

**ВІДГУК  
ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

на дисертаційну роботу Зайця Ігоря Володимировича  
“Механізм експресії, регуляція активності та функціональне значення в клітині  
нової ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1”  
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю  
03.00.03 - молекулярна біологія.

Сигнальні системи клітини відіграють ключову роль у координованій регуляції функціонування окремо взятої клітини і організму в цілому. Їхня основна функція полягає в передачі позаклітинних стимулів, що індукуються гормонами, факторами росту, цитокінами, поживними речовинами від рецепторів клітинної мембрани до відповідних компартментів клітини (ядро, цитоплазма), що, в свою чергу, призводить до змін експресії відповідних генів як на рівні транскрипції, так і на рівні трансляції мРНК. Передача позаклітинного сигналу опосередковується складним каскадом послідовних фосфорилувань/дефосфорилувань компонентів сигнальних шляхів, що відповідно опосередковуються кіназами/фосфатазами білків і ліпідів.

Ціла низка патологій, включаючи злоякісну трансформацію клітини, серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання, метаболічні розлади та інше, супроводжується порушеннями функціонування сигнальних систем пов'язаних зі змінами експресії чи активності їхніх окремих компонентів. У багатьох випадках компоненти сигнальних систем, що зазнають суттєвих змін у процесі онкогенезу, використовують у сучасній онкології як біомаркери злоякісної трансформації, а також як безпосередні мішені в специфічній хіміо- та імунотерапії онкологічних захворювань.

Таким чином, дослідження сигнальних систем як у нормі, так і при патологічних станах дозволяє виявити нові молекулярні мішені для розробки сучасних підходів в діагностиці та терапії цілої низки патологій. Відповідно,

дослідження пов'язані зі з'ясуванням молекулярних механізмів функціонування сигнальних систем клітини в нормі та патології є надзвичайно актуальними.

PI3K/mTOR S6K/-залежний сигнальний шлях є одним з провідних у координуванні життєдіяльності клітини шляхом регуляції таких процесів як клітинний ріст, проліферація, диференціація, виживання та апоптоз. Представлена до розгляду дисертаційна робота присвячена дослідженню функціонування одного з її ключових компонентів - кінази рибосомного білка S6 - S6K1, що представлена в клітині декількома ізоформами і на сьогодні вважається перспективною мішенню в протипухлинній терапії. Не зважаючи на вже доведені онкогенні властивості S6K1 відомості, щодо таких властивостей для її окремих ізоформ (вже відомих і тим більше нових) повністю відсутні. Отже надзвичайно важливим є з'ясування цих властивостей, адже це дозволить покращити систему діагностики та дасть можливість створення протипухлинних препаратів з більшою специфічністю дії.

Головною метою роботи було визначити механізми експресії, регуляції активності та функціональні особливості в клітині нової і досі не дослідженої ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1 існування якої на момент початку роботи ще не було остаточно доведено

Дисертаційну роботу Зайця І.В. виконано згідно з основною плановою тематикою відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

В процесі виконання роботи автором отримано низку пріоритетних даних серед яких в першу чергу слід відмітити встановлення щонайменше двох механізмів експресії p60-S6K1 ізоформи серед яких трансляція спільної для всіх S6K1 ізоформ мРНК, однак з використанням альтернативних стартів трансляції, або ж трансляція нової сплайсової ізоформи мРНК, що містить додатковий екзон. Таким чином, автором вперше підтверджено, що p60-S6K1 не є продуктом обмеженого протеолізу p70/85 ізоформ S6K1. Дисертантом доведено, що p60-S6K1 ізоформа має кіназну активність, однак механізм регуляції її активності принципово відрізняється від такого, що описаний для



відомих p70/85 ізоформ і не залежить від mTOR оскільки не інгібується рапаміцином. З огляду на те, що інгібітор mTOR рапаміци, що одночасно є інгібітором S6K1 проходить клінічні випробовування як протипухлинний засіб ідентифікування рапаміцин-нечутливої ізоформи S6K1 є надзвичайно важливим в світі розуміння причин існування суттєвих відмінностей в ефективності дії рапаміцину на різні типи пухлин. Отже можливо, що за рівнем експресії p60 ізоформи можна прогнозувати ефективність дії рапаміцину та його лікарських форм.

Дисертантом також показано, що p60-S6K1 виконує в клітині функції відмінні від p70/p85-S6K1 ізоформ, а саме залучена до ініціації епітеліально-мезенхімального переходу, що підтверджено шляхом виявлення змін в експресії маркерних для ЕМП генів. Таким чином, можна припустити, що онкогенні властивості S6K1 в першу чергу пов'язані з активністю p60-S6K1 і що саме p60-S6K1 ізоформа може бути більш ефективною мішенню в розробці протипухлинних засобів і створення систем діагностики.

Роботу побудовано за традиційною для дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук схемою.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 247 найменувань. Дисертацію викладено на 154 сторінках стандартного машинопису, вона містить 26 рисунків, 3 таблиці та 3 додатки.

