

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 теми дисертаційної роботи

РНК-зв'язувальні білки є центральними регуляторами дозрівання, транспорту, локалізації, трансляції та деградації РНК. За умов клітинного стресу їхня роль особливо зростає, оскільки клітина повинна швидко перебудувати програму синтезу білка, тимчасово обмежити загальну трансляцію та водночас зберегти молекули мРНК, необхідні для подальшого відновлення. Одним із механізмів такої адаптації є утворення стресових гранул – динамічних немембранних рибонуклеопротейінових конденсатів, формування яких відбувається за участю слабких мультівалентних взаємодій між РНК і білками та пов'язане з рідинно-рідинним фазовим розділенням.

G3BP1 належить до ключових білків-організаторів стресових гранул і поєднує здатність до димеризації, взаємодії з численними білковими партнерами та зв'язування РНК. Його функціональна взаємодія з Caprin1 є важливою для складання стресових гранул, однак внесок кожного компонента комплексу G3BP1-Caprin1 у зв'язування та рекрутування мРНК до початку представленого дослідження залишався недостатньо з'ясованим. Саме тому дисертація Лавриненка К. Д., спрямована на встановлення механізму кооперативної дії G3BP1 і Caprin1, відповідає актуальним напрямкам сучасної молекулярної біології РНК, біології трансляції та досліджень біомолекулярних конденсатів.

Актуальність роботи посилюється тим, що порушення динаміки стресових гранул і патологічна агрегація РНК-зв'язувальних білків пов'язані з нейродегенеративними захворюваннями, вірусними інфекціями та онкологічними процесами. Отже, з'ясування базових закономірностей взаємодії G3BP1, Caprin1 і мРНК має не лише фундаментальне, а й перспективне біомедичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Дисертаційне дослідження виконано відповідно до плану наукової роботи відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у співпраці з лабораторією SABNP Університету Париж-Сакле, INSERM та Університету Еврі в межах програми спільної аспірантури IDEX Paris-Saclay Doctoral Action. Такий формат дав змогу поєднати клітинно-біологічні, молекулярно-біохімічні та наноструктурні підходи.

Представлена до українського захисту робота структурована відповідно до вимог національної атестації та доповнена відомостями про наукові публікації, особистий внесок і результати, що виносяться на захист.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень та висновків

Мета роботи сформульована чітко і полягає у дослідженні взаємодії G3BP1 з Caprin1 у клітинній системі та *in vitro*, характеристиці здатності цих білків і комплексу G3BP1-Caprin1 зв'язувати мРНК, а також у з'ясуванні ролі цього комплексу в рекрутуванні мРНК до стресових гранул. П'ять поставлених завдань логічно охоплюють послідовні рівні дослідження: від оцінки білок-білкових взаємодій до аналізу доменної організації G3BP1, формування конденсатів і накопичення мРНК у стресових гранулах.

Для розв'язання завдань використано взаємодоповнювальний набір методів: культивування клітин HeLa і HEK293, трансфекцію та siRNA-опосередковане зниження експресії G3BP1, імуофлуоресцентне фарбування, флуоресцентну *in situ* гібридизацію поліаденільованої РНК, високопродуктивну мікроскопію, microtubule bench recruitment і mixing assays, add-back експерименти, клонування конструкцій, експресію та очищення рекомбінантних білків, коімунопреципітацію, вестерн-блот аналіз, електрофоретичний аналіз рухливості нуклеопротейнових комплексів, атомно-силову мікроскопію та статистичну обробку даних. Поєднання клітинних і безклітинних систем є істотною перевагою дослідження, оскільки дає змогу перевіряти висновки на різних рівнях організації.

Основні результати підтверджено серіями незалежних експериментів, кількісним аналізом великої кількості клітин та використанням відповідних контрольних білків і конструкцій. Висновки загалом відповідають поставленим завданням, логічно випливають із наведених даних і коректно розмежовують функції G3BP1 як безпосереднього РНК-зв'язувального компонента та Caprin1 як регуляторного партнера, що посилює його активність.

Наукова новизна та повнота викладення результатів у публікаціях

У дисертації вперше комплексно охарактеризовано функціональну взаємодію G3BP1 і Caprin1 у контексті рекрутування мРНК до стресових гранул. Показано, що серед досліджених цитоплазматичних РНК-зв'язувальних білків Caprin1 є одним із найвиразніших функціональних партнерів G3BP1, а його залучення до стресових гранул істотно залежить від наявності функціонального G3BP1.

