

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

КОСАЧ Вікторія Романівна

УДК 577.218+577.217

**ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ mTOR/S6K1 СИГНАЛЬНОГО
ШЛЯХУ ПІД ЧАС ПОДІЛУ ТА ІНІЦІАЦІЇ МІГРАЦІЇ КЛІТИН
КАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ *IN VITRO***

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Хоруженко Антоніна Іванівна,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України,
старший науковий співробітник відділу сигнальних
систем клітини.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
Островська Галина Віталіївна,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
професор кафедри цитології, гістології та
репродуктивної медицини;

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна
НАН України,
завідувач лабораторією імунобіології.

Захист відбудеться “26” березня 2019 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ.

Автореферат розіслано “___” лютого 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними Національного канцер-реєстру злоякісні новоутворення молочної залози складають найбільшу питому вагу в структурі онкологічної захворюваності жіночого населення в Україні. Однією з основних причин смерті пацієнтів від даного типу раку є здатність клітин утворювати віддалені метастази. Так, показано, що більшість первинних карцином молочної залози не загрожують життю людини, що також пов'язано з відсутністю прямої загрози при маммоектомії. Тоді як метастази клітин раку молочної залози порушують функції таких життєво важливих органів, як мозок, печінка, легені, кістки, часткове видалення та хірургічне втручання у які є прямою загрозою для життя пацієнта (Siegel *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2018). Тому дослідження молекулярних механізмів злоякісної трансформації клітин є необхідним для розуміння процесів метастазування та вдосконалення протиракової терапії.

Накопичення незалежних мутацій, які викликають порушення в регуляції клітинних сигнальних шляхів, є вагомим підґрунтям для онкогенезу (Katzenellenbogen *et al.*, 2018). Важливим сигнальним каскадом, який забезпечує внутрішньоклітинну передачу сигналу в епітелії молочної залози, є PI3K/mTOR/S6K сигнальний шлях. Він відіграє ключову роль у передачі сигналу від інсуліну, тиреотропного гормону, естрогену та низки факторів росту (Hemmings *et al.*, 2012). Зміна активації ланок цього сигнального каскаду була виявлена при виникненні новоутворень молочної залози (Fruman *et al.*, 2017). Так, 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 (Bärlund *et al.*, 2000). Тому з'ясування молекулярних основ таких порушень є запорукою розробки нових терапевтичних препаратів та адекватних підходів в лікуванні хворих.

S6K1 належить до AGC родини серинових/треонінових протеїнкіназ. Було показано, що накопичення S6K1 у ядрах клітин раку молочної залози може бути маркером резистентності до тамоксифену у хворих, тоді як цитоплазматична локалізація корелювала з кращим прогнозом лікування (Bostner *et al.*, 2015). Однак механізми регуляції внутрішньоклітинної локалізації S6K1 залишаються не повністю зрозумілими. Згідно даних літератури у клітинах людини існує низка ізоформ протеїнкінази S6K1, а саме: p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 та p31S6K1 (Tavares *et al.*, 2015; Pavan *et al.*, 2016). Найкраще вивченими є ізоформи p85S6K1 і p70S6K1, тоді як функції двох інших ізоформ наразі до кінця нез'ясовані. Тому важливим завданням є вивчення внеску окремих ізоформ S6K1 у функціонування PI3K/mTOR/S6K сигнального шляху та процес злоякісної трансформації клітин.

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.).

Мета і завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи було вивчення ролі mTOR/S6K1 сигнального каскаду та одного з його ключових компонентів – кінази рибосомного білка S6 (S6K1), у процесах поділу та міграції клітин аденокарциноми молочної залози людини за умов *in vitro*.

Відповідно до мети роботи було поставлено такі завдання:

1. Дослідити ядерно-цитоплазматичний розподіл кінази S6K1 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. Порівняти отримані результати із внутрішньоклітинною локалізацією S6K1 у гістологічних зразках інвазивної аденокарциноми молочної залози людини.
2. З'ясувати особливості ядерно-цитоплазматичного розподілу S6K1 під час поділу та ініціації міграції у клітинах лінії MCF-7 за умов *in vitro*.
3. Проаналізувати можливості взаємодії кінази S6K1 з транскрипційними факторами, які залучені до регуляції міграції клітин.
4. Дослідити особливості внутрішньоклітинної локалізації S6K1 та її регулятора mTOR у клітинах лінії MCF-7 на різних стадіях мітозу.
5. За допомогою CRISPR/cas9 технології редагування геному створити модельні клітинні лінії MCF-7 з різним рівнем експресії ізоформ S6K1.
6. Дослідити вплив диференційної експресії ізоформ S6K1 на поділ, міграцію та морфологію клітин лінії MCF-7.
7. Проаналізувати вплив експресії різних ізоформ S6K1 на стан Akt-залежного сигналювання, ключового в регуляції процесу міграції клітин.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми функціонування mTOR/S6K-залежного сигнального шляху у клітинах раку молочної залози людини.

Предмет дослідження – особливості ядерно-цитоплазматичного розташування протеїнкінази S6K1 у клітинах нормальної тканини і раку молочної залози людини; роль mTOR/S6K1-осередкованого сигналювання у процесах поділу та міграції клітин раку молочної залози.

Методи дослідження – дво- та тривимірне культивування клітин, імунофлуоресцентний та імуногістохімічний аналіз, конфокальна мікроскопія, отримання стабільних клітинних ліній з використанням CRISPR/cas9 конструкцій, електрофорез в поліакриламідному гелі, дослідження міграції клітин за методом раневої поверхні, вестерн-блот аналіз, ко-імунопреципітація, біоінформатичний аналіз та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. У ході роботи вперше встановлена залежність ядерно-цитоплазматичного розподілу протеїнкінази

S6K1 від щільності клітин лінії MCF-7 в моношарі. Показано, що S6K1 переміщується із цитоплазми до ядра клітин у ході міграції та розпластування тривимірного сфероїда у моношарову колонію клітин. 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 фосфо-mTOR S2481 під час мітозу пухлинних клітин. З застосуванням CRISPR/Cas9 технології редагування геному створено модельні 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. Вперше проаналізовано селективний вплив експресії ізоформ кінази S6K1 на прояв пухлинного фенотипу клітин лінії MCF-7 та встановлено, що зміна в співвідношенні між ізоформами в бік збільшення представленості p60 S6K1 призводить до значного підвищення рухливості клітин, як показника інвазивності та метастазування на рівні пухлини.

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 впливу на показники інвазії та метастазування пухлини для пригнічення загального пухлинного росту. 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.

Особистий внесок здобувача. Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Отримання багатоклітинних сфероїдів клітин лінії MCF-7, приготування гістологічних препаратів тканини молочної залози людини, імуногістохімічний та подвійний імунофлуоресцентний аналіз проводили спільно з к.б.н., с.н.с. А.І. Хоруженко та К.А. Шкаріною. Характеристику моноклональних антитіл проти білка Ki-67 виконували у співробітництві з к.б.н., с.н.с. І.О. Тихонковою. Трансфекцію клітин лінії MCF-7 конструкціями CRISPR/cas9 та отримання стабільних клітинних ліній з експресією різних ізоформ кінази S6K1 проводили у співпраці з м.н.с. І.В. Зайцем. Автор дякує к.б.н. В.А. Шаблію за люб'язно надані антитіла проти транскрипційних факторів ERG, CDX2, TBR2. Конфокальну мікроскопію цитологічних препаратів проводили спільно з к.б.н., с.н.с. С.О. Карахімом на базі інституту біохімії ім. О.В. Палладіна. Автор висловлює подяку д.б.н., проф. В.В. Філоненку за допомогу у розробці стратегій досліджень та корисне обговорення отриманих результатів. Слова щирої вдячності автор висловлює безпосередньому керівнику роботи, к.б.н., с.н.с.

А.І. Хоруженко за керівництво, корисні поради і зауваження під час проведення дисертаційної роботи. Отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Результати досліджень було також представлено та обговорено на 11-ти конференціях: 35th FEBS Congress (Gothenburg, Sweden, 26 June – 1 July 2010), 35th Annual Meeting of the European Thyroid Association (Krakow, Poland, 2011), 10th Horizons in Molecular Biology (Göttingen, Germany, 9-12 September, 2013), 14th FEBS Young Scientists' Forum (Paris, France, August 27th-30th 2014), IX Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU dedicated to 160th Anniversary of M. F. Kastschenko (Kyiv, Ukraine, 26-27 May, 2015), X Parnas Conference Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” (Wroclaw, Poland, 10-12 July, 2016), Integrative Biology and Medicine (Kyiv, Ukraine, October 2-7, 2017), XII International Young Scientists' Conference «Biology: from a molecule up to the biosphere» (Kharkiv, Ukraine, November 29th – December 1st, 2017), XVI Міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки» (Київ, Україна, 2018), XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 15-16 травня 2018), XI Parnas Conference – Young scientists forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, Ukraine 3-5 September, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 17 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 11 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі 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 45 рисунків, 3 таблиці та 1 додаток.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

У роботі було використано клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. Клітини культивували згідно з рекомендаціями Американського банку культур клітин та тканин (АТСС).

Післяопераційні зразки тканин раку молочної залози та оточуючої нормальної тканини отримували у Національному інституті раку МОЗ України на основі договору про співробітництво між інститутами. Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу для наукових досліджень.

Дослідження експресії кінази S6K1 на рівні білка. Отримували лізати клітин лінії MCF-7. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд. Зразки піддавали електрофорезу у денатуруючих умовах у 10% поліакриламідному гелі, після чого переносили на PVDF мембрану. Вестерн-блот аналіз проводили за допомогою поліклональних антитіл кроля проти С-термінальної ділянки S6K1. Як вторинні антитіла використовували імуноглобуліни кози, кон'юговані з пероксидазою хрому.

Дослідження білок-білкових взаємодій. Була проведена ко-імунопреципітація за допомогою специфічних моноклональних антитіл разом з суспензією протеїн-A/G-агарози (Santa Cruz Biotechnology, США). Аналіз імунопреципітатів проводили за допомогою вестерн-блот аналізу.

