

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Косач Вікторії Романівни «Особливості функціонування mTOR/S6K1 сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини *in vitro*» представленої на здобуття наукового ступеня кандидата наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія.

Актуальність теми дисертації. Злоякісні новоутворення молочної залози є найбільш поширеними серед онкологічних хвороб жіночого населення в Україні. Вагомим підґрунтям для онкогенезу молочної залози є порушення в регуляції та функціонуванні клітинних сигнальних шляхів, а особливо PI3K/mTOR/S6K сигнального каскаду. Дослідження генетичних порушень в аденокарциномах молочної залози виявили ампліфікацію гена *RPS6K1*, що розташований в 17q22-24 хромосомній ділянці. Ампліфікація цього гена призводить до зростання експресії протеїнкінази S6K1, яка є важливою ланкою PI3K/mTOR/S6K сигнального шляху. Наразі залишається актуальним вивчення ролі S6K1 у регуляції поділу та міграції пухлинних клітин з огляду на те, що у клітинах людини експресується низка ізоформ даної кінази. Саме такому питанню присвячена робота Косач В.Р., в якій дисертантка встановила залежність внутрішньоклітинного розподілу кінази S6K1 від щільності та рухливості клітин лінії MCF-7 та вперше показала, що зміна балансу експресії ізоформ S6K1 в бік експресії p60S6K1 призводить до значного підвищення рівня міграції та проліферації клітин.

Загальна характеристика роботи. Дисертація побудована за традиційною схемою і складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 145 найменувань. Дисертацію викладено на 147 сторінках стандартного машинопису, вона містить 44 рисунки, 3 таблиці та 1 додаток.

У розділі 1 «Огляд літератури» наводиться загальна характеристика mTOR/S6K1 сигнального каскаду, описуються його основні ланки та шлях

передачі сигналу до клітини. Більш детально подається структура та функції важливого елемента mTOR/S6K1 сигналінгу, а саме протеїнкінази S6K1. На основі сучасних публікацій описуються ізоформи кінази S6K1, які утворюються внаслідок альтернативних транляції та сплайсингу. Розглядаються наявні на сьогодні відомості про внутрішньоклітинну локалізацію, функції та можлива участь описаних ізоформ в процесі онкогенезу. Вказується, які питання біології ізоформ S6K1 залишаються невивченими. Крім того, в огляді літератури розглядається участь mTOR/S6K1 сигнального каскаду у розвитку злоякісних новоутворень людини. Особлива увага приділяється сучасним відомостям про залучення кінази S6K1 до регуляції процесів поділу і міграції пухлинних клітин.

У розділі 2 «Матеріали і методи» дисертантка наводить вичерпний опис усіх методів застосованих при проведенні дослідження. Косач В.Р. використано молекулярно-біологічні (електрофорез в поліакриламідному гелі, вестерн-блот аналіз, імунопреципітація, трансфекція та отримання стабільних клітинних ліній), цитологічні (імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, аналіз міграції клітин за методом «раневої поверхні», визначення мітотичного індексу), гістологічні (імунопероксидазна реакція) методи досліджень, біоінформатичний аналіз. В роботі застосовано культивування клітин лінії MCF-7 у дво- та тривимірних умовах. Використано стандартний релевантний набір статистичних методів аналізу отриманих результатів.

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» описано залежність ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 від щільності клітин *in vitro*. Так, дисертантка показала, що при низькому рівні конфлюентності клітин лінії MCF-7 досліджувана кіназа знаходиться у ядрі, тоді як при високій щільності клітин, яка відповідає конфлюентному моношару, S6K1 транслокується до цитоплазми клітин. Імуногістологічний аналіз зразків інвазивної аденокарциноми молочної залози людини виявив переважно ядерну локалізацію S6K1 у клітинах раку у порівнянні з умовно нормальною тканиною молочної залози, в якій спостерігалась цитоплазматичне розташування S6K1. На основі отриманих результатів дисертантка зробила припущення, що зміна

внутрішньоклітинної локалізації відбувається також при міграції пухлинних клітин. За допомогою методу міграції клітин із сфероїдів на адгезивний пластик за умов *in vitro* Косач В.Р. дійсно встановила, що клітини, які мігрували із сфероїдів, дійсно мають ядерне забарвлення проти досліджуваної кінази, подібно до гістологічних зразків інвазивної аденокарциноми молочної залози.

Далі авторка проаналізувала зв'язок кінази S6K1 та транскрипційних факторів, які залучені до регуляції міграції клітин. Таким чином, вперше було встановлено існування білково-білкового комплексу між досліджуваною кіназою та транскрипційним фактором TBR2. За допомогою подвійного імуофлуоресцентного аналізу була виявлена співлокалізація даних білків, тоді як імуопреципітація за допомогою моноклональних антитіл проти S6K1 підтвердила наявність білково-білкового комплексу у клітинах лінії MCF-7.

Косач В.Р. також проаналізувала залучення mTOR/S6K1 сигнального шляху до регуляції поділу клітин лінії MCF-7 та вперше встановила, що вміст кінази S6K1 зростає під час мітозу, а фосфорильована форма кінази mTOR, а саме фосфо-mTOR S2481, співлокалізується із конденсованими хромосомами під час метафази мітозу. З чого авторка робить закономірний висновок, що протеїнкінази S6K1 та фосфо-mTOR S2481 виконують важливу неканонічну роль у регуляції мітозу пухлинних клітин.

