

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу функціональної геноміки та прогресії раку Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України,

**ШЛАПАЦЬКОЇ ЛАРИСИ МИКОЛАЇВНИ**

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»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності

091 «Біологія»

**Актуальність теми дисертації.** Дослідження ролі гена ESR1 (який кодує альфа-рецептор естрогену, ER $\alpha$ ) у прогресії раку грудної залози є одним із найактуальніших і найдинамічніших напрямків сучасної клінічної онкології. Актуальність цієї теми зумовлена не лише фундаментальним науковим інтересом, а й безпосереднім впливом на виживання сотень тисяч пацієнтів.

Близько 70–80% усіх випадків раку грудної залози є гормонозалежними (HR+/HER2-). Це означає, що пухлина використовує естроген як головний стимулятор росту. Основою лікування таких пацієнтів є ендокринна терапія — зокрема інгібітори ароматази (ІА), які блокують синтез естрогену в організмі.

Незважаючи на високу ефективність на початкових етапах, у значної частини пацієнтів із часом розвивається резистентність (стійкість) до лікування, що призводить до прогресування хвороби та метастазування. Саме тому з'ясування молекулярних механізмів резистентності є надзвичайно актуальним, оскільки це створює підґрунтя для розробки шляхів її подолання.

Таким чином, 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» присвячена з'ясуванню функціональних зв'язків між ізоформами естрогенового рецептора ESR1 та кінази рибосомного білка S6 (S6K1) в клітинах карциноми грудної залози людини, які можуть бути враховані надалі для розробки нових стратегій лікування злоякісних пухлин грудної залози різних молекулярних субтипів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота охоплює здобутки, отримані Андрієм Мазовим під час участі у багатьох науково-дослідних тематиках відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України: виконувалась в рамках бюджетних тематик: «Особливості структурно-функціональної організація mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (2015-2020, 0110U000692); «Особливості функціональної активності ізоформ кінази рибосомного білка S6 (S6K1) та молекулярних механізмів її регуляції в нормі та патології» (2021-2025, 0121U109973).

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації, та їх достовірність.** Запропоновані в дисертаційній роботі Мазова А.В. наукові положення, висновки і рекомендації є обґрунтованими та достовірними. Вони базуються на аналізі великого об'єму опрацьованого первинного матеріалу літературних джерел та баз даних, логічністю постановки завдань, застосуванні великого обсягу сучасних методів дослідження, урахуванні світового теоретичного і практичного досвіду та використанні системного підходу, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

**Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.** В дисертаційній роботі Мазова Андрія Валерійовича проведено всебічний аналіз функціональних зв'язків між ізоформами ESR1 та S6K1 в клітинах карциноми грудної залози.

Вперше досліджено вплив експресії естрогенового рецептора ESR1 на стан S6K1-залежного сигналювання з використанням створених з використанням системи редагування геному CRISPR/Cas9 субліній клітин карциноми грудної

залози людини MCF-7 з диференційною експресією ESR1. Встановлено, що пригнічення експресії ESR1 негативно впливає на експресію кінази рибосомного білка S6K1 і, як наслідок, на її загальну активність, що, в свою чергу, призводить до пригнічення проліферативної та локомоторної активності клітин MCF-7.

Вперше досліджено роль окремих ізоформ S6K1 в регуляції активності ESR1 шляхом регуляції статусу його фосфорилування за Ser 118 та Ser 167. Встановлено, що експресія p70 та p60 ізоформ S6K1 призводить до суттєвого підвищення рівня фосфорилування за Ser167, натомість експресія ізоформи p85 не впливає на цей показник. Навпаки, для Ser 118 показано, що його фосфорилування підвищується за умови експресії виключно p85-ізоформи S6K1.

З використанням створених мутантних субліній клітин MCF-7 з мімікрією сайту фосфорилування шляхом заміни Ser 167 на аспарагінову кислоту та блокуванням сайту фосфорилування шляхом заміни Ser 167 на аланін встановлено, що фосфорилування Ser 167 не залучене до регулювання активності S6K1.

Вперше визначено особливості експресії ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини. Виявлено пригнічення експресії ключових ізоформ S6K1 в пухлинах тричі негативного молекулярного підтипу поряд із підвищенням в пухлинах люмінального А та люмінального Б підтипів.

Вперше виявлено пригнічення експресії мРНК-ізоформи p60S6K1 в пухлинах раку грудної залози всіх молекулярних підтипів порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.