Біоінформатичний аналіз. Для аналізу використовували амінокислотну послідовність транскрипційного фактору TBR2 з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (www.ncbi.nlm.nih.gov). Біоінформатичний аналіз амінокислотної послідовності TBR2 на присутність потенційних сайтів фосфорилування S6K1 було проведено за допомогою програм GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org>) та PSP (www.phosphosite.org).

Отримання сфероїдів клітин лінії MCF-7. Клітини культивували у чашках Петрі, які були попередньо вкриті 1% розчином агарози. На чашки з агарозою рівномірно наносили клітини лінії MCF-7 у концентрації $2 \cdot 10^6$ клітин на чашку діаметром 10 см і культивували протягом 46-96 год. Утворення сфероїдів спостерігали за допомогою світлового інвертованого мікроскопа CETI Versus (Бельгія).

Ініціація міграції клітин лінії MCF-7 із сфероїдів на адгезивну поверхню. Сфероїди клітин лінії MCF-7, які були отримані як описано вище, переносили на покривні скельця у свіже поживне середовище. Сфероїдам давали прикріпитись до скла та культивували протягом 24 год та 72 год для ініціації міграції клітин на скельця.

Вивчення внутрішньоклітинної локалізації білків. Клітини культивували у 24-х лункових платах (TPP, Швейцарія) на стерильних покривних скельцях (Menzel-Gläser, Німеччина). Після цього клітини фіксували 10% формаліном та пермеабілізували мембрану за допомогою розчину Triton X-100. Неспецифічне зв'язування антитіл пригнічували, інкубуючи зразки у розчині 1% бичачого сироваткового альбуміну протягом 1 год за $+37^\circ\text{C}$. Після цього первинні антитіла інкубували протягом ночі за $+4^\circ\text{C}$. На наступний день на зразки наносили вторинні видоспецифічні антитіла, мічені флуоресентною міткою у концентрації, рекомендованій виробником. Ядра клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (Molecular Probes, США). У окремих випадках також візуалізували актиновий цитоскелет за допомогою розчину фалоїдину (Sigma, США), міченого тетраметилродаміном. Зразки заключали у середовище Mowiol 4-88 (Sigma, США) та аналізували за допомогою скануючої лазерної мікроскопії у конфокальному режимі.

Отримання клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Було використано систему редагування геному CRISPR/Cas9 та вектори

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459) V2.0, які несли гідові РНК олігонуклеотиди комплементарні до нуклеотидних послідовностей *RPS6K1* гена. Клітини лінії MCF-7 були трансфіковані отриманими векторами за допомогою реагента jetPEI (Polyplus transfection, США), дотримуючись рекомендацій виробника. Після селекції пуроміцином (4 мкг/мл) окремі клони були використані в роботі.

Імуногістохімічний аналіз. Готували зрізи завтовшки 4,5 мкм, переносили на адгезивні предметні скельця, висушували щонайменше добу на гістологічному столику за 45⁰С. Зрізи депарафінували у ксилолі та проводили по спиртах спадаючої концентрації за стандартною методикою. Для відновлення антигену зразки вміщували у цитратний буфер з рН6 та кип'ятили у мікрохвильовій печі. Давали зрізам охолонути протягом 20 хв. та переносили у дистильовану воду на 5 хв. Після цього проводили непряму імунопероксидазну реакцію. Візуалізацію реакції проводили за допомогою 1 мМ розчину 3,3'-діамінобензидину тетрахлориду, до якого додавали 0,02% H₂O₂.

Аналіз швидкості міграції клітин. Здатність клітин до міграції визначали за допомогою моделі «раневої поверхні». Фотографували 10 полів зору одразу після проведення подряпини та через 24 год культивування клітин. Вимірювання ширини раневої поверхні проводили, як описано у Gotsulyak, 2014.

Дослідження рівня проліферації клітин. Рівень проліферації клітин досліджували, підраховуючи мітотичний індекс. Для цього клітини вносили у 24-х лункову плату у концентрації 30*10³ клітин на лунку. Клітини фіксували 10% формаліном протягом 15 хв при кімнатній температурі на 24 год, 72 год, 5-ий та 7-ий день культивування. Зразки забарвлювали розчином Hoechst 33342. Фотографували 10 випадкових полів зору кожного зразка. На фотографіях рахували клітини на стадії мітозу та загальну кількість клітин.

Статистичний аналіз. Статистична обробка результатів була здійснена за допомогою програм Excel (MS Office 2010) та Origin 8.1 (OriginLab, США) із використанням Т-теста для незалежних вибірок даних, які відповідали нормальному розподілу. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного значення із зображенням стандартного відхилення (\pm SD). За критичний рівень достовірності при перевірці статистичних гіпотез приймали * $p \leq 0,05$ та * $p \leq 0,01$. Кожен експеримент повторювали не менш, ніж 3 рази. Аналіз кореляції між якісними показниками проводили за допомогою тетракоричного показника зв'язку із урахуванням поправки Йейтса. Для цього клітини підраховували у 10 випадково обраних полях зору.

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення ядро-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у тканині молочної залози людини. На першому етапі роботи за допомогою імуногістохімічного аналізу було досліджено внутрішньоклітинну локалізацію кінази S6K1 у зразках інвазивної аденокарциноми та оточуючої тканини молочної залози людини (рис. 1).

Було виявлено переважно цитоплазматичну локалізацію S6K1 у епітеліальних клітинах умовно нормальної тканини. На противагу, препарати

інвазивної аденокарциноми молочної залози характеризувались яскравою позитивною реакцією переважно у ядрах клітин.

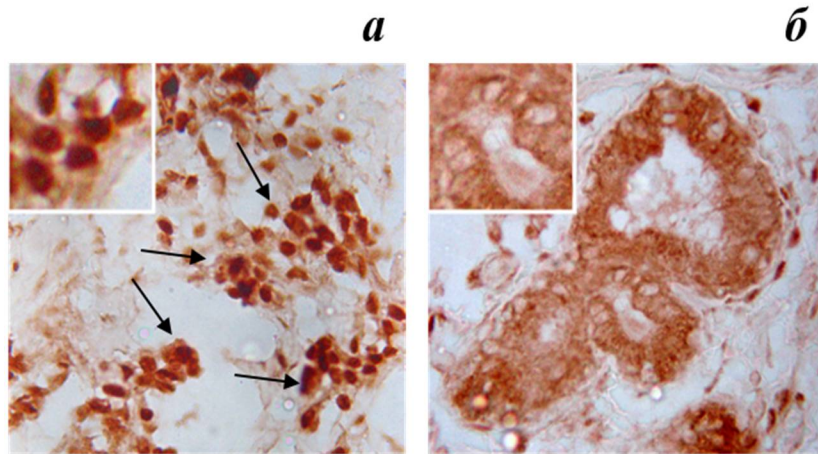


Рис. 1. Імуногістологічний аналіз ядерно-цитоплазматичного розташування кінази S6K1 у тканині молочної залози людини: *а* – гістопрепарат інвазивної аденокарциноми молочної залози. Об. 40х, ок. 10х. Стрілки вказують на реакцію у ядрах клітин. В лівому куті наведено збільшену ділянку препарата; *б* – гістопрепарат оточуючої нормальної тканини молочної залози. Об. 40х, ок. 10х. В лівому куті наведено збільшену ділянку препарата

Аналіз ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у 3D культурі порівняно із 2D культурою клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7. Для більш детального вивчення особливостей внутрішньоклітинної локалізації S6K1 за умов *in vitro* було обрано клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. Клітинам MCF-7 властивий високий рівень експресії компонентів mTOR/S6K сигнального шляху, що робить їх зручною моделлю для вивчення вмісту і локалізації досліджуваної кінази.

За допомогою імунофлуоресцентного забарвлення та наступної лазерної скануючої мікроскопії було виявлено, що клітинам лінії MCF-7 притаманна переважно ядерна локалізація протеїнкінази S6K1 за умов моношарової культури (рис. 2).

Однак, більш детальний аналіз показав, що яскрава ядерна реакція зустрічається у поодиноких клітинах або за низького рівня конфлюентності моношару клітин MCF-7 (рис. 2*а*). Тоді як у ділянках із вищою щільністю клітин спостерігалось зафарбовування однакової інтенсивності як у ядрі, так і в цитоплазмі клітин (рис. 2*б*).

Натомість, при культивуванні MCF-7 за тривимірових умов у вигляді багатоклітинних сфероїдів кіназа S6K1 детектувалась виключно у цитоплазмі клітин (рис. 2*в*). Отримані результати дозволили нам припустити, що ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 може залежати від щільності клітин та рівня конфлюентності моношару.

Вивчення впливу щільності 2D культури клітин на ядерно-цитоплазматичний розподіл кінази S6K1. З метою подальшого дослідження

виявленого нами явища клітини лінії MCF-7 були внесені у 24-х лункову плату за різної щільності, а саме: 10 тис. кл/лунку, 30 тис. кл/лунку, 50 тис. кл/лунку, 70 тис. кл/лунку та 100 тис. кл/лунку. Через 48 год. після пасажування клітини були зафіксовані і досліджені на предмет внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1.

