

ВІДГУК

офіційного опонента – доктора біологічних наук, завідувача відділу сигнальних
механізмів клітини

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Дробот Людмили Борисівни

на дисертаційну роботу Мазова Андрія Валерійовича

«Особливості функціональних зв'язків між ізоформами естрогенового
рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 (S6K1) в клітинах
карциноми грудної залози людини MCF-7», подану на здобуття ступеня
доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Актуальність обраної теми дисертації.

Дослідження взаємозв'язку між естрогеновим рецептором (ESR1) та ізоформами кінази рибосомного білка S6 (p60/70/85S6K1) у клітинах пухлин грудної залози є одним із найперспективніших напрямів сучасної трансляційної онкології.

Близько 70% усіх випадків раку грудної залози (РГЗ) є естроген-рецептор-позитивними. Однак, попри ефективність стандартної ендокринної терапії (інгібітори ароматази, тамоксифен, фулвестрант), у значної частини пацієнтів розвивається набута резистентність. Провідними механізмами цієї резистентності є як мутації в гені *ESR1*, так і гіперактивація альтернативних кіназних шляхів, в першу чергу з якими пов'язана активність S6K1, що існує в різних ізоформах, які мають структурні відмінності.

Перехресне взаємне регулювання (crosstalk) між ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 реалізується через декілька ключових вузлів. Одним із них є ліганд-незалежна активація ESR1 шляхом фосфорилювання за залишком Ser167 у трансактиваційному домені AF1. Це призводить до конформаційних змін рецептора та його активацію навіть за відсутності естрогену, що робить пухлинні клітини нечутливими до інгібіторів ароматази.

З іншого боку, поряд із класичним білком ERα66 (66 кДа), у разі модифікацій *ESR1* або зміни його копійності, експресуються короткі ізоформи (наприклад, ERα46). Вони локалізуються переважно в плазматичній мембрані та взаємодіють із кіназними каскадами, включно з PI3K/Akt/mTOR/S6K1, викликаючи їхню активацію та швидкі негеномні відповіді, що є тригером стимулювання метастазування.

Таким чином, вивчення механізмів ESR1–S6K1 перехресного сигналювання відкриває нові можливості для персоніфікованої діагностики та терапії в сучасній онкології. Дослідження мережі «ESR - ізоформи S6K1» дозволяє перейти від фундаментального опису сигнальних шляхів до практичного впровадження отриманих даних в онкогінекологію та мамологію. Це дозволяє перетворити фактор резистентності (ліганд-незалежну активацію естрогенових рецепторів) на нову терапевтичну мішень і суттєво підвищити тривалість та якість життя пацієнтів із метастатичним раком грудної залози.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Андрія Мазова виконувалася в рамках науково-дослідних тем відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, зокрема:

- «Особливості структурно-функціональної організації mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (2015–2020 рр., № держреєстрації 0110U000692);
- «Особливості функціональної активності ізоформ кінази рибосомного білка S6 (S6K1) та молекулярних механізмів її регуляції в нормі та патології» (2021–2025 рр., № держреєстрації 0121U109973).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є, на мій погляд, вельми високим. Результати дисертаційного дослідження Мазова А. В. є достовірними та об'єктивними.

Вступ до дисертації написано послідовно та лаконічно. В ньому автор розкрив суть проблеми, обґрунтував актуальність теми, окреслив мету і завдання дослідження, висвітлив наукову новизну та власний внесок, а також сформулював об'єкт, предмет і методи дослідження, вказав публікації та апробацію результатів дисертаційного дослідження.

Грунтовний аналіз сучасних даних літератури, представлений у першому розділі рукопису, включає огляд сучасної концепції розподілу пухлин грудної залози за молекулярними субтипами та особливостей протипухлинної терапії залежно від молекулярного субтипу пухлини. Особливу увагу приділено питанням резистентності пухлин грудної залози до антиестрогенової терапії, спрямованої на пригнічення активності естрогенового рецептора. Висвітлено сучасні уявлення щодо можливих молекулярних механізмів розвитку резистентності, одним з яких є ліганд-незалежна активація рецептора завдяки S6K1-залежному фосфорилуванню. Логічно, що один із підрозділів присвячено функціональній активності кінази рибосомного білка S6 та механізмам її регулювання, зокрема експресії різних ізоформ, що відрізняються структурою регуляторних доменів. Представлена в цьому розділі інформація переконує в необхідності поглибленого дослідження взаємозв'язку ESR1 та S6K1 для ідентифікації нових мішеней впливу на пухлини грудної залози, зокрема з набутою резистентністю до антиестрогенової терапії.

