

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора биологических наук Лябина Дмитрия Николаевича
на тему: «Регуляция синтеза Y-бокс-связывающего белка 1 и его роль в
экспрессии генов»
по специальности 1.5.3.– молекулярная биология

Биосинтез белка осуществляется сложным и замысловатым аппаратом трансляции, в центре которого молекулярная машина, рибосома. Эффективность трансляции каждой мРНК сложным образом регулируется с тем, чтобы белки в клетке синтезировались в строго определенных количествах и в нужное время. Регуляция биосинтеза белка особенно сложна у многоклеточных эукариот, причем аппарат трансляции обеспечивает и тканеспецифичность и зависимость синтеза белка от внешних условий, например, от наличия или отсутствия пищи в данный момент времени. Поскольку на биосинтез белка организм тратит значительную долю имеющихся ресурсов, работа трансляционной машинерии оптимизирована для того, чтобы не допускать «перепроизводства» как отдельных белков, так и всей совокупности белков в клетке. Более того, с связи с постепенным накоплением мутаций и других поломок в течение жизни, аппарат белкового синтеза многоклеточных эукариот должен иметь возможность адаптироваться к нормальному функционированию в условиях отсутствия того или иного белка-регулятора. Подобное свойство приобретается за счет функционального дублирования молекулярных механизмов регуляции и их «избыточности».

Основной механизм регуляции трансляции отдельных мРНК основан на взаимодействии с соответствующими мРНК РНК-связывающих белков. Диссертационная работа Лябина Дмитрия Николаевича «Регуляция синтеза Y-бокс-связывающего белка 1 и его роль в экспрессии генов» посвящена самому тщательному исследованию одного из таких РНК-связывающих белков, называемого YВ-1. Работа имеет необычно сфокусированный и в то же время

всеобъемлющий характер. Сфокусирована она на одном белке, YB-1, а всеобъемлющим является как набор методов, который автор использовал в своем исследовании, так и спектр вопросов, которые автор перед собой ставит в отношении того, что регулирует активность YB-1, и что регулируется при помощи этого белка.

Для понимания обоснованности выводов диссертационной работы стоит кратко остановиться на ее содержании.

В обзоре литературы автор диссертации самым подробным образом описывает имеющиеся в научной литературе данные об РНК-связывающем белке YB-1. В частности, описана структура YB-1 и родственных белков, а также то, что было известно об их функции. Затем описаны сведения о регуляции активности этого белка и, позднее, его количества. Функционирование YB-1 описано в том числе и в контексте многоклеточного организма, а также в свете практического применения знаний о YB-1 в терапевтических целях. Обзор очень подробный и энциклопедичный, насколько понятие энциклопедичности можно применить к определенному белку. Обзор абсолютно адекватен дальнейшему содержанию диссертации и подводит читателя к пониманию целей и задач диссертации. На самом деле из обзора литературы становится понятным, что несмотря на весьма многочисленные и разнообразные исследования, в понимании функционирования и регуляции синтеза и активности YB-1 царит полнейший сумбур и полное отсутствие упорядоченной, четкой модели. Становится понятным и основная цель данного диссертационного исследования – разобраться в том, как функционирует и как регулируется этот важный РНК связывающий белок.

Глава материалы и методы исследования написана чрезвычайно подробно. Это прекрасно, что на основе этой главы последующие поколения научных сотрудников, аспирантов и студентов смогут воспользоваться всеми описанными методиками. Хочется отметить, что полученные выводы получали экспериментальное подтверждение в нескольких

экспериментальных системах, и *in vivo* и *in vitro*. Также необходимо отметить успешное применение методов геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9. Интересными оказались результаты применения такого метода, как совыделение РНК-связывающих белков с биотинилированными мРНК. Этот метод оказался очень информативным.

