

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КОСАЧ Вікторія Романівна**

УДК 577.217

577.218

**ДИСЕРТАЦІЯ**

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ В.Р. Косач

Науковий керівник: **Хоруженко Антоніна Іванівна**, кандидат біологічних  
наук, старший науковий співробітник

Київ – 2019

## 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.*

Онкологічні захворювання, за оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, посідають друге місце серед причин людської смертності після серцево-судинних хвороб. 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 підвищений рівень проліферації та 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. Тому дослідження молекулярних механізмів залучених до регуляції проліферації та міграції клітин раку молочної залози є необхідним для розуміння процесів метастазування та вдосконалення протиракової терапії.

Важливим сигнальним каскадом, який забезпечує внутрішньоклітинну передачу сигналу в епітелії молочної залози, є PI3K/mTOR/S6K сигнальний шлях. Даний сигнальний каскад відіграє ключову роль у передачі сигналу від інсуліну, тиреотропного гормону, естрогену та низки факторів росту, забезпечуючи регулювання багатьох фізіологічних функцій у клітинах, зокрема:

росту, обміну речовин, проліферації, диференціації, а також низки специфічних функцій, в основі яких лежать зміни у рівні біосинтезу білка в клітині.

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. Більш того, зміни ядерно-цитоплазматичного розподілу протеїнкінази S6K1 в бік накопичення у ядрах, потенційно можуть вказувати на резистентність до терапії протипухлинними препаратами та гірший прогноз для пацієнтів. Проте, причини та закономірності зміни внутрішньоклітинної локалізації S6K1 при злоякісній трансформації наразі залишаються невідомими. Тому вивчення особливостей ядерно-цитоплазматичного розташування S6K1 та причин його зміни є актуальним завданням для дослідників.

Такі дослідження ускладнюється тим, що S6K1 має низку ізоформ, які утворюються внаслідок альтернативної трансляції іРНК та альтернативного сплайсингу. У клітинах людини ізоформи S6K1 представлені p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 та p31S6K1. На сьогоднішній день, відомостей про роль та регуляцію ізоформи p60S6K1 майже немає. Тому існує потреба у створенні клітинних і молекулярних систем із вибірковою експресією окремих ізоформ S6K1, що дозволить диференційно вивчити їх функції та внутрішньоклітинну локалізацію.

Тому представлена дисертаційна робота присвячена вивченню ролі субклітинної локалізації кіназ mTOR і S6K1 у процесах поділу та міграції клітин аденокарциноми молочної залози людини *in vitro*, та дослідження участі гіпотетичної ізоформи p60S6K1 у регуляції цих процесів.

Аналіз розташування та вмісту кіназ S6K1 та mTOR у мітотичних клітинах дозволив виявити підвищення рівня S6K1 та фосфо-mTOR S2448 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 під час поділу. Більш того, вперше була описана співлокалізація фосфорильованої форми кінази mTOR, а саме фосфо-mTOR S 2481, із конденсованими хромосомами під час метафази мітозу клітин лінії MCF-7.

Вивчено ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 у клітинах інвазивної аденокарциноми та оточуючої умовно нормальної тканини молочної залози людини. Було виявлено яскраву реакцію проти S6K1 у ядрах злоякіснотрансформованих клітин. У клітинах оточуючої умовно нормальної тканини S6K1 розташовувалась у цитоплазмі.

Імунофлуоресцентний та імуногістохімічний аналіз трьохвимірних культур клітин MCF-7, а саме сфероїдів, дозволив встановити, що кіназа S6K1 локалізується у цитоплазмі клітин сфероїдів. Однак, у моношаровій культурі із низькою щільністю клітин спостерігалася яскрава ядерна реакція проти досліджуваної протеїнкінази. Отримані розбіжності дозволили нам припустити, що ядерно-цитоплазматичне розташування S6K1 може залежати від щільності клітин у культурі.

Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у зразках, які культивувалися за різної концентрації клітин MCF-7: 10 тис.кл./лунку, 50 тис.кл./лунку та 100 тис.кл./лунку. Було виявлено, що за умов 10 тис.кл./лунку ядерна реакція проти S6K1 була яскраво виражена в усіх клітинах. При концентрації 50 тис.кл./лунку з'являлось забарвлення у цитоплазмі клітин, яке детектувалось разом із ядерною реакцією. При культивуванні 100 тис.кл./лунку, яке відповідало 100% конфлюентності моношару, ядерне забарвлення майже повністю зникало. Таким чином, ми вперше показали, що ядерно-цитоплазматичний розподіл кінази S6K1 залежить від щільності моношару клітин лінії MCF-7.

Зміни ядерно-цитоплазматичного розташування S6K1 були також виявлені при міграції клітин MCF-7 за умов *in vitro*. Для з'ясування ролі такої транслокації досліджуваної кінази був проведений пошук можливих білків-мішеней S6K1 у клітинах, що мігрують.

За допомогою ко-імунопреципітації та подвійного імунофлуоресцентного аналізу вперше показано існування білок-білкового комплексу S6K1 та транскрипційного фактора TBR2, який залучений до регуляції міграції клітин. За

допомогою біоінформатичного аналізу виявлено можливі сайти фосфорилування транскрипційного фактора TBR2 кіназою S6K1.

Дослідження протеїнкінази S6K1 ускладнюється тим, що у клітинах ссавців експресується низка високогомологічних ізоформ даного білка. Наразі специфічних антитіл проти p70S6K1 або проти p60S6K1 немає, а їх створення є малоімовірним. Тому актуальним завданням було отримання клітинних ліній із диференційною експресією різних ізоформ.

Використання CRISPR/cas9 системи редагування геному дозволило нам отримати клітинні лінії MCF-7 із вибірковою експресією ізоформ S6K1, а саме: із пригніченою експресією усіх ізоформ кінази (MCF-7 p85-/p70-/p60-) та з експресією лише p60S6K1 (MCF-7 p85-/p70-/p60+). Вестерн-блот аналіз та імуофлуоресцентна мікроскопія підтвердили очікуваний рівень експресії S6K1 у отриманих лініях клітин.

Вивчення впливу експресії p60S6K1 на мітотичний індекс клітин MCF-7 показало, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ мають у 1,5 рази вищий рівень поділу за мітотичний індекс клітин дикого типу.

Дослідження морфологічних особливостей отриманих клітинних ліній показало, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ втрачали морфологію, властиву для епітеліальних клітин. Натомість, вони набували витягнутої фібробластоподібної форми порівняно із клітинами дикого типу та із MCF-7 p85-/p70-/p60-, які мали характерну полігональну форму та росли у вигляді багатоклітинних груп.

На наступному етапі роботи було вивчено міграційну активність отриманих клітинних ліній за допомогою моделі «раневої поверхні». Було виявлено, що швидкість міграції клітинної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ зі збереженою експресією ізоформи p60S6K1 зростала більш ніж вдвічі порівняно з клітинами дикого типу. Тоді як MCF-7 p85-/p70-/p60- мігрували значно повільніше за контрольну лінію клітин MCF-7.

Отримані результати дозволяють припускати, що ізоформа p60S6K1 може потенційно мати онкогенні властивості та можливо є залученою до епітеліально-мезенхімального переходу клітин.

Отже, у дисертаційній роботі встановлена залежність ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 від щільності та моторики клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. Ідентифіковано функціональну взаємодію та підтверджено існування білок-білкового комплексу між S6K1 і транскрипційним фактором TBR2, який бере участь у регуляції міграції клітин. Отримано модельні системи на основі клітинної лінії MCF-7 з диференційною експресією низки ізоформ S6K1. Показано, що експресія лише ізоформи p60S6K1 веде до значного підвищення рівня міграції клітин за умов *in vitro*.

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

#### Список публікацій здобувача:

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.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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.

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.

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.