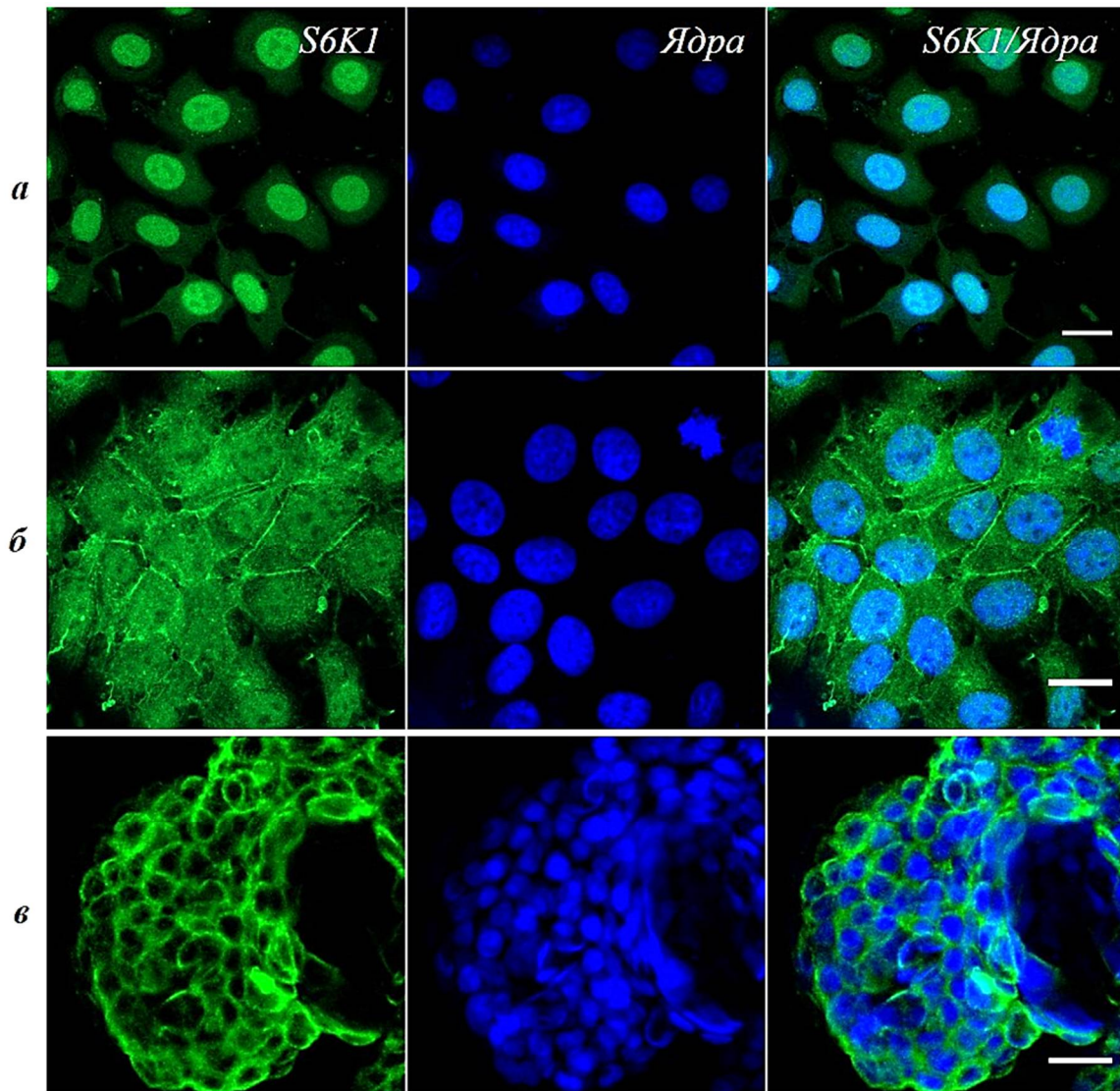


Рис. 2. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у клітинах лінії MCF-7: *а* – ядерна локалізація S6K1 у поодиноких клітинах лінії MCF-7; *б* – ядерна та цитоплазматична локалізація S6K1 у ділянках 60-70% конфлюентного моношару клітин; *в* – цитоплазматична локалізація S6K1 у сферідах клітин MCF-7 в умовах тривимірної культури. ДНК клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм

Для виявлення цитоплазматичного компартменту клітини були проінкубовані з флуоресцентно міченим фаллоїдином, який дозволив візуалізувати актиновий цитоскелет (рис. 3). Так, за щільності клітин 10 тис. кл/лунку спостерігалась яскраво виражена ядерна імунофлуоресцентна реакція. За щільності 30 тис. кл/лунку починала зростати цитоплазматична імунофлуоресцентна реакція проти S6K1, тоді як при 50 тис. кл/лунку та 70 тис.

кл/лунку кінза S6K1 детектувалася як в ядрі , так і в цитоплазмі приблизно на однаковому рівні. Найвищий вміст S6K1 у цитоплазмі спостерігався за щільності 100 тис. кл/лунку, що відповідало конфлюентному моношару.

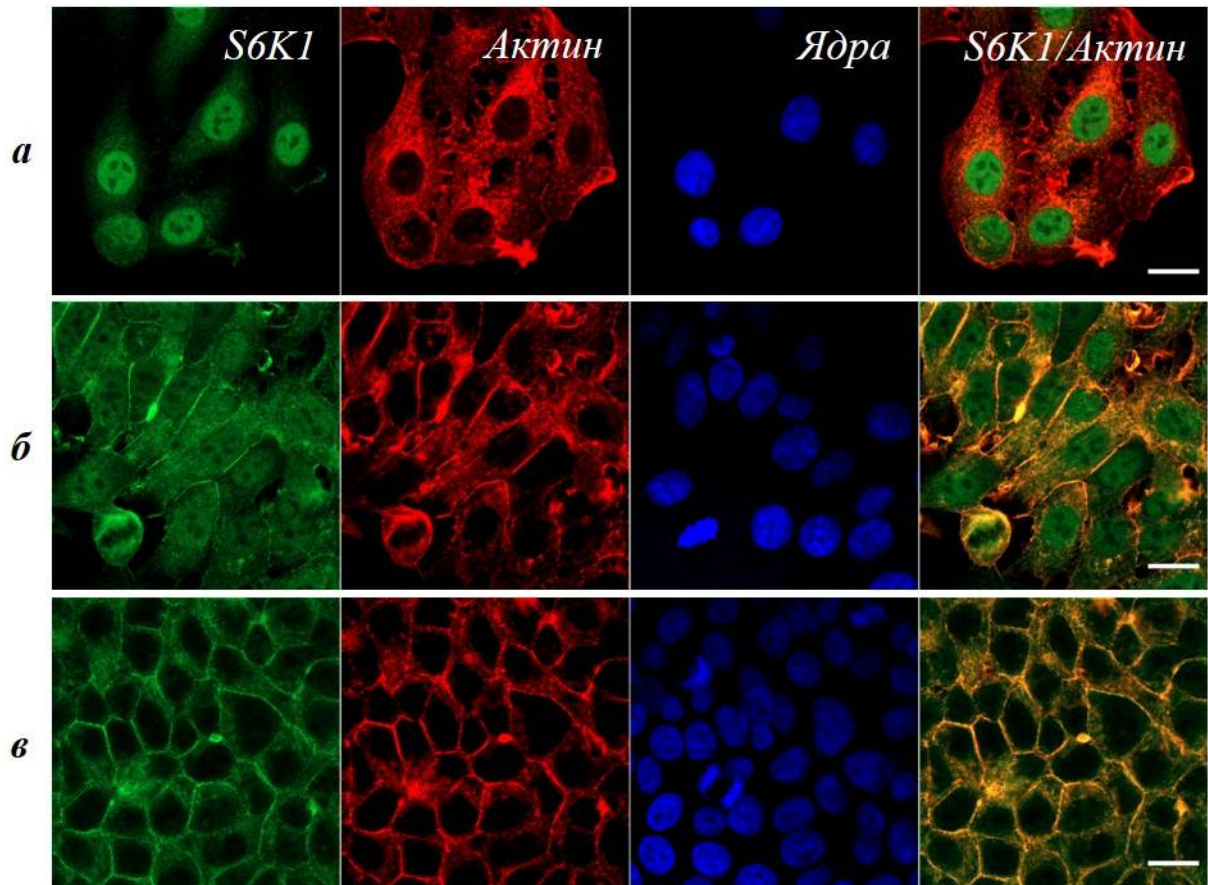


Рис. 3. Мікропрепарати клітин лінії MCF-7, які культивували за різного рівня конфлюентності моношару: *a* – 10 тис. кл/лунку; *б* – 50 тис. кл/лунку; *в* – 100 тис. кл/лунку. Імунофлуоресцентне визначення внутрішньоклітинної локалізації S6K1 (зелений) проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1. Цитоплазматичний компартмент візуалізований за допомогою флуоресцентно міченого фалоїдину (червоний). Ядра клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм

Таким чином, вперше було виявлено, що ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 залежить від щільності клітин лінії MCF-7 за умов *in vitro*. Показано, що S6K1 локалізується у ядрах поодиноких клітин та переміщується до цитоплазми при досягненні моношаром клітин 100% конфлюентності. Виявлено, що S6K1 розташовується у цитоплазмі клітин за умов тривимірної культури, коли клітини формують щільні сфероїди із численними міжклітинними контактами.

Вивчення внутрішньоклітинної локалізації кінзи S6K1 у сфероїдах клітин лінії MCF-7, які розпластуються на адгезивному субстраті. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинного розподілу кінзи S6K1 показав, що S6K1 локалізується переважно цитоплазматично у сфероїдах клітин лінії MCF-7. Однак, при розпластуванні сфероїдів спостерігалась релокалізація

протеїнкінази S6K1 у ядра мігруючих клітин. Так, незначне ядерне забарвлення було виявлене у клітинах лідируючого краю сфероїдів на 24 год культивації на адгезивній поверхні (рис. 4а), тоді як значне посилення ядерної реакції відбувалося у клітинах, які мігрували із сфероїдів, на 72 год реверсії (рис. 4б).

