

## ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Зайця Ігоря Володимировича  
«Механізм експресії, регуляція активності та функціональне значення у  
клітині нової ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1»,  
представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі  
спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія

### **Актуальність проблеми.**

Молекулярно-біологічні дослідження за останні декілька десятиріч призвели до відкриття великої кількості сигнальних каскадів клітин, що залучені до процесів їх життєдіяльності та функціонування як за нормальних умов, так і різних патологічних станів. Протеїнкінази належать до одних із регуляторів сигнальних шляхів, які контролюють ріст, диференціювання, проліферацію, виживаність, апоптоз, рухливість клітин, відповідь на фактори клітинного мікрооточення. Саме тому вони стали мішенями для таргетної терапії, яка направлено діє на опосередковані ними сигнальні каскади. На сьогодні до протеїнкіназ, які розглядають у якості об'єктів впливу інгібіторів при лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, відносять MAP-кінази (MAPK - Erk, JNK, p38 MAPK), Bcr-Abl тирозин кіназу, Polo-подібні кінази, PDGFR- $\beta$ , VEGFR-2 та 3, KIT, FLT-3, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), Src, c-kit, epha2, mTOR. Проте, нерідко ізоформи однієї кінази мають антагоністичні функції і пов'язані з різними сигнальними каскадами. Вочевидь, для комплексного розуміння біології клітини необхідно знати внесок кожної компоненти, а ідентифікація та особливості функціонування певних складових сигнальних ланцюгів, зокрема, залишається важливою задачею. Тому дисертаційна робота Зайця Ігоря Володимировича, спрямована на з'ясування шляхів трансляції, механізмів регуляції кіназної активності та біологічної значимості однієї з ізоформ кінази рибосомного білка S6 - p60-S6K1, є актуальною з позиції фундаментальної молекулярної біології, так і перспективною для подальших досліджень в галузі молекулярної онкології.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих в дисертації. Достовірність результатів та їх новизна.** Дисертаційна робота І.В.Зайця є науковою працею, представленою на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, яка виконана згідно з основною плановою тематикою досліджень Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Робота викладена на 154 сторінках, із дотриманням існуючих вимог, затверджених до оформлення дисертації, і складається із анотацій, вступу, огляду літератури та розділів, у яких представлено матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, висновків, додатків. Список літературних джерел налічує 247 посилань, написаних латиницею. Роботу ілюстровано 26 рисунками та 3 таблицями.

У *вступі* обґрунтована актуальність теми дослідження, чітко сформульована мета та 7 завдань досліджень, викладені наукова новизна і практична значимість отриманих результатів, відомості про особистий внесок здобувача, апробацію та публікацію результатів виконаної дисертаційної роботи, що дає цілісне уявлення про суть і зміст роботи. Слід зазначити, що робота була успішно виконана згідно поставлених завдань, що відображено у висновках роботи.

*Огляд літератури* містить чотири підрозділи. Насамперед дана загальна характеристика структурних особливостей домінантних ізоформ кінази 1 рибосомного білка S6 (S6K1) - p70-S6K1 та p85-S6K1, коротких мінорних ізоформ S6K1 та інформація про ізоформу p60-S6K1, відомості про яку вперше з'явилися у роботі Kim D. et al. (2009).

В наступному підрозділі огляду літератури автор ретельно представив механізми регуляції активності S6K1 з урахуванням різних активаторів. Наведена детальна інформація щодо сайтів фосфорилування в межах кожного структурного домену S6K1, моделі покрокової активації S6K1 шляхом впорядкованого мультисайтового фосфорилування, а також інші механізми посттрансляційної модифікації S6K1.

Враховуючи той факт, що S6K1 є одним із ключових компонентів PI3K/mTOR/S6K1-залежного сигнального шляху, в наступному підрозділі досить розгорнуто представлена структура, особливості регуляції і функції мультисубодиничних комплексів mTORC1 та mTORC2 і обґрунтована їх участь у контролі різних фізіологічних процесів клітини. Логічно виглядає надалі викладення інформації щодо функцій і клітинних субстратів S6K1. Серед загальних функцій S6K1 розглянуті питання контролю низки різних етапів білкового синтезу, транскрипційні і посттранскрипційні механізми біосинтезу ліпідів, які задіяні у процесах проліферації і клітинного росту, а також координації виживання та руху клітин за участі S6K1. Особлива увага приділена mTORC1 сигналінгу у контролі експресії генів, які залучені до оксидативної функції мітохондрій, гліколізу та пентозо-фосфатного шляху.

Огляд літератури завершує підрозділ щодо участі S6K1 в ініціації та прогресії злоякісних новоутворень, розвитку метаболічних розладів, гіпертрофії органів та патологій, пов'язаних зі старінням, контролі маси тіла та енергетичного балансу. Загалом огляд літератури представлено професійно, як аналіз літературних даних, що стосуються теми роботи.