Вперше досліджено кореляцію експресії ESR1 та ізоформ S6K1 в пухлинах грудної залози людини різних молекулярних підтипів і виявлено спільну динаміку експресії в усіх досліджуваних типах пухлин.

**Практичне значення дисертаційної роботи.** Визначення функціональних зв'язків між ESR1 та S6K1 відкриває нові можливості для пошуку додаткових ланок регуляції активності ESR1 в терапії раку грудної залози. Крім того, це також є надзвичайно важливим для розуміння молекулярних механізмів набутої резистентності до антиестрогенової терапії, що пов'язують з активацією

mTOR/S6K1-сигнального каскаду і безпосередньо з активацією S6K1. То ж це відкриває нові можливості для розробки ефективних механізмів подолання такої резистентності. З'ясування особливостей функціональних зв'язків ESR1 з ізоформами S6K1 у цьому контексті є надзвичайно важливим, адже ефективною мішенню для терапії можуть бути не всі ізоформи. До прикладу, лише для p70 та p60 було показано можливість фосфорилування ESR1 за Ser167. Тож вони є кандидатами для спрямованого таргетування з метою пригнічення активності ESR1.

Низка створених моделей клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ ESR1 може надалі використовуватися для поглибленого аналізу молекулярних механізмів регуляції ESR1 в клітинах карциноми грудної залози людини різних молекулярних субтипів.

#### **Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.**

Основні положення дисертації висвітлено у 6 наукових працях, серед них 3 статті у наукових виданнях, 2 з яких входять до міжнародної наукометричної бази SCOPUS, і 3 тези доповідей у збірках вітчизняних та зарубіжних міжнародних наукових конференцій.

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** У дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне джерело.

**Структура і обсяг дисертації, оцінка її змісту, завершеності та відповідності встановленим вимогам.** Дисертація Мазова Андрія Валерійовича оформлена відповідно до вимог наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Повний обсяг роботи викладений на 129 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, розділів результатів власних досліджень і їх обговорення та висновків. Список цитованої літератури включає 84 посилання, більшість яких датована останніми 5 роками. Робота містить також 31 рисунок та 4 таблиці.

В розділі **Огляд літератури** Андрій Валерійович висвітлює сучасний стан проблеми, детально охарактеризував роль естрогенового рецептора в патогенезі пухлин грудної залози та інших генів, експресія яких враховується для розподілу пухлин за молекулярними підтипами. Розглянута доменна організація ESR1, головні ізоформи ESR1, які відрізняються наявністю різних регуляторних доменів. Особливу увагу приділено кізаті рибосомного білка S6 та її ізоформам, функціональній активності та ролі в патогенезі пухлин грудної залози. При цьому автором детально проаналізовано велику кількість закордонних публікацій, які мають безпосереднє відношення до теми дисертації. Даний розділ доречно структурований і проілюстрований, містить сучасні дані світової літератури.

Розділ **«Матеріали та методи дослідження»** побудовано за традиційною схемою і складається із переліку використаного обладнання, реактивів і матеріалів. Методичні прийоми та підходи детально описані; надано послідовності праймерів для проведення ПЛР; детально описано різнопланові методи виділення нуклеїнових кислот; ПЛР-аналізу в реальному часі; Вестерн-блот аналізу; CRISPR/Cas9 системі редагування геному, клонуванню ДНК, експресії рекомбінантних білків в бактеріях, афінній очистці рекомбінантних білків, отриманню поліклональних антитіл, імунологічних методів, серед яких імунопреципітація та вестерн блот аналіз, культивуванню клітин ссавців, визначення проліферативних та локомоторних особливостей клітин. **Зауваження** до цього розділу стосується відсутності інформації щодо використаного клінічного матеріалу — тканини пухлин раку молочної залози.

Розділ **результатів експериментальних досліджень та їх обговорення** представлено 6 підрозділами, в яких детально описано послідовність запланованих досліджень. Детально описано клонування рекомбінантних форм ESR1, а саме N-кінцевого пептиду та повнорозмірної форми рецептора, їхню експресію в клітинах бактерій, афінну очистку та подальше отримання й характеристику поліклональних антитіл. Під час аналізу представлених даних виникли **деякі питання та зауваження**, а саме:

1. Чим пояснити, що препарат рекомбінантної форми ESR1 після афінної очистки представлений протеїном близько 40 kDa, тоді як молекулярна маса ESR1 становить 66 kDa?

