

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Лябина Дмитрия Николаевича «РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1 И ЕГО РОЛЬ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Диссертационная работа Дмитрия Николаевича Лябина “Регуляция синтеза Y-боксы-связывающего белка 1 и его роль в экспрессии генов” подводит итог долгому периоду исследований этого главного белка у мРНК клеток животных. Оппонент этой диссертации хорошо помнит времена, когда мы вслед за академиком А.С. Спириным в семидесятых годах с придыханием произносили слово “информосома”. Тогда на заре развития молекулярной биологии эукариот стало ясно, что в животных клетках все мРНК за чем-то связаны со специальными белками и представляют собой мРНК. Потом выяснилось, что мажорным белком мРНК является белок с молекулярной массой около 50 кДа, пока наконец не нашли, что он является одновременно фактором транскрипции и связывает так называемый Y- бокс в промоторах некоторых генов, в связи с чем получил название YB-1 белок. Это добавило еще большую интригу, каким образом работает этот белок, коль скоро он участвует и в транскрипции и трансляции. С тех пор прошло около 40 лет, а еще много вопросов по поводу функций этого белка до сих пор остается.

Диссертация построена по традиционному плану. Она состоит из шести основных разделов (глав): Введение, Обзор литературы, Материалы и Методы, Результаты и Обсуждение, Выводы, Список литературы. Кроме того, в конце диссертации есть еще раздел Приложение, который представляет читателю очень полезные дополнительные рисунки и схемы, касающиеся верификации полученных в работе данных. Следует сразу сказать, что всего по теме диссертации опубликовано 15 работ во вполне авторитетных журналах. Большая часть из них опубликованы в журналах 1-ого квартиля, в том числе таких как PLOS ONE и RNA Biology.

В Обзоре литературы к диссертации ее автор не забыл ничего более или менее примечательного из опубликованных работ по белку YB-1, включая то, что было сделано за этот период в Институте Белка РАН и самим автором диссертации. Он может быть безусловно рекомендован как ценнейший источник информации для тех, кто заинтересуется соответствующей проблемой и захочет продвинуться дальше в ее решении, а интригующих вопросов осталось еще достаточно.

В Обзоре цитируются 453 работы из общего списка в 532 работы. Да и в целом диссертация представляет собой объемистый труд, насчитывающий 316 страниц вместе с рисунками. Работа очень тщательно проиллюстрирована.

На взгляд оппонента основная трудность в исследованиях функции белка YB-1, а как известно, сейчас известны уже его гомологи, YB-2 и YB-3, о которых мы знаем еще меньше, чем о YB-1, что он выполняет какие-то общие функции, необходимые для многих мРНК. Для исследователей было бы гораздо проще, если бы YB-белки выполняли в клетках какие-нибудь узко специфические функции, но очевидно, что это не так или не совсем так. Поэтому, чтобы продвинуться в понимании того, что же YB-белки делают в животных клетках, необходимо перед собой ставить очень конкретные задачи, искать

новые экспериментальные подходы, которые бы позволяли получать четкие, желательно однозначные ответы. Это совсем непросто.

Одной из основных задач, которые поставил перед собой автор диссертации и его коллеги, это понять как регулируется содержание белка YB-1 и его гомологов в клетках, происходит ли авторегуляция синтеза YB-1 и если да, то с помощью какого механизма. Кроме того, важно было знать, как снижение или повышение концентрации YB-1 в клетках влияет на трансляцию отдельных групп (кластеров) РНК, и в какой степени. Наконец, каковы взаимоотношения между гомологами YB-1, как они влияют друг на друга?

Авторы сделали ряд важных наблюдений о регуляции трансляционной активности YB-1 мРНК. Оказалось, что эта активность особенно чувствительна к ингибированию mTOR-киназного каскада. Другими словами, YB-1 мРНК относится к тем матрицам, которые особенно сильно подавляются при нарушении связывания иницирующих факторов eIF4E и eIF4G1 с кеп-структурой на их 5'-концах. Предполагается, что YB-1 мРНК и здесь имеет свои особенности и это возможно определяется специфической структурой ее 5'-НТО и взаимодействием с ней самого белка YB-1. Другими словами, в случае белка YB-1 мы вероятно имеем дело с авторегуляцией, то есть ингибированием активности мРНК кодируемым ею белком. Интересно, что нокаут по YB-1 в клетках НЕК293Т не приводит к глобальным изменениям ни в транскриптом, ни в транслятом этой клеточной культуры. В диссертации убедительно показано, что причиной этого является тот факт, гомолог YB-1, YB-3, способен в значительной степени заменять YB-1 в его функциях, особенно тех, которые относятся к трансляции. С другой стороны, в свою очередь, как показано в Диссертации, YB-1 способен к регуляции трансляционной активности мРНК, кодирующей YB-3, взаимодействуя при этом с 5'-НТО (а возможно и с 3'-НТО) в нуклеотидной последовательности YB-3 мРНК.

Кроме того, как показано диссертантом и его сотрудниками, YB-1 регулирует свой собственный синтез, предотвращая синтез избыточного количества белка путем блокировки собственной матрицы. Это, как предполагается в диссертации, происходит при участии белков hnRNPQ и поли(А)-связывающего белка PABP, но вопрос требует еще дополнительных исследований.