Другий розділ дисертаційної роботи – *«Матеріали і методи дослідження»* відображає великий спектр методичних підходів, які використав дисертант для вирішення завдань дослідження і поставленої мети. Серед них сучасні методи молекулярної біології, біохімії, імунології, клітинної біології, біоінформатичного аналізу та інші. Крім того, в розділі наведено перелік клітинних ліній, хімічних реактивів, поліклональних та моноклональних антитіл, які були використанні в дослідженнях, послідовності праймерів для ПЛР і кількісної ПЛР, послідовності олігонуклеотидів gRNA, які є комплементарними до послідовності цільового гена p85-, p70- та p60-S6K1 ізоформ, та послідовності олігонуклеотидів shRNA, комплементарні інсерції транскрипту p60-S6K1. Переважна більшість досліджень виконана автором, що свідчить про його професіоналізм і досконале володіння описаними методиками.

*Результати експериментальних досліджень* викладені у трьох підрозділах. Основним результатом першого підрозділу є вперше отримані експериментальні підтвердження щонайменше двох механізмів експресії ізоформи p60-S6K1, яка може транслюватися з двох окремих транскриптів: специфічного для p60-S6K1 сплайсового варіанта мРНК та спільного з p70/p85-S6K1 домінантного S6K1 транскрипта за рахунок альтернативної трансляції з використанням третього стартового кодону. Методологія виконання даного розділу досліджень продумана, дуже логічна, проведена із застосуванням сучасних методів клітинної інженерії, зокрема, CRISPR/Cas9 та РНК-інтерференції.

В другому підрозділі автор доводить, що p60-S6K1, подібно p70/p85-S6K1 ізоформам, виявляє кіназну активність. При з'ясуванні шляхів регуляції активності p60-S6K1 основна увага була зосереджена на вивченні стану фосфорилування ключових для кіназної активності сайтів, серед яких PDK- та mTOR-залежні. Встановлено цікаві і важливі факти: по-перше, кіназна активність p60-S6K1 у клітинах p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>HEK-293 регулюється за допомогою механізмів, які є відмінними від таких для p70/p85-S6K1 ізоформ; по-друге, стан фосфорилування p60-S6K1 за першорядними для активності PDK1 та mTORC1 сайтами у клітинах HEK-293 відрізняється від такого у клітинах MCF-7, а саме, на відміну від клітин MCF-7, у клітинах HEK-293 ізоформа p60-S6K1 не підлягає фосфорилуванню за PDK1- та mTORC1-залежними сайтами і не регулюється через PI3K/mTORC1 сигнальний шлях. Отримані дані відкривають перспективу для подальшого комплексного дослідження особливостей фосфорилування p60-S6K1, а також домінантних p70/p85-S6K1 ізоформ як у нормальних так і злоякісно трансформованих клітинах з урахуванням їх гістологічного типу та ступеня злоякісності.

Враховуючи різницю у механізмах регуляції активності p70/p85-S6K1 та p60-S6K1 ізоформ, було висунуто припущення, що ці ізоформи відрізняються і у функціональному значенні. Для з'ясування цього питання було вивчено вплив селективної експресії p60-S6K1 на процеси трансляції,

міграції та проліферації в клітинах HEK-293 та MCF-7. Як за умов селективної експресії p60-S6K1, так і одночасного блокування експресії p60/p70/p85-S6K1 ізоформ в клітинах HEK-293 не виявлено суттєвих змін в активності фактора трансляції eIF4B, кінази фактора елонгації eEF-2K та рибосомного білка S6 по відношенню до таких в контрольних клітинах HEK-293. Водночас, із використанням зазначених експериментальних клітинних моделей було встановлено факт причетності ізоформи p60-S6K1 до регуляції активності Akt, яка залучена до контролю проліферації та міграції клітин. Підтвердженням цього стало встановлення зниження рівня проліферації та локомоторних властивостей клітин лінії p60<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> HEK-293 порівняно з контрольними клітинами HEK-293 та майже повне відновлення даних показників за умов вибіркової експресії p60-S6K1 в клітинах HEK-293. Клітини ж аденокарциноми молочної залози MCF-7 із редагованим геномом p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> MCF-7 мали підвищену здатність до міграції у порівнянні з вихідними клітинами, що також свідчило про участь p60-S6K1 в даному процесі. Поряд з цим, виявлено цікавий факт, що клітини p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> MCF-7 набували морфологічних ознак, характерних для клітин з мезенхімальним фенотипом. Встановлення цього феномену дозволило зробити припущення, що вибіркова експресія ізоформи p60-S6K1 може приводити до індукції епітеліально-мезенхімального переходу. Доказом даної думки стала констатація характерних змін в рівнях експресії N-кадгерину, E-кадгерину, віментину, цитокератинів 8 та 18, транскрипційних факторів SNAIL1, TWIST1 і ZEB2 в клітинах MCF-7, що селективно експресують p60-S6K1 та набувають ознак мезенхімального фенотипу. Таким чином, вперше наведені результати експериментальних досліджень щодо причетності p60-S6K1 ізоформи до активації програми епітеліально-мезенхімального переходу та пластичності фенотипу пухлинних клітин. Причому з'ясовано, що p60-S6K1 детермінує даний процес лише за умов одночасного інгібування експресії p70/p85-S6K1 ізоформ, а p70-S6K1, імовірно, виконує роль негативного регулятора функцій p60-S6K1.