В главе результаты и обсуждение Дмитрий Николаевич рассказывает о своих открытиях при изучении белка YB-1. Начинается изложение с описания ингибирования трансляции мРНК YB-1 самим белком YB-1, по механизму отрицательной обратной связи. Это ингибирование может быть преодолено с помощью повышения концентрации PABP, что говорит о конкуренции этих белков за участки связывания. Приведена интересная модель взаимозависимости регуляции PABP, YB-1 и количества общего пула транслируемых мРНК. Далее, был описан еще один регулятор трансляции мРНК YB-1, hnRNPQ.

В дальнейших экспериментах описана тканеспецифичность экспрессии гена YB-1 в различных тканях, а также уровень экспрессии в различных клеточных линиях. Интересным наблюдением оказалось то, что синтез YB-1 регулируется в основном, на уровне трансляции. Синтез избытка мРНК YB-1 совершенно необязательно приводил к эффективному синтезу соответствующего белка, из-за того, что мРНК YB-1 часто находилась в составе нетранслируемых мРНК. Результаты исследования биосинтеза YB-1 были получены с использованием нескольких подтверждающих друг друга методов, таких, как наличие мРНК во фракции рибосом и синтез радиоактивно-меченного белка, количество которого оценивалось по радиоавтографу иммунопреципитируемого YB-1. На клеточных моделях была подтверждена идея авторегуляции синтеза YB-1 по механизму отрицательной обратной связи. Также было доказано, что для авторегуляции необходимы нетранслируемые участки мРНК.

В следующем крупном блоке исследования автор изучил то, как фаза роста клеточной культуры влияет на синтез YB-1. Оказалось, что экспрессия

УВ-1 более, чем большинства клеточных генов зависит от пролиферативной активности клеток. Поиск механизмов этой зависимости привел автора к необходимости исследования mTOR киназного каскада в свете его влияния на трансляцию мРНК УВ-1. Оказалось, что действительно mTOR киназый путь активирует трансляцию мРНК УВ-1, причем для этого нужна 5'-НТО этой мРНК. Помимо убедительного и интересного вывода относительно регуляции синтеза УВ-1, результаты, полученные автором, оказываются интересными и для общего понимания механизма работы этого сигнального пути. Точнее, я бы сказал, что они обозначают некоторые противоречия и недостаточность нашего понимания этого процесса. Таким образом, обозначаются новые перспективы в исследовании регуляции трансляции вообще, даже и вне связи с белком УВ-1. В частности, особенный интерес представляют следующие результаты.

-Различные ингибиторы mTOR киназного пути, как и различные условия, подавляющие этот путь приводят к разным проявлениям на уровне трансляции. Например, рапамицин и PP242, будучи ингибиторами mTOR, совершенно различным образом влияют на фосфорилирование Akt и eIF4E. Также, Torin, гипоксия и голодание по сыворотке различным образом сказывается на разных мишенях mTOR киназного каскада. Эти результаты говорят о нелинейности каскада и сложных взаимосвязях внутри данного регуляторного механизма.

-Различные мРНК по-разному чувствительны к понижению уровня связывания факторов инициации трансляции с мРНК. Этот результат удивителен, поскольку речь идет не о специфических РНК-связывающих белках, а о канонических факторах инициации, которые, согласно канону, должны быть необходимыми участниками *любого* события инициации трансляции, если речь не идет об IRES элементах, конечно. Очевидным становится, что есть по крайней мере различные способы регуляции трансляции, действующие на eIF4E и eF4A.

В дальнейшем, автор исследует изоформы YB-1 и его мРНК. Открывается многообразие этих изоформ и снова, автору удается на примере конкретного белка показать, что наше понимание механизма трансляции далеко от полноты. Так, были выявлены многочисленные случаи инициации трансляции на неканонических старт-кодонах, и даже некоторый вклад реинициации в биосинтез YB-1.