Крім того, у розділі 3 описано отримання за допомогою CRISPR/cas9 технології редагування геному клітинних ліній MCF-7 із різним рівнем експресії ізоформ S6K1, а саме MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Здобувачка проаналізувала морфологію, рівень проліферації та міграції отриманих клітинних ліній. Косач В.Р. вперше виявила, що MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризуються значно вищим рівнем проліферації та міграції порівняно з клітинами дикого типу та з MCF-7 p85-/p70-/p60-. Більш того, MCF-7 p85-/p70-/p60+ мали фібробластоподібну морфологію у порівнянні з епітеліальними клітинами дикого типу. Отримані результати спонукали авторку проаналізувати в отриманих клітинних лініях рівень активності Акт сигнального шляху, який залучений до регуляції міграції клітин. Косач В.Р.

встановлено, що зміна балансу в експресії ізоформ S6K1 на користь p60S6K1 призводить до значних змін Akt-залежного сигналювання, що може частково пояснювати виявлені особливості клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+. Більш того, отримані результати вказують на важливе значення співвідношення різних ізоформ S6K1 та вмісту p60S6K1 ізоформи у проявах пухлинної прогресії, таких як підвищення рівня проліферації та міграції клітин.

У розділі 4 «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» авторка аналізує власні дані та порівнює їх із опублікованими результатами інших дослідників. На основі отриманих даних дисертантка пропонує гіпотетичну модель взаємозв'язку внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 та процесів рухливості і міграції пухлинних клітин.

Висновки, які робить здобувачка відповідають поставленим задачам та ґрунтуються на отриманих результатах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тем №2.2.4.10 – «Особливості функціонування mTOR-залежних сигнальних шляхів: множинність ізоформ mTOR та регуляція метаболічних процесів в клітині» (номер державної реєстрації – 0110U000692, 2011-2015 рр.) та №2.2.4.10 – «Особливості структурнофункціональної організації mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (номер державної реєстрації – 0115U003745, 2016-2020 рр.).

Наукова новизна одержаних результатів. У ході роботи вперше встановлена залежність ядерно-цитоплазматичного розподілу протеїнкінази S6K1 від щільності клітин лінії MCF-7. Показано, що S6K1 переміщується із цитоплазми до ядра клітин у ході міграції та розпластування тривимірного сфероїда у моношарову колонію клітин на моделі *in vitro*. Вперше виявлено, що це може бути пов'язано із білок-білковою взаємодією S6K1 із транскрипційним

фактором TBR2 у клітинах раку молочної залози лінії MCF-7. Крім того, детектована міжхромосомна локалізація фосфорильованої за серином 2481 кінази mTOR та підвищення вмісту S6K1 у ході мітозу пухлинних клітин. Отримано клітинні лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+, які є зручною моделлю для дослідження функцій різних ізоформ S6K1 у клітинах раку молочної залози людини. Вперше проаналізовано селективний вплив ізоформ кінази S6K1 на прояв пухлинного фенотипу клітин лінії MCF-7.

Теоретичне значення одержаних результатів. Дисертанткою отримано результати досліджень, які значно розширюють уявлення про особливості внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 у клітинах раку молочної залози людини, а також вказують на важливе значення співвідношення різних ізоформ S6K1 та вмісту p60S6K1 ізоформи у процесі онкогенезу.

Практичне значення одержаних результатів. Представлені дослідження поглиблюють розуміння ролі mTOR/S6K сигнального каскаду у туморогенезі з точки зору таргетної протипухлинної терапії. А саме, отримані результати дають підставу розглядати S6K1 як регулятор міграції клітин карциноми молочної залози. Більш того, представлені дані спонукають до подальшого дослідження p60S6K1 як перспективної мішені для пригнічення пухлинного росту раку молочної залози. У ході роботи було оптимізовано та адаптовано до кількісного аналізу моделі міграції пухлинних клітин *in vitro*, що може бути застосовано як для дослідження базових механізмів канцерогенезу, так і для розробки протипухлинних препаратів. Отримані результати були використані на лекційних і практичних заняттях із студентами.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації. Для вирішення поставлених завдань автор використовує адекватний набір методів (молекулярно-біологічні, гістологічні, цитологічні, біоінформатичний аналіз). В залежності від даних отриманих у експерименті авторка використовує релевантний статистичний метод для їхнього аналізу. Усі висновки обґрунтовані та зроблені виключно на основі отриманих експериментальних даних.

Суттєвих зауважень до дисертаційної роботи Косач В.Р. не виникло. Отже, в порядку дискусії маю до дисертанта наступні запитання:

1. Як на Вашу думку, або за даними літературних джерел, чи не залучена цитоплазматична кіназа S6K1 у формування міжклітинних контактів?
2. Яку біологічну функцію, на Вашу думку, може мати секреція кінази S6K1 ізоформи p85 за межі клітини?
3. Що означає термін «ендогенна кіназа», який використовується в роботі?
4. В чому полягає логіка використання трьох видів антитіл до різних ділянок кінази mTOR для локалізації цієї кінази в клітині?
5. Клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризувалися ядерною локалізацією кінази S6K1 ізоформи p60, хоча сигнал для ядерної локалізації характерний для іншої ізоформи, а саме ізоформи p85. Чим це можна пояснити?
6. Як проводили аналіз співлокалізації флуоресценції на двох хвилях в конфокальній мікроскопії за Мандерсом і Пірсеном?

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 11 тез доповідей. Автореферат адекватно і повною мірою передає зміст дисертаційної роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертаційна робота Косач Вікторії Романівни за темою «Особливості функціонування mTOR/S6K1 сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини *in vitro*» є цілісною закінченою науковою працею.

Робота відповідає вимогам п.11 постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого

звання старшого наукового співробітника», паспорту спеціальності 03.00.03 - молекулярна біологія, а її авторка, Косач Вікторія Романівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеню кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.03 - молекулярна біологія.

Завідувач лабораторією імунобіології

Інституту біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,

доктор біологічних наук, професор

Д.В.Колибо

Підпис *Д. В. Колибо*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"14" 05 2019 р.