Список работ Д.Н. Лябина охватывает период в 17 лет. Очень хорошо, что автор диссертации старался идти в ногу со временем и использовал в своей работе новые технологии, в том числе работы с клеточными культурами и современные полнотранскриптомные методы анализа, чтобы выяснить как изменения в концентрации YB-1 и YB-3 влияют на эффективность работы разных индивидуальных мРНК. Оппонент уверен, что тем самым накоплен ценнейший материал и приобретенные навыки наверняка еще понадобятся, если автор диссертации продолжит работу по исследованию функции YB-белков. Действительно, такие работы совершенно необходимы для уверенности, что полученные результаты действительно отражают то, что происходит в живых клетках. Они незаменимы для оценки, причем количественной, эффектов в масштабе всего транскриптома или транслятома. Это то, что и было сделано группой Лябина в последние годы по сравнению с более ранними исследованиями: она перешли к полномасштабному анализу трансляции на специально полученных клеточных линиях с нокаутами по YB-1 и YB-3. Это новое слово в исследовании YB-белков, поскольку ранее исследования функций проводились главным образом в бесклеточных экстрактах.

Более того, современные технологии позволяют количественно оценивать изменения в эффективности трансляции сразу всех мРНК клетки. Как показано в работе, трансляцию

разных мРНК в таких клеточных линиях с нокаутом по YB-1 или YB-3 можно сравнивать с трансляцией тех же мРНК в клеточных линиях, где в нокаутных штаммах экспрессировали с плазмид экзогенные YB-1, YB3 или оба белка одновременно. Такие эксперименты способны давать очень любопытные и важные результаты. В частности, как уже указывалось выше, Д.Н. Лябину и сотр. удалось установить, что нокаут по основному белку YB-1 весьма незначительно сказывается на трансляции клеточных мРНК. Оказывается, его функцию на себя берет его гомолог YB-3.

Автор диссертации, на основании полученных полнотранскриптомных данных делает, по-видимому, важный и правильный вывод, что при умеренной концентрации YB-1 одни мРНК активируются, например мРНК, участвующие в пролиферации или других, ключевых клеточных процессах, а другие, наоборот, снижают свою активность. При избыточных же концентрациях, происходит подавление активности и тех и других, но включается также и блокировка мРНК, кодирующей сам YB-1, что приводит в конце концов к снижению его концентрации в клетках и восстановлению необходимого баланса в работе разных мРНК при данных конкретных условиях.

Кроме этих данных, относящихся непосредственно к регуляции трансляции в клетках с помощью YB-белков, автор диссертации и его сотрудники сделали и другие открытия, значение которых еще предстоит оценить. Они обнаружили альтернативные формы мРНК для YB-1, которые образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена YBX1, и формы, удлиненной с N- конца формы YB-1, образующейся за счет инициации трансляции на неканоническом кодоне AUC в 5'- НТО основной формы мРНК YB-1, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG триплет. Какова функция эти дополнительных форм белка YB-1 пока неизвестно, до этого руки диссертанта и его сотрудников пока, как говорится, не дошли. Но это безусловно важные и интересные наблюдения и они в будущем будут востребованы.

Какие есть недостатки в диссертации? Особых серьезных недостатков, которые стоило бы поставить в упрек диссертанту, каких-то явных ошибок или просчетов, рецензент в работе не усмотрел. Можно лишь говорить о том, каких данных по функции YB-1 и его гомологов пока явно хватает. Но это скорее является не критикой работы Д.Н. Лябина и его сотрудников, а относится скорее к пожеланиям на будущее, к пожеланиям, какая информация по YB-белкам нам очень нужна. Мы имеем, например, очень слабые представления о молекулярных механизмах, посредством которых эти белки работают. То, что они связываются с мРНК, скорее всего с их 5'- и 3'-НТО это скорее всего так, а вот что происходит дальше? Почему они стимулируют одни мРНК, а на другие матрицы практически не действуют, или же попросту ингибируют их при избытке. Связываются ли при этом какие-то другие белковые факторы? Если да, то что они делают? И почему при избытке YB-1 они перестают работать? Рецензент полагает, что без старых добрых молекулярно-биологических и биохимических подходов, без работы с индивидуальными мРНК, без пробирочных экспериментов, скорее всего не обойтись. Очень желательно сделать протеомику на РНК-белковых комплексах для индивидуальных YB-белок - зависимых мРНК с идентификацией связанных факторов и выяснить, что они там делают и как взаимодействуют друг с другом и нуклеотидной последовательностью НТО. А в конце- концов собрать такие комплексы из очищенных компонентов.

Рецензент прекрасно понимает, что выполнить такие эксперименты очень сложно. Вот почему, по его наблюдениям все меньше и меньше исследователей в мире решаются на такие "подвиги", которые для ученых 20-ого века были обычным делом, может быть

потому что были единственным инструментом исследования межмолекулярных взаимодействий.

Но это, еще раз нужно повторить, относится к пожеланиям. Завершая данный отзыв следует сказать, что Д.Н. Лябин представил к защите замечательную докторскую диссертацию. Это фундаментальный труд, который вносит очень весомый вклад в наши знания о роли РНК-связывающих белков в клеточных механизмах. Нет ни малейших сомнений, что докторская диссертация Д.Н. Лябина полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова для работ подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. – молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертация оформлена согласно приложениям N5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Дмитрий Николаевич Лябин заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, доцент/с.н.с. по специальности биоорганическая химия, главный научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Отдел химии и биохимии нуклеопротеидов, Лаборатория регуляции синтеза белка.

**Шатский Иван Николаевич**

Контактные данные:

e-mail: shatsky@genebee.msu.ru; телефон: +7 985 974 92 88

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.10 - биоорганическая химия

Адрес места работы: МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119234 Ленинские горы д.1, стр. 40.

Подпись И.Н. Шатского удостоверяю: Дата 20 января 2023 года