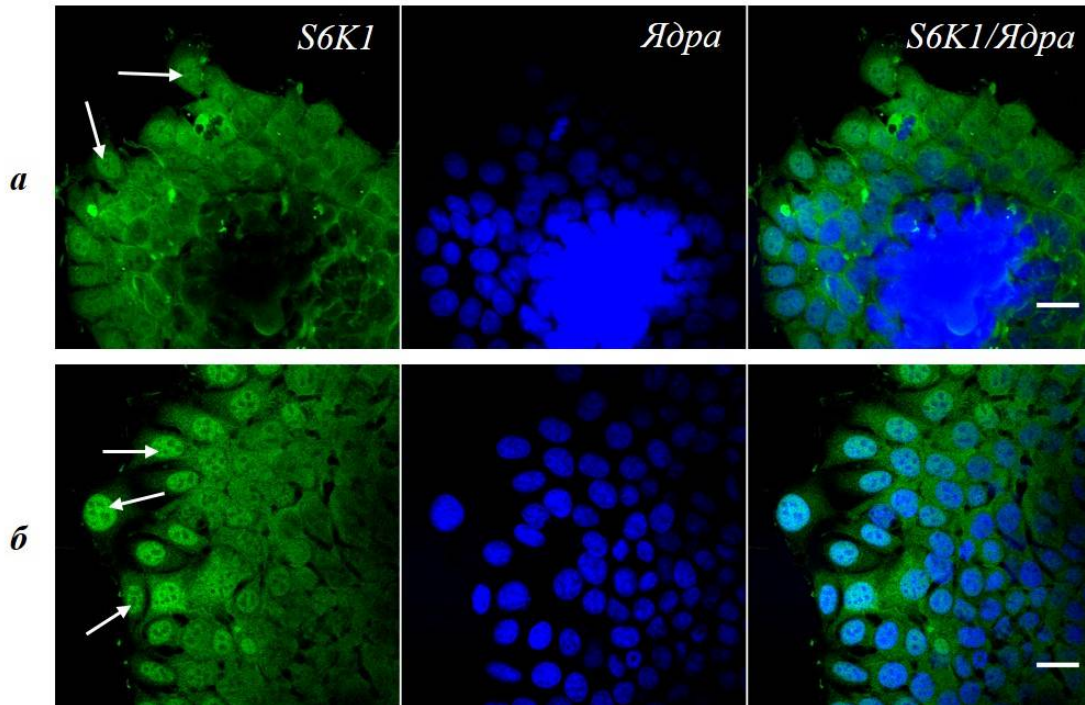


Рис. 4. Мікропрепарати сфероїдів клітин лінії MCF-7, які розпластувалися на адгезивній поверхні протягом 24 год (а) або 72 год (б). Імунофлуоресцентна реакція на S6K1 (зелений). Стрілки вказують на позитивну реакцію у ядрах клітин. Ядра дофарбовані барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 25 мкм

Дослідження білково-білкових взаємодій S6K1 у клітинах, які мігрують.

Отримані результати вказують на те, що міграція супроводжується релокалізацією S6K1 з цитоплазми до ядра клітин. Одним із можливих пояснень цього явища може бути участь S6K1 у регуляції активності транскрипційних факторів відповідальних за експресію генів, залучених до регуляції клітинної міграції. Для перевірки даної гіпотези було обрано низку транскрипційних факторів, які регулюються mTOR/S6K сигнальною мережею та активуються у клітинах, що мігрують під час ембріонального розвитку або онкотрансформації, а саме: ERG, CDX2 та TBR2.

Згідно отриманих даних лише для TBR2 було виявлено часткову співлокалізацію з протеїнкіназою S6K1 (рис. 5). Кількісний аналіз співлокалізації досліджуваних білків показав, що коефіцієнт Пірсона для моношару клітин з низьким рівнем конфлюентності становить $R_r = 0.55 \pm 0.113$, що відповідає середньому рівню співлокалізації між S6K1 та TBR2. Моношар з високим рівнем конфлюентності характеризувався нижчим коефіцієнтом Пірсона, а саме: $R_r = 0.47 \pm 0.064$. Таким чином, вищий рівень співлокалізації

TBR2 та S6K1 був виявлений за умов, коли обидва білки знаходяться переважно у ядрі клітин.

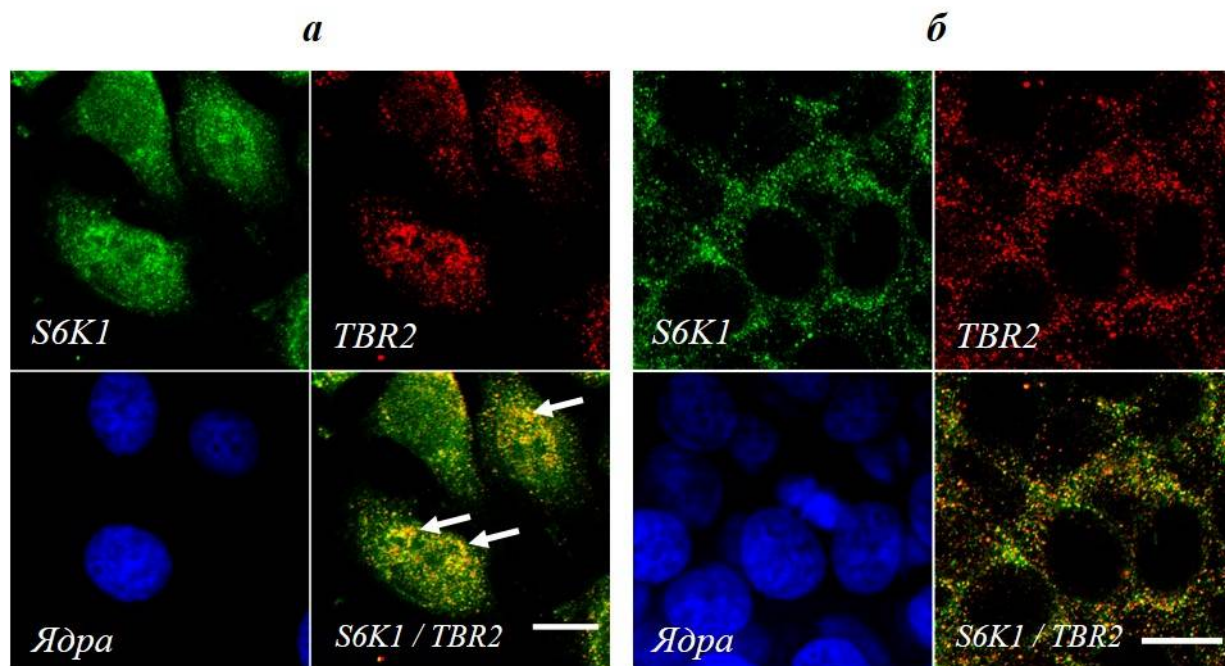


Рис. 5. Імунофлуоресцентна детекція співлокалізації кінрази S6K1 та транскрипційного фактора TBR2 у моношаровій культурі різної щільності: *a* – клітини лінії MCF-7 в умовах культивування при низькій щільності; *б* – клітини лінії MCF-7 в умовах культивування при високій щільності. Ядра клітин дофарбовано барвником Hoechst 33342 (блакитний). Стрілки вказують на наявність часткової співлокалізації S6K1 та TBR2. Масштаб 15 мкм

Метод ко-імунопреципітації підтвердив наявність білок-білкових взаємодій між S6K1 та TBR2 (рис. 6). Білкові комплекси були преципітовані з лізатів клітин MCF-7 за допомогою антитіл проти С-кінця молекули S6K1. Антитіла проти транскрипційного фактора TBR2 виявили наявність білка TBR2 у преципітатах. Отримані результати дозволяють припустити можливість фосфорилування TBR2 кіназою S6K1.

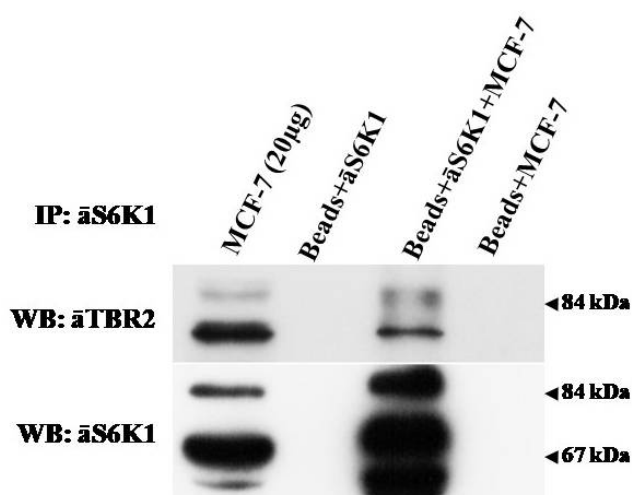


Рис. 6. Вестерн блот аналіз преципітованих білкових комплексів з лізатів клітин MCF-7 за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1.

Подальший комп'ютерний аналіз молекули TBR2 з використанням програм GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org>) та PSP (www.phosphosite.org) виявив наявність низки потенційних сайтів фосфорилювання для кінази S6K1 (рис. 7).

a

Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
107	S	AGC	PPDGRKGSPCGEEEL	1,522	1,279
646	S	AGC	ACKRRRLSPSNSSNE	2,397	1,279
646	S	AGC/RSK	ACKRRRLSPSNSSNE	6,352	3,035
648	S	AGC/RSK	KRRRLSPSNSSNENS	3,549	3,035
421	T	AGC/RSK/RSKp70	NEPSKTQITFTFSETQ	7,816	5,594
423	T	AGC/RSK/RSKp70	PSKTQITFTFSETQFI	9,447	5,594
646	S	AGC/RSK/RSKp70	ACKRRRLSPSNSSNE	10	5,594

б

Рис. 7. Біоінформатичний аналіз можливого фосфорилювання транскрипційного фактора TBR2 кіназою S6K1: *a* – можливі сайти фосфорилювання TBR2; *б* – сайти з найвищою ймовірністю фосфорилювання кіназою S6K1 розташовуються у важливих ділянках молекули і потенційно можуть впливати на транскрипційну активність TBR2

Три встановлені сайти, а саме треонін 421, треонін 423, серин 646, можуть бути фосфорильовані з високим рівнем ймовірності. Отже, можна припустити, що S6K1 може бути залучена до регуляції активності фактора TBR2. Однак, дане питання потребує подальших досліджень.