Вступ містить достатню аргументацію актуальності роботи, постановку мети та відповідних завдань дослідження, обґрунтування наукової новизни дослідження та практичної цінності отриманих результатів, що виносяться на захист. У вступі також зазначено особистий внесок здобувача.

В розділі "Огляд літератури" автором представлено дані літератури щодо особливостей функціонування mTORC1/S6K1-залежного сигнального каскаду з акцентом на існування та особливості регуляції активності відомих ізоформ S6K1, множинність субстратів S6K1 і, відповідно, багатофункціональність

кінази в клітині. Окремі підрозділи огляду літератури присвячено аналізу ролі S6K1 в ініціації та прогресії захворювань людини серед яких онкологічні захворювання та метаболічні розлади.

Матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

При виконанні роботи дисертантом застосовано широкий спектр методів сучасної молекулярної та клітинної біології які представлено у розділі “Матеріали і методи досліджень” серед яких методи роботи з нуклеїновими кислотами – виділення мРНК, синтез кДНК, клонування рекомбінантних ДНК в різні типи векторних систем, ПЛР в реальному часі, методи роботи з культурами клітин, технологія геномного редагування CRISPR/Cas9 та РНК інтерференції, отримання стабільних ліній клітин, імунологічні методи (Вестерн-блот аналіз, імуноцитохімія, імунопреципітація), *in vitro* кіназна реакція та інші. Цей розділ демонструє відмінне володіння автором сучасними методичними підходами.

Експериментальні дані викладено в трьох підрозділах розділу “Результати досліджень”. В першому підрозділі наведено дані щодо існування різних механізмів експресії ізоформи p60-S6K1 у клітині. Для підтвердження гіпотези трансляції ізоформи p60-S6K1 з третього стартового кодону було застосовано систему редагування генома CRISPR/Cas9. Результати показали, що редагування послідовності в клітинах HEK-293 між другим і третім стартами трансляції призводило до вимикання експресії p70/p85-S6K1 ізоформ і збереженню експресії p60-S6K1. Подібним же чином, редагування нуклеотидної послідовності після третього старту трансляції призводило до вимикання експресії всіх трьох ізоформ. Таким чином, було продемонстровано можливість трансляції p60-S6K1 ізоформи з третього альтернативного стартового кодону мРНК S6K1 і, тими самим доведено що p60-S6K1 не є продуктом протеолітичної розщеплення ізоформ p85- і p70-S6K1. Крім того, за допомогою методів ПЛР аналізу і ДНК секвенування було ідентифіковано в



клітинній лінії MCF-7 новий сплайсовий варіант мРНК S6K1, що містить додатковий екзон завдяки якому порушується рамка зчитування для p70/85 ізоформ, однак лишається неушкодженою для p60-S6K1. Надалі з використанням РНК інтерференції та специфічної shRNA, спрямованої на послідовність додаткового екзону транскрипту p60-S6K1 доведено, що цей транскрипт відповідальний за експресію p60-S6K1 на рівні білка, адже його деградація призводила до зменшення вмісту p60-S6K1 в клітинах MCF-7.

В другому підрозділі наведено дані, щодо особливостей фосфорилування p60-S6K1 за ключовими для активності p70/85 ізоформ сайтами і, відповідно регуляції активності ізоформи.

З застосуванням *in vitro* кіназної реакції було встановлено, що ізоформа p60-S6K1 має кіназну активність і здатна фосфорилувати gpS6 *in vitro*. Однак при цьому виявлено, що ізоформа p60-S6K1 в клітинах HEK-293 не підлягає фосфорилуванню за ключовими для кіназної активності PDK1- і mTORC1-регульованим сайтам, на відміну від p70/ p85-S6K1. До того ж було виявлено, що активність p60-S6K1 в HEK-293 є нечутливою до стимуляції мітогенами і дії інгібітора mTOR рапаміцину, що передбачає наявність PI3K/mTORC1-незалежного механізму регуляції активності ізоформи p60-S6K1 в клітинах HEK-293. В клітинах же MCF-7, навпаки, спостерігалось фосфорилування p60-S6K1 за вказаними критичним сайтами, що було співмірним з таким для домінантних ізоформ p70/p85-S6K1. Отримані дані вказують на можливість існування різних механізмів регуляції активності p60-S6K1 в різних типах клітин.

В третьому підрозділі наведено результати щодо функціональних особливостей різних ізоформ p60-S6K1 в клітині. На моделі клітин з диференційною експресією різних ізоформ S6K1 досліджено роль ізоформи p60-S6K1 у функціонуванні клітин лінії HEK-293 у контексті PI3K/mTOR-регульованих клітинних процесів. Для цього було проаналізовано вплив селективної експресії ізоформи p60-S6K1 на процеси клітинної проліферації і міграції, які є mTORC1/S6K1-залежними. Отримано переконливі докази того,



що блокування експресії всіх ізоформ S6K1 в клітинах HEK-293 призводить до зниження рівня проліферації і швидкості міграції. Однак експресія p60-S6K1 в мала компенсаторний ефект адже при цьому практично повністю відновлюється швидкість проліферації клітин.