Наконец, в заключительной части работы автор обрушивает на YB-1 весь арсенал методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании, как-то RIPseq, PAR-CLIP, RNAseq и Riboseq. Более того, автор сочетает эти методы с топ-уровнем геномного редактирования, получая не только одинарные, но и комбинированные нокауты с помощью системы CRISPR/Cas9, а также проводя генетическую комплементацию этих нокаутов. Что же, эти эксперименты явно продвигают наше понимание функциональной роли YB-1 на новую высоту. Основной «изюминкой» этой группы экспериментов оказывается открытие компенсаторного механизма, запускающего синтез YB-3 при отсутствии белка YB-1. Таким образом, опять была обнаружена нетривиальная схема регуляции трансляции из многих компонентов, а также случай функционального регулируемого дублирования функций, повышающего надежность трансляционного аппарата.

Очевидно, что Дмитрием Николаевичем проделана огромная научная работа. Как и любая другая такого размера и значимости работа, этот труд не лишен недостатков.

Стр. 22, 205. Термин гуанидин ошибочно используется вместо гуанина/гуанозина. Гуанидин это другое соединение, не являющееся основанием нуклеиновых кислот.

Рис. 17А. Количество YB-1 в различных клеточных линиях оценивали с помощью иммуноблоттинга. Однако, тестируемые клеточные линии принадлежат разным видам. Есть ли уверенность, что антитела одинаково эффективно взаимодействуют с YB-1 кролика, мыши, хомяка, мартышки и человека? Также было бы уместно привести контроль нанесения.

Рис. 22 и другие. При иммунопреципитации новосинтезированного радиоактивно-меченного YB-1 хорошо бы использовать какой-либо образец сравнения, например, антитела к другому белку, не регулируемому так же, как YB-1.

Рис. 35 справа, нижняя панель. Отсутствует подпись.

Стр. 183. При определении 5'-концов РНК было бы лучше проводить не секвенирование отдельных клонов, а высокопроизводительное секвенирование ампликонов.

Стр. 188. Обнаружение альтернативного старта трансляции мРНК YB-1 очень интересно. Было бы хорошо узнать, насколько консервативен этот старт трансляции и заменяется ли он у каких-либо видов на канонический старт-кодон.

Рис. 49. Хорошо было бы использовать какой-либо еще отрицательный контроль для того, чтобы выявить неспецифичные остановки ревертазы. Может быть, мРНК без рибосом?

Стр. 198. «методами высокопроизводительного планировалось». Пропущено «секвенирования».

Стр. 203 «наличие сайта специфического связывания YB-1, определенного PARCLIP, не коррелирует с силой взаимодействия YB-1 с мРНК». На мой взгляд, автор слишком строг к своим результатам. На самом деле зависимость есть, хотя и не сильная. Мне кажется, при статистической обработке значимость должна оказаться высокой, ввиду множества точек.

Рис. 58. Были обнаружены, на мой взгляд, очень интересные и специфичные эффекты, связывающие отсутствие YB-1 и количество некоторых регуляторов клеточного цикла, например, CDK6 и p21 (если брать самые яркие отличия). Однако потом, эта тема была, на мой взгляд, несправедливо заброшена. Было бы очень интересно вернуться к этим данным при анализе результатов RNAseq и Riboseq и узнать механизм, по которому YB-1 оказывает столь значимое влияние на синтез вышеупомянутых белков.

Рис. 79. Было обнаружено, что при экспрессии Y-box связывающих белков возрастает экспрессия генов, связанных со сплайсингом. Этот результат подталкивает к тому, чтобы проанализировать влияние Y-box связывающих белков на альтернативный сплайсинг. Это возможно с использованием тех же данных о транскриптоме, необходим только соответствующий анализ.

Указанные замечания ни в малейшей мере не умаляют значимости диссертационного исследования и являются по большей части просто необязательными предложениями по дальнейшему анализу или несущественными замечаниями к оформлению.

Диссертационная работа отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лябин Дмитрий Николаевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, член-корреспондент РАН, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Сергиев Петр Владимирович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-16-71; e-mail: petya@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.10 - Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: +7(903) 669-19-62; e-mail: press@chem.msu.ru