Вивчення ролі mTOR/S6K1 сигнального каскаду у процесі поділу клітин раку молочної залози людини. Підвищену проліферативну активність вважають однією із ряду ознак малігнізованих клітин (Kramer *et al.*, 2016). Наразі з'являються окремі повідомлення про те, що кінази mTOR та S6K1 можуть бути залучені до регуляції безпосередньо процесу мітозу (Saxton *et al.*, 2017). Проте цілісної картини ролі зазначеного сигналіngu у проліферації пухлинних клітин немає. Тому одним із завдань роботи було вивчення вмісту та внутрішньоклітинної локалізації S6K1 та її головного регулятора протеїнкінази mTOR на різних етапах поділу клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7.

Для специфічної візуалізації мітотичних клітин нами було обрано антитіла проти ядерного антигену Ki-67. Дані антитіла було отримано у відділі сигнальних систем Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Khoguzhenko *et al.*, 2010). У ході дисертаційної роботи було оптимізовано умови імунофлуоресцентної та імуногістохімічної реакції із застосуванням отриманих антитіл. Подвійний імунофлуоресцентний аналіз з використанням антитіл проти білка Ki-67 і проти кінази S6K1 виявив, що клітинам MCF-7 на стадії поділу властиве суттєве підвищення вмісту S6K1, порівняно з інтерфазними клітинами.

Протеїнкіназа mTOR є верхньою ланкою mTOR/S6K1 сигнального каскаду і безпосереднім регулятором активності S6K1. Вперше було задетектовано наявність яскравої гранулоподібної реакції на фосфо-mTOR S 2481, яка співлокалізувалася з плечами конденсованих метафазних хромосом (рис. 8).

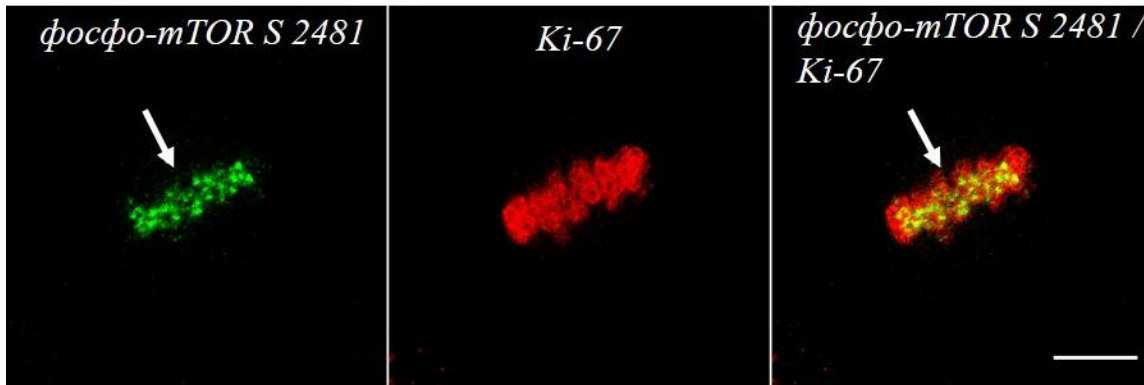


Рис. 8. Подвійне імуофлуоресцентне визначення фосфо-mTOR S 2481 (зелений) та маркера проліферації, антигена Ki-67 (червоний) у мітотичних клітинах лінії MCF-7. Стрілки вказують на співлокалізацію фосфо-mTOR S 2481 із конденсованими хромосомами у метафазній пластинці. Масштаб 10 мкм

Таким чином, було виявлено суттєве зростання внутрішньоклітинного вмісту протеїнкінази S6K1 у клітинах лінії MCF-7 на усіх стадіях мітозу. Також вперше показано співлокалізацію фосфорильованої форми білка mTOR, а саме фосфо-mTOR S 2481 з конденсованими хромосомами під час метафази, що ймовірно вказує на важливу неканонічну функцію mTOR/S6K1 сигнального каскаду у регуляції поділу клітин.

Отримання клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Наразі у клітинах ссавців ідентифіковано низку ізоформ протеїнкінази S6K1, а саме: p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. Натомість, залишаються невідомими особливості функціональної активності в клітині різних ізоформ S6K1 як то у проліферації та міграції нормальних клітин, так і на окремих етапах онкогенезу. Тому одним із завдань роботи було отримати клітинні лінії аденокарциноми молочної залози людини MCF-7 із пригніченою експресією усіх ізоформ кінази (MCF-7 p85-/p70-/p60-) та з експресією лише p60S6K1 (MCF-7 p85-/p70-/p60+). Для цього було використано систему редагування геному CRISPR/Cas9. Після селекції було отримано 5 клонів клітин MCF-7 p85-/p70-/p60- та 5 клонів MCF-7 p85-/p70-/p60+.

Для перевірки успішності модуляції експресії ізоформ S6K1 було проведено вестерн-блот аналіз лізатів отриманих клонів клітин лінії MCF-7 з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1, які детектують усі три ізоформи протеїнкінази S6K1. Клітини MCF-7 дикого типу були використанні у якості контролю (рис. 9).

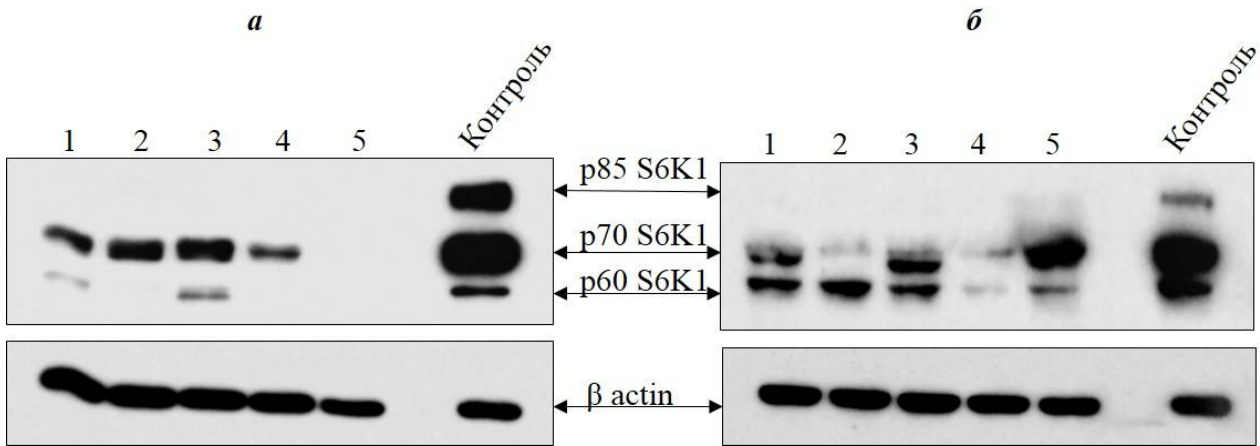


Рис. 9. Вестерн-блот аналіз експресії ізоформ кінрази S6K1: *a* – у клонах стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60-; *б* – у клонах стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+. Детекцію білка S6K1 у лізатах проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1. β актин був використаний у якості контролю нанесення зразків. 1-5 – порядковий номер отриманих клонів; контроль – клітини лінії MCF-7 дикого типу

Було встановлено, що у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- експресія усіх ізоформ суттєво знижувалась в усіх клонах порівняно з контролем (рис. 9а). Таким чином, повне вимкнення генів S6K1 було досягнутим у клоні №5. Із літературних даних відомо, що клітини лінії MCF-7 містять підвищену кількість копій гену *RPS6K1*, внаслідок ампліфікації ділянки хромосоми 17q22-24. Тому система CRISPR/Cas9 може спричиняти дещо відмінну кількість мутацій у клітинах такої популяції, що пояснює різну ефективність пригнічення експресії ізоформ S6K1 у отриманих клонах стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60-.

Для виокремлення та характеристики ролі саме p60S6K1 у життєдіяльності клітин, актуальним вбачається створення клітинної лінії, яка дозволить вивчення p60S6K1 без впливу інших ізоформ кінрази S6K1. Вестерн-блот аналіз лізатів стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ виявив експресію p60S6K1 у всіх отриманих клонах (рис. 9б), а для роботи було обрано клон 2 де найефективніше було пригнічено експресію p85 та p70 ізоформ S6K1.

Отже, за допомогою системи CRISPR/Cas9 було отримано стабільні лінії клітин аденокарциноми молочної залози MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+, які можуть бути використані для дослідження функцій окремих ізоформ кінрази S6K1 у клітинах раку молочної залози.

Морфологічний аналіз клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. З'ясування можливого впливу згаданих ізоформ S6K1 на життєдіяльність досліджуваних клітин почали із загального морфологічного аналізу культивованих клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Таким чином, було виявлено, що MCF-7 p85-/p70-/p60- морфологічно не відрізнялися від клітин дикого типу. Однак, клітини лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризувалась появою видовжених фібробластоподібних клітин, що значно відрізнялось від морфології клітин дикого типу (рис. 10).