Новим є встановлення того, що надекспресія Caprin1 підвищує рекрутування мРНК до G3BP1-вмісних конденсатів, а суміш G3BP1 і Caprin1 утворює більші нуклеопротейнові комплекси порівняно з кожним білком окремо. Водночас показано принципове обмеження цієї кооперації: Caprin1 не здатний компенсувати втрату власної РНК-зв'язувальної функції G3BP1. Посилення рекрутування мРНК спостерігається лише за наявності повнорозмірного G3BP1, який одночасно взаємодіє з Caprin1 і нуклеїновою кислотою.

Окрему наукову цінність мають результати щодо внутрішньо неупорядкованої ділянки IDR2. Конструкт G3BP1-ΔIDR2, попри збереження RRM-домену та RGG-збагаченої ділянки, різко втрачає здатність рекрутувати мРНК у клітинах і зв'язувати нуклеїнову кислоту *in vitro*, але частково зберігає взаємодію з Caprin1 та локалізацію у стресових гранулах. Це розширює уявлення про роль внутрішньо неупорядкованих ділянок не лише як лінійних лінкерів, а як елементів конформаційної регуляції РНК-зв'язувальних білків.

Основні результати викладено у двох наукових статтях, проіндексованих у Scopus. Статтю про регуляцію рекрутування мРНК комплексом G3BP1-Caprin1 опубліковано у журналі Scientific Reports, віднесеному у матеріалах дисертації до Q1. Результати щодо ролі IDR2 оприлюднено у журналі Biopolymers and Cell, який належить до категорії А фахових видань України та індексується у Scopus. Крім того, результати апробовано у матеріалах міжнародної наукової конференції. Зміст публікацій відповідає основним положенням дисертації, а внесок здобувача у спільні роботи конкретизовано.

Теоретичне і практичне значення результатів

Теоретичне значення дисертації полягає в уточненні моделі формування стресових гранул, відповідно до якої ефективність утворення функціонально активних РНП-конденсатів визначається не одним домінантним чинником, а поєднанням концентрації РНК, конформаційного стану G3BP1, цілісності його доменної організації та мультивалентних білок-білкових взаємодій. Робота переконливо демонструє, що білковий партнер може посилювати РНК-зв'язувальну функцію скафолдного білка, але не замінює його безпосереднього контакту з РНК.

Практичне значення має оптимізація кількісних підходів до оцінки залучення білків і мРНК у клітинні конденсати, зокрема microtubule bench assays та інтегрального аналізу полі(А)+ РНК у стресових гранулах. Ці підходи можуть бути використані для вивчення інших РНК-зв'язувальних білків, фазово-розділених структур і патологічних РНП-агрегатів. Біомедичне застосування результатів на цьому етапі має перспективний характер, однак створене механістичне підґрунтя є важливим для подальших досліджень нейродегенеративних, вірусних і онкологічних патологій.

Оцінка структури, змісту, мови та оформлення дисертації

Дисертація має логічну структуру і складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів, розділу результатів та їх обговорення, узагальнювального розділу, висновків, списку використаних джерел і додатка. У рукописі зазначено обсяг 136 сторінок, 38 рисунків, 5 таблиць і 127 бібліографічних джерел.

У першому розділі систематизовано сучасні відомості про РНК-зв'язувальні білки, принципи організації РНП-гранул, динаміку та склад стресових гранул, доменну будову і функції G3BP1, структуру Caprin1 та патологічне значення цих білків. Огляд формує належне теоретичне підґрунтя для постановки експериментальних завдань.

Другий розділ містить достатньо детальний опис клітинних та *in vitro* методик. Третій розділ послідовно розкриває взаємодію G3BP1 з РНК-зв'язувальними білками, властивості комплексу G3BP1-Caprin1 щодо зв'язування нуклеїнових кислот, а також роль окремих доменів G3BP1 у складанні стресових гранул і рекрутуванні мРНК. У четвертому розділі результати зіставлено з даними літератури та запропоновано робочу модель функціонування комплексу. Сім висновків відповідають завданням і відображають основні результати.