Другий розділ дисертаційної роботи містить опис методів дослідження, що охоплює:

- класичні методи клітинної біології (культивування клітин *in vitro*, аналіз рівнів їхньої проліферативної та локомоторної активності);
- класичні методи молекулярної біології (клонування ДНК, спрямований мутагенез, експресія та очищення рекомбінантних білків);
- імунологічні методи (імунізація тварин, отримання та характеристика поліклональних антитіл методами Вестерн-блот аналізу та імунопреципітації).

Володіння зазначеними методами дозволило успішно застосувати методологію геномного редагування CRISPR/Cas9 та отримати модельні лінії

клітин карциноми грудної залози MCF-7 з диференційною експресією ізоформ ESR1.

Результати власних експериментальних досліджень логічно пов'язані з метою та завданнями дисертаційної роботи й представлені в шести підрозділах.

- У підрозділі 3.1 наведено дані аналізу можливості формування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1. Задля цього було отримано та охарактеризовано поліклональні антитіла до ESR1 людини. Як антиген використовували рекомбінантні пептиди, що відповідали N-кінцевій ділянці ESR1 та повнорозмірній формі естрогенового рецептора ESR1, експресовані в клітинах *Escherichia coli* та очищені афінною хроматографією. Комплексу між ESR1 та S6K1 в імунопреципітатах лізатів клітин анти-ESR1 антитілами виявлено не було. Зроблено логічний висновок, що це не є доказом його відсутності, проте потребує подальших досліджень.
- У підрозділі 3.2 представлено дані щодо створення та характеристики клітинних моделей MCF-7 із диференційною експресією ESR1 за допомогою CRISPR/Cas9-системи редагування геному.
- У підрозділі 3.3 описано результати досліджень на моделі створених субліній по з'ясуванню впливу змін в експресії гена *ESR1* на S6K1-залежне сигналювання у клітинах MCF-7. Встановлено, що пригнічення експресії ESR1 призводить як до пригнічення експресії S6K1, так і до загального пригнічення S6K1-залежного сигналювання. Отримані дані є ще одним підтвердженням регуляторної ролі ESR1 у транскрипції гена S6K1 (*RPS6KB1*). Важливо, що ці вагомні результати було підтверджено альтернативним шляхом за допомогою ПЛР у реальному часі.
- Підрозділ 3.4 включає результати досліджень по з'ясуванню взаємного впливу S6K1-залежного фосфорилювання ESR1 за ключовим для його активності сайтом (Ser167) на S6K1-залежне сигналювання у клітинах MCF-7. Результати вказують на відсутність такого впливу з боку повнорозмірної форми p66 ESR1 (оскільки лише вона має зазначений сайт фосфорилювання).

- У підрозділі 3.5 представлено інформацію по з'ясуванню ролі різних ізоформ S6K1, які мають ідентичні кіназні домени і відрізняються лише довжиною С-кінцевої регуляторної ділянки, у регулюванні функціонального стану ESR1. З цією метою було визначено рівні фосфорилювання ключових сайтів (Ser118 та Ser167) за умов експресії різних ізоформ S6K1. Отримані результати засвідчили існування особливостей субстратної специфічності ізоформ S6K1, оскільки вони по-різному впливали на фосфорилювання зазначених сайтів, що гіпотетично може по-різному впливати на активність ESR1. Саме цей висновок є надзвичайно важливим для концепції таргетної протипухлинної терапії, яка в ідеалі має бути спрямована лише на онкогенні ізоформи, оскільки одночасне пригнічення форм з онкосупресорними властивостями може мати негативний ефект.
- Підрозділ 3.6 включає результати досліджень, присвячені аналізу експресії мРНК-ізоформ S6K1 (p85/70S6K1 та p60S6K1) у пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів, які в першу чергу відрізняються за експресією ESR1. Отримано надзвичайно цікаві дані, згідно з якими ізоформа p60S6K1 гіпотетично може мати онкосупресорні функції, оскільки рівень її експресії знижується в найбільш агресивному, потрійно-негативному типі пухлин грудної залози.

Обґрунтованість наукових положень, висновків та рекомендацій дисертаційної роботи підтверджено їх обговоренням на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Дисертація Мазова А. В. є закінченою кваліфікаційною роботою, в рамках якої отримано нові та доповнено існуючі наукові результати, що мають високу теоретичну і практичну цінність. Висновки дисертаційної роботи відповідають її змісту та поставленій меті, ґрунтуються на значному фактичному матеріалі, комплексному статистичному аналізі отриманих даних і не викликають сумнівів.

Достовірність і новизна основних наукових положень, висновків та рекомендацій

Усі експериментальні результати, наукові положення і висновки дисертаційної роботи Мазова А. В. побудовані на матеріалах власних досліджень із використанням сучасних і класичних методів і є цілком достовірними.