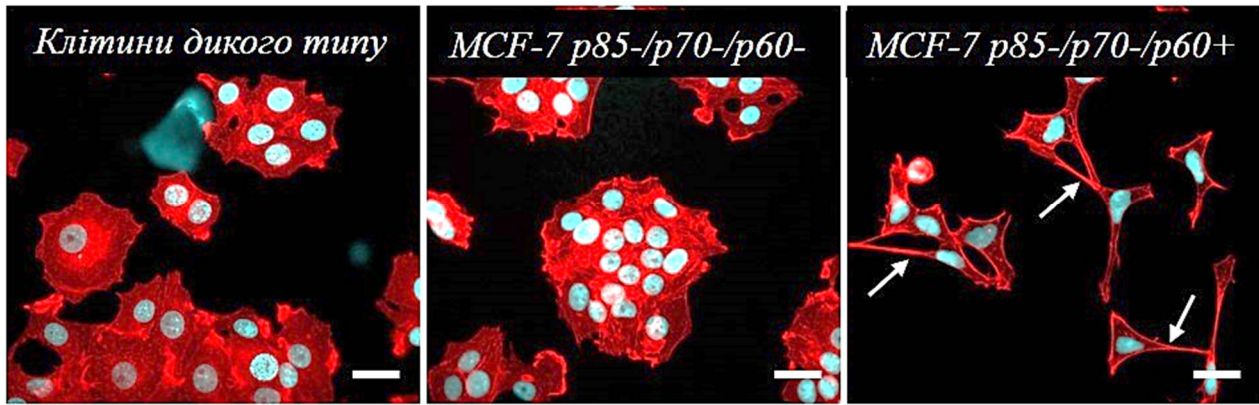


Рис. 10. Мікропрепарати клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Актиновий цитоскелет (червоний) забарвлений за допомогою фалоїдину, міченого тетраметилпродаміном (TRITC). Ядра (блакитний) дофарбовували барвником Hoechst 33342. Масштаб становить 25 мкм. Стрілки вказують на клітини зі зміненою морфологією

Отже, вперше показано, що отримані клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ набували фібробластоподібної форми та втрачали здатність формувати щільні кластери клітин, характерні для епітеліальних клітинних ліній.

Вивчення мітотичного індексу клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Для вивчення ефекту зміни рівня експресії досліджуваних ізоформ кінази S6 білка отримані клітинні лінії проаналізували з точки зору динаміки проліферації за допомогою аналізу мітотичного індексу. Визначення мітотичного індексу виявило зниження швидкості проліферації клітини MCF-7 p85-/p70-/p60- у порівнянні із клітинами дикого типу, що узгоджується із даними літератури (рис. 11).

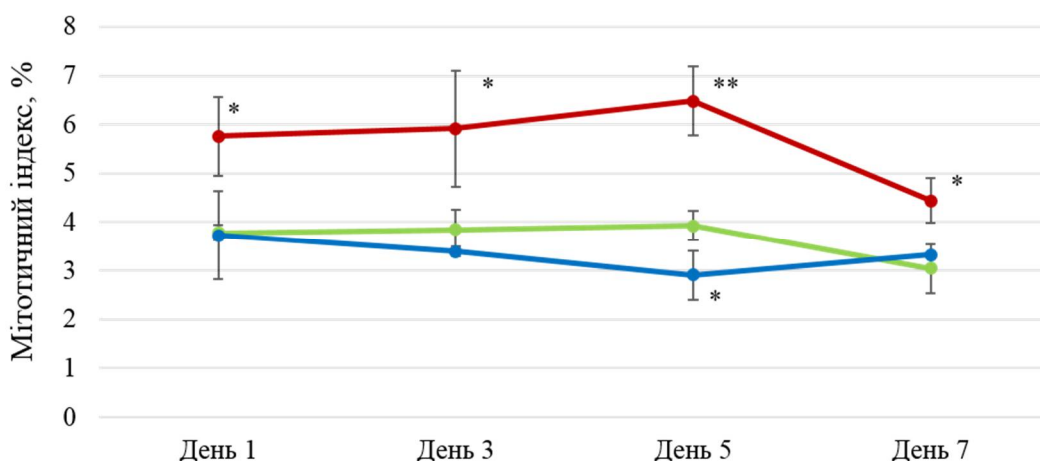


Рис. 11. Діаграма мітотичного індексу клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ на 1, 3, 5 та 7 дні культивування. Експеримент повторювали 4 рази. * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$. — Клітини дикого типу; — MCF-7 p85-/p70-/p60-; — MCF-7 p85-/p70-/p60+

Вперше показано, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ із збереженою експресією p60S6K1 характеризувались підвищеним рівнем мітотичної активності у порівнянні із клітинами дикого типу. Разом із попередніми результатами це дозволяє припустити потенційні онкогенні властивості даної ізоформи.

Вивчення потенціалу отриманих клітинних ліній до міграції за методом раневої поверхні. На попередніх етапах дослідження було встановлено, що S6K1 змінює свою внутрішньоклітинну локалізацію у клітинах, які мігрують. Однак, роль різних ізоформ S6K1 у регуляції рухливості клітин наразі невідома.

Для вивчення участі ізоформ S6K1 у процесах міграції клітин отримані клітинні лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ були використані для аналізу рухливості клітин за допомогою методу раневої поверхні.

Аналіз отриманих результатів показав, що контрольні клітини лінії MCF-7 мігрують зі швидкістю $55,47 \pm 5,09$ мкм/24 год. Тоді як швидкість міграції клітинної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- значно знижувалася і становила лише $18,71 \pm 2,82$ мкм/24 год. Що вказує на важливу роль S6K1 у регуляції процесів рухливості клітин. Важливо, що швидкість міграції клітинної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ зі збереженою експресією ізоформи p60S6K1 зростала більш ніж вдвічі порівняно з контрольними клітинами і становила $121,42 \pm 18,98$ мкм/24 год (рис. 12).

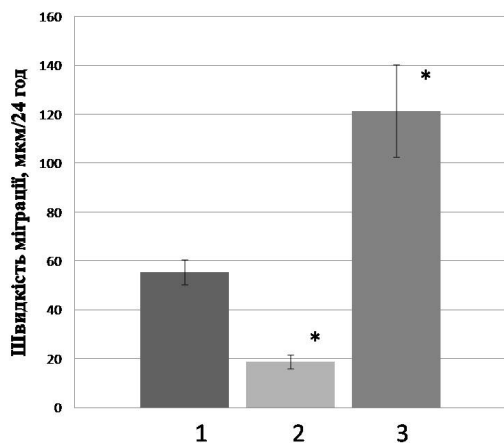


Рис. 12. Діаграма швидкості міграції клітин. 1 – MCF-7, 2 – MCF-7 p85-/p70-/p60- та 3 – MCF-7 p85-/p70-/p60+. * - $p \leq 0,01$

Отже, отримані результати підтвердили залучення протеїнкінази S6K1 та/чи окремих її ізоформ до регуляції міграції клітин. А також дозволяють припустити, що зміщення експресії ізоформ S6K1 у бік p60S6K1 може призводити чи бути показником підвищеної інвазивності та метастатичного потенціалу злоякісних клітин і в цілому пухлини.

Аналіз активності mTOR/S6K1 сигнального каскаду в отриманих клітинних лініях MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Підвищення проліферативної та міграційної активності клітин із збереженою експресією ізоформи p60S6K1 викликало питання про загальний рівень активності mTOR/S6K1 сигналіну в отриманих клітинних лініях. Вестерн-блот аналіз рівня фосфорилювання рибосомального білка pS6 показав, що за стандартних умов

культивування при додаванні 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби фосфорилування грpS6 було значно нижчим у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ порівняно із клітинами дикого типу, але не зникало повністю. Ще одним маркером активності mTOR/S6K1 сигнального шляху є фосфорильована форма протеїнкінази Akt (р-Akt S473). Вестерн-блот аналіз не виявив суттєвих відмінностей у рівні фосфорилування Akt у клітинах дикого типу та MCF-7 p85-/p70-/p60-. Клітинна лінія MCF-7 p85-/p70-/p60+ мала дещо знижений вміст р-Akt S473 за стандартних умов та під час голодування порівняно із клітинами дикого типу (рис. 13).

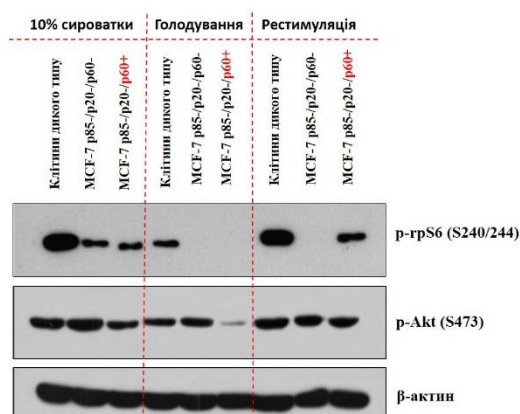


Рис. 13. Вестерн-блот аналіз вмісту фосфорильованих форм деяких мішеней mTOR/S6K1 сигнального каскаду

Відомо, що протеїнкіназа Akt має широкий спектр внутрішньоклітинних мішеней, і, в тому числі, залучених до регуляції міграції та поділу клітин. Оскільки рівень фосфорилування Akt відрізнявся у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ порівняно із клітинами дикого типу та MCF-7 p85-/p70-/p60-, наступним нашим кроком стала перевірка профілю фосфорилування мішеней кінази Akt в отриманих клітинних лініях (рис. 14).

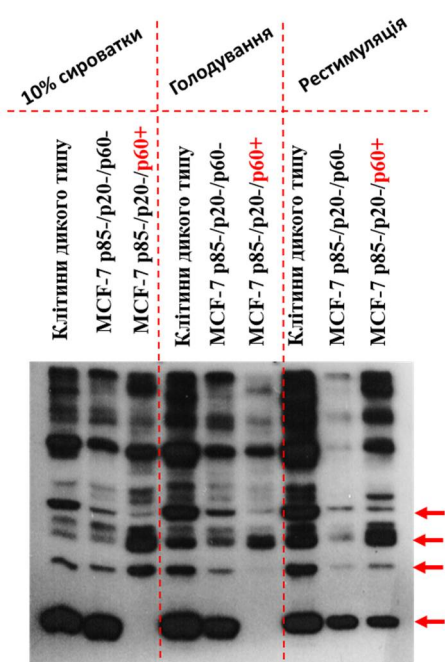


Рис. 14. Вестерн-блот аналіз рівня фосфорилування мішеней протеїнкінази Akt у клітинах дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Стрілками відмічено різницю у фосфорилуванні мішеней Akt між MCF-7 p85-/p70-/p60+ та клітинами дикого типу

За допомогою вестерн-блот аналізу із застосуванням антитіл проти фосфорильованих субстратів Akt вдалося встановити, що MCF-7 p85-/p70-/p60+ мають значні відмінності у рівні фосфорильовання низки білків (Рис. 14, червоні стрілки). Це у свою чергу, може бути одним із можливих пояснень високого рівня проліферації та міграції MCF-7 p85-/p70-/p60+. Однак, дане припущення потребує досліджень з використанням специфічних антитіл проти мішеней Akt для встановлення точної природи субстратів, залучених до регуляції цих функцій.