2. Чим можна пояснити, що поліклональні антитіла, отримані проти повнорозмірної форми рецептора, розпізнають його ендогенну форму лише в умовах імунопреципітації, але не у вестерн блот аналізі?

3. У підписах до рис.3.3, 3.4 є деякі неточності, які можна нівелювати за рахунок детального опису електрофореграм по тексту.

Надалі представлено дуже цікаві і вагомні результати, щодо отримання стабільних ліній клітин зі зміненим рівнем експресії ESR1. Для цього було застосовано дуже потужний і популярний в сучасній молекулярній біології інструмент — CRISPR/Cas9 систему редагування геному. Дуже добре, що дисертанту вдалося вплинути на експресію ESR1 і отримати сублінії клітин з пригніченим рівнем експресії повнорозмірної 66kDa форми ESR1. Однак чим пояснюється те, що пригнічення інших ізоформ ESR1 не відбулося? Навіть навпаки, виявлено підвищення експресії p46-ізоформи на рівні протеїну, а на рівні мРНК виявлено підвищення експресії загального рівня мРНК ESR1.

Таким чином, отримання унікальної моделі клітин карциноми грудної залози людини MCF-7 стало одним із вирішальних факторів для визначення впливу ESR1 на активність кінази S6K1. Отримано переконливі свідчення ролі ESR1 в регуляції експресії S6K1. За припущенням авторів, це відбувається на рівні регуляції транскрипції, де, як відомо, ESR1 виконує функцію транскрипційного фактора і, таким чином, відбувається вплив і на функціональні показники клітин, серед яких їхня локомоторна активність, до якої, як відомо, залучена S6K1.

Надалі представлено дуже цікаві дані щодо зворотного впливу S6K1 на активність ESR1. Акцент зроблено саме на ролі різних ізоформ. Для цього було застосовано створені у відділі раніше сублінії MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1, серед яких p60, p70, p85. Отримано переконливі свідчення того, що різні форми мають різний вплив на фосфорилювання відомого раніше S6K1-залежного сайту, яким є Ser167. Отже, авторами підтверджено попередньо

висунуте припущення про різну роль ізоформ S6K1 в регуляції ESR1.

Надзвичайно важливі результати викладено в останньому підрозділі. Вперше ПЛР-аналізом зразків пухлин карциноми грудної залози одночасно досліджено особливості експресії різних ізоформ S6K1 і ESR1 і проведено кореляційний аналіз. Вперше виявлено суттєві відмінності в експресії між ізоформами в пухлинах різних молекулярних субтипів. Ці дані мають важливе значення для покращення системи діагностики пухлин грудної залози. Водночас під час детального ознайомлення з матеріалами даного розділу виникли деякі неprinципові *зауваження та побажання*, які жодним чином не знижують загальну високу оцінку дослідження:

1) результати експресії генів (рис. 3.21) доцільно було представити в єдиній шкалі вимірювання;

2) із тексту не є зрозумілим оточуючу тканину пухлин грудної залози якого молекулярного підтипу обрано у якості контролю. Для виконання робіт у подальшому бажано паралельно використовувати зразки пухлини та оточуючої її тканини.

**Висновки**, що ґрунтуються на отриманих експериментальних даних повністю відображають мету та завдання даного дослідження, логічно впливають із проведеного дослідження, сформульовані чітко і ясно, цілком відповідають поставленим завданням та повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Наукові положення, наведені в дисертації Мазова Андрія Валерійовича, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу експериментальних досліджень, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних.

Таким чином, дисертаційна робота Андрія Валерійовича заслуговує на позитивну оцінку, незважаючи на деякі запитання та зауваження, які виникли в процесі рецензування роботи, і, загалом, не знижують наукової цінності роботи.

**Висновок.** 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» є завершеною науковою працею, яка за актуальністю теми, новизною досліджень, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів, а також сучасним методичним рівнем проведених досліджень, свідчить про високі наукові досягнення здобувача. Базуючись на вищесказаному, вважаю, що дисертаційна робота Мазова А.В., подана на здобуття ступеня доктора філософії, 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 (з урахуванням чинних нормативних змін згідно з Постановами КМУ № 341 від 21.03.2022 р. та № 502 від 19.05.2023 р.), а здобувач – Мазов Андрій Валерійович, заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 - «Біологія».

Кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
старший науковий співробітник  
відділу функціональної геноміки  
та прогресії раку  
Інституту експериментальної патології,  
онкології і радіобіології  
ім. Р. Є. Кавецького НАН України

Лариса ШЛАПАЦЬКА