Основний текст викладено англійською мовою, а анотації подано англійською та українською. Такий формат пов'язаний з міжнародною програмою спільної підготовки. Текст загалом написано послідовно і зрозуміло,

ілюстративний матеріал є інформативним. Трапляються окремі мовностилістичні та технічні неточності в англomовних формулюваннях, які не впливають на науковий зміст роботи.

Особистий внесок здобувача та дотримання академічної доброчесності

Згідно з наведеними у дисертації відомостями, основну частину експериментів, обробку, кількісний аналіз та інтерпретацію результатів Лавриненко К. Д. виконав особисто або за безпосередньої участі. Атомно-силову мікроскопію проведено у співпраці з професором Лоїком Амоном, а отримання рекомбінантних білків – у співпраці з доктором Хуаном Карлосом Ренгіфо-Гонсалесом. Розподіл внесків у спільних публікаціях зазначено коректно.

Під час ознайомлення з рукописом не виявлено ознак некоректного використання ідей, результатів або текстів інших авторів: літературні дані супроводжуються посиланнями, а спільно виконані фрагменти дослідження ідентифіковано. Факт підготовки адаптованої версії дисертації після захисту в Університеті Париж-Сакле прямо задекларовано, що забезпечує належну прозорість походження тексту і результатів.

Зауваження та дискусійні питання

Загальна оцінка дисертації є позитивною. Наведені нижче зауваження і питання мають переважно дискусійний характер та окреслюють можливі напрями продовження дослідження.

1. У клітинних експериментах для оцінки мРНК використано флуоресцентний oligo-dT-зонд, який відображає загальний пул поліаденільованих транскриптів. Чи очікує автор, що G3BP1-Caprin1 рекрутує мРНК переважно неспецифічно, відповідно до довжини та концентрації РНК, чи комплекс має виражену транскрипту селективність? Які підходи - smFISH для окремих мРНК, CLIP-seq, RNA-seq гранульної фракції - були б найдоцільнішими для перевірки цього припущення?
2. У первинних дослідках зі зниженням рівня G3BP1 зміни відносного збагачення мРНК у гранулах описано як невиразні, тоді як в add-back експериментах інтегральна кількість мРНК у стресових гранулах зменшувалась. Було б корисно чіткіше розмежувати показники «відносне збагачення», «площа гранул» та «загальна кількість мРНК у гранулах». Який із цих параметрів автор вважає найбільш біологічно інформативним?
3. Основну клітинну модель стресових гранул створено за допомогою арсеніту натрію. Наскільки, на думку здобувача, виявлена кооперація G3BP1 і Caprin1 є універсальною для інших типів стресу, зокрема теплового, осмотичного або стресу ендоплазматичного ретикулума, а також для eIF2 α -незалежних шляхів формування гранул?
4. Робота переконливо характеризує накопичення мРНК у стресових гранулах, проте безпосередньо не оцінює подальшу долю цих транскриптів після припинення стресу. Чи може зміна співвідношення G3BP1/Caprin1 впливати на повернення мРНК до трансляції, швидкість розбирання гранул або вибіркоче відновлення синтезу білка?
5. Доцільно було б уніфікувати в тексті терміни «mRNA recruitment», «RNA binding» та «nucleic-acid binding», оскільки різні методи оцінюють не

тотожні явища. Таке редакційне уточнення зробило б межі інтерпретації результатів ще чіткішими.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лавриненка Кирила Дмитровича «Взаємодія Caprin1 і G3BP1 сприяє G3BP1-опосередкованому рекрутуванню мРНК до стресових гранул» є самостійною завершеною науковою працею, у якій розв'язано актуальне завдання сучасної молекулярної біології – встановлено функціональний внесок комплексу G3BP1-Caprin1 у рекрутування мРНК до стресових гранул та визначено роль доменної цілісності G3BP1 у цьому процесі. Робота характеризується належним методичним рівнем, достатнім обсягом експериментального матеріалу, науковою новизною, теоретичною значущістю та перспективою практичного використання розроблених підходів.

За змістом, структурою, рівнем обґрунтованості результатів, повнотою їх оприлюднення та дотриманням принципів академічної доброчесності дисертація відповідає Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року (зі змінами), та Порядку присудження ступеня доктора філософії і скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради, затвердженому постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року (зі змінами). Її автор, 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,
головний науковий співробітник
відділу ензимології білкового синтезу
Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України



Марія ОБОЛЕНСЬКА

Підпис 
посвідчується