Як підсумок було запропоновано модель залежності ядерно-цитоплазматичного розташування кінази S6K1 від локомоції та щільності клітин за умов *in vitro*, яка включає нові білок-білкові взаємодії, що були ідентифіковані в даній роботі (рис. 15). Згідно цієї моделі S6K1 знаходиться в цитоплазмі клітин при високій щільності моношару та у тривимірних культурах. Однак, за умов ініціації міграції та при низькому рівні конфлюентності культури клітин S6K1 переміщується до ядра, де вона взаємодіє із транскрипційним фактором TBR2 та іншими ядерними субстратами, що потенційно відіграють роль в міграції клітин. Можна припустити, що саме p60S6K1 (виявлена нами у ядрі) вносить суттєвий вклад у регуляцію зазначених процесів.

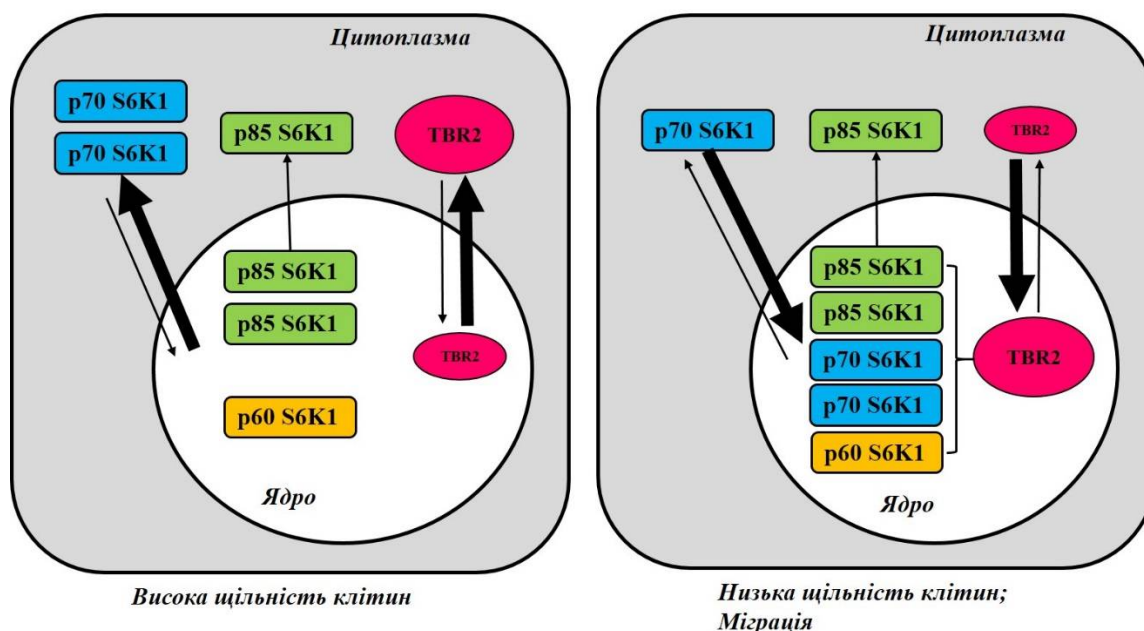


Рис. 15. Гіпотетична модель залежності ядерно-цитоплазматичного розташування кінази S6K1 від рухливості та щільності клітин за умов *in vitro* та додаткових білок-білкових взаємодій, ідентифікованих в роботі

Результати представлених в даній роботі досліджень 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 проявах пухлинної прогресії, таких як підвищення рівня проліферації та міграції клітин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлена залежність ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 від щільності та рухливості клітин лінії MCF-7. Вперше показано існування білок-білкового комплексу між S6K1 і транскрипційним фактором TBR2. Отримано модельні системи на основі клітинної лінії MCF-7 з диференційною експресією різних ізоформ S6K1 та показано, що зміни балансу експресії ізоформ S6K1 в бік експресії p60S6K1 ізоформи - призводить до значного підвищення рівня міграції та проліферації клітин.

1. Вперше показано залежність субклітинної локалізації кінази S6K1 від щільності культури клітин лінії MCF-7. Встановлена переважно ядерна локалізація кінази S6K1 у гістологічних зразках інвазивної аденокарциноми молочної залози людини порівняно із умовно-нормальною тканиною.
2. Встановлено, що ініціація міграції супроводжується транслокацією S6K1 до ядер клітин.
3. Вперше показано співлокалізацію кінази S6K1 та транскрипційного фактора TBR2, який залучений до регуляції міграції клітин. Підтверджено існування білок-білкового комплексу S6K1 та TBR2 методом ко-імунопреципітації. За допомогою біоінформатичного аналізу встановлено, що TBR2 може бути субстратом S6K1 з високою імовірністю.
4. Вперше описано співлокалізацію фосфорильованої форми кінази mTOR, а саме фосфо-mTOR S2481 із конденсованими хромосомами під час метафази мітозу клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7.
5. За допомогою CRISPR/cas9 технології редагування геному отримано модельні лінії клітин MCF-7 з різним рівнем експресії ізоформ S6K1.
6. Вперше показано, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризуються підвищеним рівнем рухливості, мітотичної активності та фібробластоподібною морфологією порівняно із клітинами дикого типу.
7. Встановлено, що зміна балансу в експресії ізоформ S6K1 на користь p60S6K1 призводить до значних змін Akt-залежного сигналювання, ключового в регуляції процесу міграції клітин.

СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Kosach V.**, Shkarina K., Kravchenko A., Tereshchenko Y., Kovalchuk E., Skoroda L., Krotevych M., Khoruzhenko A. Nucleocytoplasmic distribution of S6K1 depends on the density and motility of MCF-7 cells in vitro // F1000Research. – 2018. – 7:1332. *(Особистий внесок: культуральна робота, аналіз співлокалізації досліджуваних білків, ко-імунопреципітація, участь у написанні манускрипту).*
2. **Kosach V.**, Tykhonkova I., Cherednyk O., Filonenko V., Khoruzhenko A. Phospho-mTOR (Ser2481) colocalizes with condensed chromosomes during metaphase // Biopolymers and Cell. – 2016. – Vol. 32. – N 2. – P 105-110. *(Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, підготовка рукопису до друку).*

3. **Kosach V.**, Cherednyk O., Khoruzhenko A. Characteristic of mTOR signaling and its involvement in the regulation of cell movements through remodeling the cytoskeleton architecture // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – Vol. 31. – N 1. – P. 5-14 (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, написання рукопису*).

4. Gotsulyak N., **Kosach V.**, Cherednyk O., Tykhonkova I., Khoruzhenko A. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay // *Biopolymers and cell*. – 2014. – Vol. 30. – N 3– P. 223-228 (*Особистий внесок: культуральна робота, підрахунок та статистичний аналіз міграції клітин лінії MCF-7*).

5. **Kukharchuk V.**, Khoruzhenko A., Cherednyk O., Filonenko V. Immunocytochemical analysis of content of S6 kinases in MCF-7 cells on different stages of mitosis // *Bulletin of Taras Shevchenko Kyiv National University, Biology*. – 2010. – Vol.55. – P. 46-49 (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, статистичний аналіз, написання рукопису*).

6. Khoruzhenko A., **Kukharchuk V.**, Cherednyk O., Tykhonkova I., Ovcharenko G., Malanchuk O., Filonenko V. Monoclonal Antibodies to Ki-67 Protein Suitable for Immunohistochemical Analysis // *HYBRIDOMA*. – 2010. – Vol. 29. – N 4. – P.301-304 (*Особистий внесок: імунофлуоресцентний аналіз, імуногістохімічний аналіз, мікроскопія*).

7. **Kosach V.R.**, Zaiets I.V., Khoruzhenko A.I., Filonenko V.V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1 // XI Parnas Conference – Young scientists' forum "Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine". – Kyiv, Ukraine. – 2018. – P. 23 (*Особистий внесок: вестерн-блот аналіз, ко-імунопреципітація, культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз*).

8. Кравченко А., **Косач В.**, Філоненко В., Хоруженко А. Характеристика моделі визначення рівня рухливості пухлинних клітин *in vitro* // XVI Міжнародна конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки» . – Київ, Україна. – 2018. – ст. 263-265 (*Особистий внесок: конфокальна мікроскопія*).

9. Tereshchenko Y.S., **Kosach V.R.**, Zaiets I.V., Khoruzhenko A.I., Filonenko V.V. Implication of S6K1 isoforms in the regulation of cell motility // XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України. – Київ, Україна. – 2018. – ст. 164 (*Особистий внесок: вестерн-блот аналіз, тест на міграцію клітин за методом «раневої поверхні», статистичний аналіз*).

10. **Kosach V.**, Shkarina K., Tereshchenko Y., Kravchenko A., Filonenko V., Khoruzhenko A. Subcellular localization of S6K1 depends on the density and locomotor activity of MCF-7 cells in vitro // *Integrative Biology and Medicine*. – Kyiv, Ukraine. – 2017. – P. 41 (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, ко-імунопреципітація, статистичний аналіз*).

11. Tereshchenko Y., **Kosach V.**, Zaiets I. Generation of MCF-7 cell lines with downregulated expression of different S6K1 isoforms // XII International Young Scientists' Conference «Biology: from a molecule up to the biosphere» . – Харків, Україна. – 2017. – С.38 (*Особистий внесок: конфокальна мікроскопія, статистичний аналіз*).

12. **Kosach V.**, Cherednyk O., Khoruzhenko A., Filonenko V. Co-localization of phospho-mTOR (Ser2481) and condensed chromosomes in MCF-7 cells // X Parnas Conference Young Scientist Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine”. – Wrocław, Poland. – 2016 – P. 68 (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія*).

