та РНК істотно відрізняються за своєю конформаційною динамікою, вторинною структурою та просторовою організацією, що потенційно може впливати на взаємодію з РНК-зв'язувальними білками. Було б доцільно пояснити, чому для дослідження не використовувалися молекули РНК, наприклад синтетичні транскрипти або РНК рослинних вірусів, які широко застосовуються як модельні субстрати у дослідженнях РНК-білкових взаємодій.

4. Доцільно було б представити електрофоретичну характеристику очищених рекомбінантних білків, використаних у дослідженнях *in vitro*. За відсутності таких даних складно оцінити ступінь чистоти та цілісності білкових препаратів і, відповідно, відповідність заявлених кількостей білка реальній концентрації функціонально активних молекул. Оскільки результати EMSA базуються на порівнянні концентраційних залежностей взаємодії різних білків із нуклеїновою кислотою, можливі відмінності у якості білкових препаратів можуть певною мірою впливати на інтерпретацію отриманих результатів.

5. Потребує уточнення походження 2Luc mRNA, яка використовувалася в експериментах з атомно-силовою мікроскопією. У тексті дисертації відсутня інформація щодо способу отримання цієї РНК, методів визначення її концентрації та контролю її якості, що ускладнює відтворення проведених експериментів.

Висловлені зауваження і питання не мають принципового характеру та не знижують загальної наукової цінності виконаного дослідження.

Загальний висновок

Дисертаційна робота Лавриненка Кирила Дмитровича «Взаємодія Caprin1 і G3BP1 сприяє G3BP1-опосередкованому рекрутуванню мРНК до стресових гранул» є завершеним самостійним дослідженням, яке містить нові та експериментально обґрунтовані положення щодо структурно-функціональної організації комплексу G3BP1-Caprin1, його участі у зв'язуванні мРНК і формуванні стресових гранул. Науковий рівень роботи, методичний спектр, достовірність даних та повнота публікацій відповідають вимогам до кваліфікаційних робіт доктора філософії.

Дисертація відповідає Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України № 40 від 12 січня 2017 року (зі змінами), та Порядку присудження ступеня доктора філософії, затверджені постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами). Лавриненко Кирило

Дмитрович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія».

Рецензент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач відділу структурної
і функціональної протеоміки
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України

Борис НЕГРУЦЬКИЙ