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

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



## SUMMARY

**Kosach V.R. Features of the mTOR/S6K1 signaling pathway functioning during division and initiation of migration of the 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 World Health Organization, cancer is ranked at second place among the causes of human death after cardiovascular disease. 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. One of the main causes of death of patients with this type of cancer is an increased level of proliferation and the ability of cells to form distant metastases. Thus, it has been shown that the majority of primary carcinomas of the mammary gland do not endanger human life, which is also due to the absence of a direct threat of mastectomy. While breast cancer metastases violate the functions of vital organs such as the brain, liver, lungs, bones, partial removal, and surgical intervention, which pose a direct threat to the patient's life. Therefore, the study of molecular mechanisms involved in regulating of the proliferation and migration of breast cancer cells is necessary to understand the processes of metastasis and to improve anticancer therapy.

An important signaling cascade that provides intracellular signaling in the epithelium of the mammary gland is the PI3K/mTOR/S6K signaling pathway. This signaling cascade plays a key role in signaling from insulin, thyroid stimulating hormone, estrogen and a number of growth factors, providing control of many physiological functions in cells, in particular: growth, metabolism, proliferation, differentiation.

The study of genetic disorders in the adenocarcinomas of the mammary gland revealed amplification of the *RPS6K1* gene located in the 17q22-24 chromosomal region. The amplification of this gene results in an increase in the expression of S6K1

protein kinase, which is an important link in the PI3K/mTOR/S6K signaling pathway. Moreover, changes in 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 changes in intracellular localization of S6K1 in malignant transformation are currently unknown. Therefore, the study of the features of the nuclear-cytoplasmic rearrangement of S6K1 and the reasons for its change is an urgent task for researchers.

Such studies are complicated by the fact that S6K1 has a number of isoforms that are 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. To date, there is almost no information about the role and regulation of the isoform p60S6K1. Therefore, there is a need for the creation of cellular and animal models with selective expression of individual S6K1 isoforms, which will allow 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 the location and content of S6K1 and mTOR kinases in mitotic cells revealed an increase in the level of S6K1 and phospho-mTOR S2448 in MCF-7 mammary adenocarcinoma cells at the time of division. Moreover, for the first time, the co-localization of the phosphorylated mTOR kinase form, namely, phospho-mTOR S 2481, with condensed chromosomes during the metaphase of the mitosis of MCF-7 cells was described.

The nuclear-cytoplasmic distribution of S6K1 protein kinase in invasive adenocarcinoma cells and the conditionally normal human breast mammary tissue cells was studied. A vivid reaction against S6K1 was detected in the nuclei of malignant cells. In cells of the conditionally normal tissue S6K1 was located in the cytoplasm.

The immunofluorescence and immunohistochemical analysis of three-dimensional MCF-7 cell cultures, namely spheroids, allowed to establish that S6K1

kinase is localized in the cytoplasm of spheroid cells. However, in a monolayer culture with low cell density, a bright nuclear reaction was observed against the protein kinase being studied. The resulting discrepancies have allowed us to assume that the nuclear-cytoplasmic arrangement of S6K1 may depend on cell density in a culture.

Immunofluorescence analysis of S6K1 intracellular localization in samples cultured at different concentrations of MCF-7 cells: 10,000 cells/well, 50,000 cells/well, and 100,000 cells/well. It was found that under the conditions of 10,000 cells/well, the nuclear reaction against S6K1 was observed in all cells. At a concentration of 50,000 cells/well, coloration appeared in the cytoplasm of cells, which was detected along with the nuclear reaction. When cultivating 100,000 cells/well, which corresponded to 100% confluence of the monolayer, the nuclear reaction almost completely disappeared. Thus, we have shown for the first time that the nuclear-cytoplasmic distribution of the S6K1 kinase depends on the density of the MCF-7 cell monolayer.

The location of S6K1 was also detected in the migration of MCF-7 cells *in vitro*. To find out the role of such translocation of the studied kinase, the analysis for possible S6K1 target proteins in the migrating cells was performed.