13. **Kosach V.**, Cherednyk O., Khoruzhenko A., Filonenko V. Interconnection between subcellular localization and functional activity of mTOR kinase // IX Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU dedicated to 160th Anniversary of M. F. Kastschenko. – Kyiv, Ukraine. – 2015. – P.5 (*Особистий внесок: вестерн-блот аналіз, культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія*).

14. **Kosach V.**, Cherednyk O., Kovalchuk E., Khoruzhenko A., Filonenko V. Peculiarities of mTOR kinase subcellular localization in the human epithelial cells // 14th FEBS Young Scientists' Forum (YSF). – Paris, France. – 2014. – P.42 (*Особистий внесок: культуральна робота, конфокальна мікроскопія, статистичний аналіз*).

15. **Kosach V.**, Cherednyk O., Khoruzhenko A., Filonenko V. New sites of the mTOR subcellular localization in human breast cells // 10th Horizons in Molecular Biology. – Göttingen, Germany. – 2013. – P. 149 (*Особистий внесок: культуральна робота, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія*).

16. Cherednyk O., **Kukharchuk V.**, Khoruzhenko A., Filonenko V. Proliferation of rat thyrocytes and MCF-7 cells is accompanied by increased expression of ribosomal protein S6 kinases S6K1 and S6K2 // 35th Annual Meeting of the European Thyroid Association. – Krakow, Poland. – 2011. – P 190 (*Особистий внесок: імунофлуоресцентний аналіз клітин лінії MCF-7*).

17. **Kukharchuk V.**, Cherednyk O., Tykhonkova I., Khoruzhenko A., Filonenko V. Immunocytochemical analysis of subcellular localization and content of S6 kinases during cell cycle progression // 35th FEBS Congress. – Gothenburg, Sweden. – 2010. – P. 125 (*Особистий внесок: імуноцитохімічний аналіз*).

АНОТАЦІЯ

Косач В.Р. Особливості функціонування mTOR/S6K1 сигнального шляху під час поділу та ініціації міграції клітин карциноми молочної залози людини *in vitro*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2019.

Роботу присвячено вивченню ролі кінази S6K1 та її ізоформи p60S6K1 у процесах поділу та міграції клітин аденокарциноми молочної залози людини *in vitro*. Виявлено переважно ядерне розташування S6K1 у зразках інвазивної аденокарциноми молочної залози людини. Вперше показано, що ядерно-цитоплазматичний розподіл S6K1 залежить від щільності моношару клітин за умов *in vitro*. Показано, що S6K1 транслокується до ядер клітин при міграції клітин лінії MCF-7 із сфероїдів на адгезивну поверхню. Вперше

продемонстровано наявність білок-білкового комплексу між S6K1 та транскрипційним фактором TBR2, який залучений до регуляції міграції клітин.

Отримано модельні клітинні лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Вперше продемонстровано, що експресія ізоформи p60S6K1 за відсутності p70S6K1 та p85S6K1 призводить до набуття фібробласто-подібної форми клітинами та значного підвищення їх міграційного та проліферативного потенціалу.

Ключові слова: протеїнкіназа S6K1, PI3K/mTOR/S6K сигнальний шлях, рак молочної залози, проліферація, міграція, тривимірна культура клітин.

АННОТАЦИЯ

Косач В.Р. Особенности функционирования mTOR / S6K1 сигнального пути во время деления и инициации миграции клеток карциномы молочной железы человека *in vitro*. - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Работа посвящена изучению роли киназы S6K1 и ее изоформы p60S6K1 в процессах деления и миграции клеток аденокарциномы молочной железы человека *in vitro*. Выявлено преимущественно ядерное расположения S6K1 в образцах инвазивной аденокарциномы молочной железы человека. Впервые показано, что ядерно-цитоплазматическое распределение S6K1 зависит от плотности монослоя клеток в условиях *in vitro*. Показано, что S6K1 транслоцируется в ядра клеток при миграции клеток линии MCF-7 изсфероидов на адгезивную поверхность. Впервые продемонстрировано наличие белок-белкового комплекса между S6K1 и транскрипционным фактором TBR2, который вовлечен в регуляцию миграции клеток.

Получено модельные клеточные линии MCF-7 p85-/p70-/p60- и MCF-7 p85-/p70-/p60+. Впервые показано, что экспрессия изоформы p60S6K1 при отсутствии p70S6K1 и p85S6K1 приводит к изменению морфологии клеток и повышению их миграционного и пролиферативного потенциала.

Ключевые слова: протеинкиназа S6K1, PI3K/mTOR/S6K сигнальный путь, рак молочной железы, пролиферация, миграция, трехмерная культура клеток.

SUMMARY

Kosach V.R. Features of mTOR/S6K1 signaling pathway functioning during division and initiation of migration of human breast carcinoma cells *in vitro*. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

According to the National Cancer Registry, malignant tumors of the mammary gland make up the largest proportion in the structure of the cancer incidence of female population in Ukraine. Therefore, the study of molecular mechanisms involved in the regulation of breast cancer cell proliferation and migration is necessary to understand the processes of metastasis and to improve anticancer therapy.

The study of genetic disorders in breast adenocarcinomas revealed amplification of the *RPS6K1* gene located in the 17q22-24 chromosomal region. The amplification of this gene results in an increased expression of S6K1 protein kinase, which is an important link in the PI3K/mTOR/S6K signaling pathway. Moreover, the alterations of the nuclear-cytoplasmic distribution of protein kinase S6K1 toward accumulation in the nuclei may potentially indicate resistance to anti-tumor therapy and a worse prognosis for patients. However, the causes and patterns of S6K1 intracellular localization change in breast malignant neoplasms are currently unknown. Therefore, the study of the features of S6K1 nuclear-cytoplasmic re-arrangement and the reasons leading to it is an urgent task for researchers.

Such studies are complicated by the fact that S6K1 has a number of isoforms formed as a result of an alternative translation of the mRNA and alternative splicing. In human cells there are several S6K1 isoforms: p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 and p31S6K1. So, there is a need to create cellular and animal models which provide selective expression of individual S6K1 isoforms, to study their functions and intracellular localization.

Therefore, the presented work is devoted to the study of the role of subcellular localization of mTOR and S6K1 kinases in the processes of division and migration of human adenocarcinoma cells *in vitro*, and the study of the participation of p60S6K1 in regulation of these processes.

An analysis of S6K1 and mTOR kinases distribution in mitotic cells revealed an increase of S6K1 content in MCF-7 mammary adenocarcinoma cells in course of division. Moreover, for the first time it was described the co-localization of the phosphorylated mTOR kinase form (phospho-mTOR S 2481) with condensed chromosomes at metaphase stage of MCF-7 cell mitosis.

The nuclear-cytoplasmic distribution of S6K1 was studied in invasive adenocarcinoma cells and conditionally normal human breast mammary tissue. A prominent reaction against S6K1 was detected in the nuclei of malignant cells. At the same time, in conditionally normal tissue S6K1 was predominantly located in the cytoplasm.

The immunofluorescence analysis of three-dimensional spheroid MCF-7 cell cultures, allowed to establish that S6K1 kinase is localized in the cytoplasm. However, in a monolayer culture with low cell density, a bright nuclear reaction was observed against the studied protein kinase. The resulting discrepancy has prompted us to assume that the nuclear-cytoplasmic arrangement of S6K1 may depend on cell density in a culture.

So, immunofluorescence analysis of S6K1 intracellular localization was applied to MCF-7 cells cultured at different density. It was found that at low density 10,000 cells/well, the nuclear reaction against S6K1 was observed in all cells. At a moderate

cell density 50,000 cells/well, coloration appeared in the cytoplasm of cells along with the nuclear reaction. When cultivating 100,000 cells/well, which corresponded to 100% confluent monolayer, the nuclear reaction almost completely disappeared and only cytoplasmic one was observed.

The redistribution of S6K1 was also detected in the migrating MCF-7 cells *in vitro*. To find out the role of nuclear translocation of the studied kinase, the analysis for possible S6K1 target proteins in the moving cells was performed. Co-immunoprecipitation and double immunofluorescence assays revealed the existence of the protein-protein complex of S6K1 and the transcription factor TBR2, which is involved in the regulation of cell migration. Possible sites of TBR2 phosphorylation by S6K1 kinase were identified using bioinformatics analysis.

Application of CRISPR/cas9 genome editing system allowed us to obtain MCF-7 cell lines with selective expression of S6K1 isoforms, namely: with suppressed expression of all isoforms (MCF-7 p85-/p70-/p60-) and selective expression of p60S6K1 (MCF-7 p85-/p70-/p60+).

The study of p60S6K1 expression effect on the proliferation activity of MCF-7 showed that MCF-7 p85-/p70-/p60+ cells had a 1.5-fold higher mitotic index in comparison to the wild type cells. Besides, morphological analysis of the generated cell lines showed that MCF-7 p85-/p70-/p60+ cells lost a typical epithelial morphology. Moreover, it was found that migration rate of MCF-7 p85-/p70-/p60+ cell line increased more than twice as compared to wild-type cells. The obtained results suggest that the p60S6K1 isoform can possess oncogenic potential, and also may be involved in epithelial-mesenchymal cell transition.

Thus, this manuscript presents the data which confirm the dependence of the nuclear-cytoplasmic distribution of S6K1 kinase on the density and motility of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. Besides, there was revealed the existence of protein-protein complex between S6K1 and the transcription factor TBR2 that is involved in the regulation of cell migration. Model systems based on the MCF-7 cell line with selective expression of different S6K1 isoforms were obtained. It has been shown that exclusive expression of p60S6K1 leads to a significant increase in the level of cell migration *in vitro*.

Key Words: protein kinase S6K1, PI3K/mTOR/S6K signaling pathway, breast cancer, proliferation, migration, three-dimensional cell culture.