Отримані результати ще раз підтверджують необхідність подальшого вивчення статусу експресії p60/p70/p85-S6K1 ізоформ в пухлинних клітинах різного гістогенезу з урахуванням ступеня агресивності пухлинного процесу, чутливості до хіміопрепаратів, для з'ясування можливості їх використання в якості прогностичних і предиктивних маркерів.

*Обговорення та узагальнення отриманих результатів* проведено добре, шляхом послідовного аналізу результатів своєї роботи, пояснення щодо виявлених нових фактів з урахуванням сучасних даних літератури, що є підґрунтям для подальших досліджень і практичного застосування отриманих результатів.

*Висновки* повністю відображають отримані результати і відповідають поставленій меті і задачам досліджень.

**Повнота викладу результатів в наукових працях, опублікованих автором.** Результати дисертаційної роботи Зайця І.В. опубліковані в 14 наукових роботах, 6 із яких представлені у вигляді статей, надрукованих у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, що входять до наукометричних баз даних. Основні положення дисертаційної роботи представлені на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

**Теоретичне і практичне значення отриманих результатів.** В дисертаційній роботі вперше розкриті механізми експресії ізоформи p60-S6K1, з'ясованні шляхи регуляції її кіназної активності з урахуванням типу клітин та науково обґрунтовано функціональні особливості досліджуваних ізоформ S6K1. Вивчення диференційної експресії та активності окремих S6K1 ізоформ в пухлинних клітинах може бути перспективним об'єктом трансляційних досліджень в онкології в контексті оцінки прогнозу перебігу захворювання та чутливості до терапевтичного лікування.

До дисертаційної роботи є деякі *зауваження та запитання*, які не зменшують загальну позитивну оцінку роботи.

1. В огляді літератури доречно було б навести схематичне зображення структури кінази 1 рибосомного білка S6 із зазначенням модульних доменів та сайтів фосфорилування, а також зробити узагальнення, яке обґрунтовує доцільність проведення наукових досліджень.

2. Не зовсім коректно в рубриці об'єкт та предмет дослідження писати «в нормі та патології», враховуючи, що робота виконана лише на лініях клітин.

3. В таблиці 2.3. розділу «Матеріали і методи» вказані значення титру розведення антитіл, проте ця інформація не відображає кількість білка, використану в дослідженнях.

4. Оцінку проліферативної активності проводили із використанням МТТ-тесту, проте цей метод, в першу чергу, відображає життєздатність клітин, а не їх проліферативний потенціал, тому доречно паралельно проводити підрахунок клітин після фарбування розчином трипанового синього.

5. У розділі «Матеріали і методи» відсутня інформація щодо ДНК секвенування.

6. Для більш об'єктивної оцінки результатів вестерн блот аналізу варто робити денситометричний аналіз відносної кількості білка, нормалізованого до рівня  $\beta$ -актину (рис.3.7; 3.13; В1).

7. В роботі недостатньо повно викладені результати досліджень щодо міграції та проліферації клітин p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>MCF-7.

8. По тексту зустрічається невдале використання різної термінології: «ампліфікація за раку молочної залози», «інвазивний тип раку молочної залози», «епітеліальні цитокератини».

### **Запитання**

1. Яка ймовірність виникнення off-target ефектів при виборі послідовності gRNA для редагування гена S6K1, які потенційно можуть змінювати активність інших генів в клітинах HEK-293 та MCF-7?

2. Чи використовували ви в якості контролю клітини, трансфіковані лише ДНК вектором pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0?

**Відповідність дисертації встановленим вимогам.** На основі проведеного аналізу дисертаційної роботи і враховуючи актуальність проблеми, вважаю, що за новизною одержаних результатів, їх науково-теоретичному і практичному значенню, за об'ємом проведених досліджень та їх високим методичним рівнем дисертаційна робота Зайця Ігоря Володимировича «Механізм експресії, регуляція активності та функціональне значення у клітині нової ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1», є самостійним закінченим дослідженням, що відповідає вимогам пункту 11 «Положення про порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія.

Старший науковий співробітник  
відділу молекулярної та клітинної  
патобіології Інституту експериментальної  
патології, онкології і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького НАНУ  
кандидат біологічних наук

Л.М.Шлапацька

27.11.2019



Л. М. Шлапацька  
Секретар  
М. Вовк  
М. В. В.