На основі одержаного експериментального матеріалу логічно сформульовано основні положення та висновки, наукова новизна яких полягає в наступному:

1. Вперше досліджено роль окремих ізоформ S6K1 у регулюванні активності ESR1 шляхом фосфорилювання залишків Ser167 та Ser118, встановлено сайт-специфічний характер цього процесу за участі S6K1, що вказує на відмінності в їхніх регуляторних властивостях щодо ESR1.
2. Завдяки створенню мутантних субліній клітин MCF-7 з мімікрією сайту фосфорилювання (заміна Ser167 на аспарагінову кислоту) та блокуванням цього сайту (заміна Ser167 на аланін) вперше встановлено, що фосфорилювання Ser167 не відіграє регуляторної ролі в активації S6K1.
3. Вперше з'ясовано особливості експресії ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів: виявлено підвищення експресії ключових p70- та p85-ізоформ S6K1 у пухлинах люмінальних А- та Б-типів, тоді як у пухлинах потрійно-негативного типу виявлено їхнє пригнічення.
4. Вперше в пухлинах раку грудної залози всіх молекулярних субтипів виявлено пригнічення експресії p60S6K1 на рівні мРНК порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.
5. Вперше досліджено корелятивну залежність експресії ESR1 та ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів, виявлено спільну динаміку змін їхньої експресії в усіх досліджених типах пухлин.

Загальна оцінка роботи

Дисертаційна робота Мазова Андрія Валерійовича має важливе наукове та практичне значення. Насамперед отримано переконливі дані щодо існування взаємозв'язку між функціональною активністю ESR1 та ізоформами кінази

рибосомного білка S6K1. Робота виконана на високому методичному рівні з використанням сучасних підходів молекулярної та клітинної біології. З огляду на те, що як ESR1, так і S6K1 залучені до патогенезу пухлин грудної залози, визначення нових регуляторних зв'язків відкриває перспективи для розробки ефективних стратегій протипухлинної терапії.

Зауваження, побажання та запитання

Слід зазначити, що дисертація написана грамотно з наукової точки зору, однак не позбавлена низки орфографічних та стилістичних огріхів. Оцінюючи дисертаційну роботу загалом позитивно, хотілося б висловити деякі побажання, зауваження та отримати відповіді на такі запитання:

1. Наприкінці дисертаційної роботи бажано було б навести короткий узагальнювальний розділ (загальне обговорення), де можна було б сфокусувати увагу на вирішених завданнях і окреслити перспективи подальших досліджень.
2. У тексті роботи розмірність концентрацій зустрічається різними мовами (μM , mM , mM). Доцільно уніфікувати позначення й у всіх випадках наводити їх українською мовою (mM).
3. З огляду на те, що блокування експресії основної форми естрогенового рецептора p66/ESR1 шляхом CRISPR/Cas9-індукованого редагування гена негативно впливає на S6K1-залежне сигналювання через пригнічення експресії кінази, важливо було б проаналізувати, чи мають аналогічний вплив інші ізоформи ESR1 (наприклад, p36, p46)?
4. Чим можна пояснити підвищення рівнів мРНК *ESR1*, що відбувається внаслідок редагування гена *ESR1*, і чому при цьому зростає вміст саме p46-ізоформи на рівні протеїну?
5. Чи є у планах автора отримання сублінії MCF-7, у якій буде одночасно пригнічено експресію як p66, так і p46 ізоформи ESR1?

Вищенаведені запитання та зауваження мають переважно дискусійний характер і жодною мірою не знижують високу наукову цінність дисертації, а також обґрунтованість сформульованих автором положень і висновків.

Висновок про відповідність дисертації вимогам Порядку присудження ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота Мазова Андрія Валерійовича «Особливості функціональних зв'язків між ізоформами естрогенового рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 (S6K1) в клітинах карциноми грудної залози людини MCF-7», яка виконана в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, є самостійним, завершеним науковим дослідженням у галузі знань 09 «Біологія» (спеціальність 091 «Біологія»). У роботі отримано нові обґрунтовані експериментальні дані, що мають суттєве значення для розуміння взаємних регуляторних зв'язків між ізоформами кінази S6K1 та ізоформами естрогенового рецептора ESR1, що створює підґрунтя для розробки нових протипухлинних терапевтичних стратегій.

Оформлення дисертації відповідає чинним нормативним вимогам. Результати досліджень Мазова А. В. мають як теоретичну, так і практичну цінність. Висловлені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

За актуальністю теми, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням, обсягом виконаного експериментального матеріалу, особистим внеском здобувача та обґрунтованістю висновків дисертаційна робота повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а її автор **Мазов Андрій Валерійович** заслуговує на присудження наукового ступеня **доктора філософії** з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Завідувач відділу сигнальних механізмів клітини

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна

НАН України, доктор біол. наук, професор

Людмила Дробот