Надзвичайно вагомим результатом, є те що експресія p60-S6K1 за умови пригніченою експресії ізоформ p70/p85-S6K1 в клітинах MCF-7 призводить до ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу, що було підтверджено за допомогою аналізу рівнів експресії маркерних генів серед яких *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *TWIST1*, *SNAIL1* і *ZEB2*. Дисертантом правомірно висунуто припущення, про негативний вплив ізоформ p70 та p85 на активність p60 ізоформи, що залучена до ЕМП. Для вирішення цього питання знову ж таки застосовано систему CRISPR/Cas9 та створено модельні клітини лінії MCF-7 з виключеною експресією ізоформи p85 та встановлено, що це не призводить до ініціації ЕМП, а отже імовірно функцію негативного регулятора p60 виконує p70 ізоформа.

Таким чином, в роботі представлено цілком переконливі дані, щодо існування двох механізми експресії ізоформи p60-S6K1: шляхом альтернативної трансляції з третього стартового кодону в межах домінантного S6K1 транскрипта, і за допомогою трансляції специфічної для p60-S6K1 сплайсової мРНК. Вперше встановлено, що ізоформа p60-S6K1 має кіназну активність, однак вона має незалежні від PI3K/mTORC1 сигнального каскаду механізми в клітинах HEK-293. Цілком логічно, що за отриманими результатами і функціональна активність p60 ізоформи суттєво відрізняється від p70/85 ізоформ адже роль p60-S6K1 в клітинній фізіології складається як в позитивній регуляції S6K1-залежних процесів проліферації і міграції клітин, так і в здійсненні специфічної функції ініціації епітеліально-мезенхімального переходу за умови пригнічення експресії ізоформи p70-S6K1. Таким чином базуючись на отриманих результатах зроблено обґрунтоване припущення про можливість використання як діагностичного показника для визначення інвазивних типів

раку молочної залози рівень експресії p60 ізоформи та його співвідношення з рівнем експресії p70 ізоформи.

В останньому розділі автором проведено узагальнення та глибокий аналіз отриманих експериментальних даних з урахуванням даних літературних джерел. Запропоновано гіпотетичну модель, щодо функціональної активності ізоформ S6K1 в клітинах епітеліального та мезенхімального походження.

До дисертації є деякі запитання:

1. Чи були отримані клітини HEK-293 з пустим ДНК вектором як негативний контроль за CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування гена S6K1?
2. Чому не було визначено кіназну активність ізоформи p60-S6K1 в клітинах MCF-7 за умов інгібування mTOR сигнального шляху та стимуляції клітин сироваткою, для порівняння з результатами, отриманими для клітин HEK-293?
3. Можливо підвищена швидкість проліферації та міграції отриманих клітин MCF-7, які вибірково експресують ізоформу p60, може бути пояснена епітеліально-мезенхімальним переходом, що відбувся в цих клітинах, а не позитивною регуляцією цих процесів ізоформою p60.
4. Чому вважаєте, що на активність ізоформи p60 здійснює негативний вплив експресія саме p70 ізоформи, адже можливий варіант, за якого негативна регуляція здійснюється експресією обох ізоформ p70 та p85 одночасно?
5. Експресія ізоформ p70 (і, можливо, p85) негативно регулює активність p60 кінази, чи її експресію? Адже, з блотів «дикого» фенотипу клітин HEK293 та p60+/p70-/p85-HEK-293 видно, що експресія ізоформи p60 відрізняється у рази.



6. Чи є фосфорилування субстрату 6X-His-rpS6 в лізатах клітин p60+/p70-/p85-HEK-293 залежним від кінази p60, чи обумовлено компенсаторним впливом інших AGC кіназ, зокрема RSK та S6K2?

7. Фосфорилування за Ser341 (Ser371 для p70-S6K1) ізоформи p60 є аналогічним в клітинах «дикого типу» та клітинах p60+/p70-/p85-HEK-293, тобто, ймовірно, регулюється за аналогічним механізмом. Чи можна зробити такий висновок?

В цілому ж висновки і основні положення дисертаційної роботи Зайця І.В. відповідають меті та поставленим завданням дослідження, повністю базуються на власних результатах досліджень. Результати експериментів статистично оброблені, а їх достовірність не викликає сумніву.

Результати дисертаційної роботи Зайця І.В. у повному об'ємі опубліковані в провідних фахових виданнях рекомендованих для захисту кандидатських дисертацій та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та міжнародних форумах. В цілому по темі дисертації опубліковано 14 наукових робіт, 6 з яких представлені у вигляді статей в профільних виданнях. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Вважаю, що робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам „Порядку присудження наукових ступенів”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року №567, а її автор Заєць Ігор Володимирович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 — молекулярна біологія.

Офіційний опонент:

завідувач лабораторією імунобіології

Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України

доктор біологічних наук, професор



Д.В.Колибо