Using co-immunoprecipitation and double immunofluorescence assays, the existence of the protein-protein complex of S6K1 and the transcription factor TBR2, which is involved in the regulation of cell migration, was first shown. Using bioinformatics analysis, possible sites of phosphorylation of the transcription factor TBR2 by kinase S6K1 were identified.

Studies of S6K1 are complicated by the fact that in a mammalian cell a number of isoforms of this protein are expressed. There are currently no specific antibodies against p70S6K1 or p60S6K1, and their creation is unlikely. Therefore, there is a need to obtain cell lines with differential expression of various isoforms.

The use 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 expression of p60S6K1 alone

(MCF-7 p85-/p70-/p60+). Western blot analysis and immunofluorescence microscopy confirmed the expected level of expression of S6K1 in the resulting cell lines.

The study of the effect of p60S6K1 expression on the MCF-7 mitotic cell index showed that MCF-7 p85-/p70-/p60+ cells had a 1.5-fold higher mitotic index in comparison to the wild type cells.

The study of the morphological characteristics of the received cell lines showed that the cells of MCF-7 p85-/p70-/p60+ lost the morphology inherent to epithelial cells. Instead, they acquired an elongated fibroblast form compared to wild-type cells and MCF-7 p85-/p70-/p60-, which had a characteristic polygonal shape and grown in the form of multicellular groups

At the next stage of the work, the migration activity of the received cell lines was studied using the model of "wound healing surface". It was found that the rate of migration of the MCF-7 p85-/p70-/p60+ cell line with expression of p60S6K1 isoform increased more than twice as compared with wild-type cells. While the MCF-7 p85-/p70-/p60- was migrating considerably more slowly than the MCF-7 cell line.

The obtained results suggest that the isoform p60S6K1 may potentially have oncogenic properties and may be involved in epithelial-mesenchymal cell transition.

Thus, in the manuscript, the dependence of the nuclear-cytoplasmic distribution of S6K1 kinase on the density and motility of cells of the human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 was established. Functional interaction has been identified and the existence of a protein-protein complex between S6K1 and the transcription factor TBR2 that is involved in the regulation of cell migration was confirmed. Model systems based on the MCF-7 cell line with differentiated expression of a number of S6K1 isoforms were obtained. It has been shown that expression of only 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.

**List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
8. Kravchenko A., **Kosach V.**, Filonenko V., Khoruzhenko A. Optimization of in vitro model for analysis of tumor cell migration dynamics // XVI International

Conference of students and young scientists “Shevchenkivska Vesna: BIOSCIENCE ADVANCES”. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – P. 263-265.

9. Tereshchenko Y.S., **Kosach V.R.**, Zaiets I.V., Khorushenko A.I., Filonenko V.V. Implication of S6K1 isoforms in the regulation of cell motility // XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. – Kyiv, Ukraine. – 2018. – P. 164.

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.

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» . – Kharkiv, Ukraine – 2017. – P.38.

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”. – Wroclaw, Poland. – 2016. – P. 68.

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.

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.

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.

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

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

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	28
1.1. Загальна характеристика mTOR/S6K1 сигнального шляху	28
1.2. Будова та функції кінази рибосомного білка S6 (S6K1)	32
1.3. Множинність ізоформ S6K1 у клітинах людини та їх внутрішньоклітинна локалізація	41
1.4. Участь mTOR/S6K1 сигнального каскаду у розвитку новоутворень молочної залози людини	45
1.4.1. Роль mTOR/S6K сигнального ланцюга у регуляції процесу міграції пухлинних клітин	48
1.4.2. Участь mTOR/S6K сигнального каскаду в регуляції клітинного поділу та проліферації пухлинних клітин	51
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
2.1. Матеріали та обладнання	53
2.2. Методи роботи з білками	54
2.2.1. Приготування екстракту клітин ссавців	54
2.2.2. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд	55
2.2.3. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі	55
2.2.4. Імуноблот-аналіз	56
2.2.5. Імунопреципітація білкових комплексів	57
2.3. Методи роботи з культурами клітин ссавців	58
2.3.1. Культивування клітин	58
2.3.2. Отримання сфероїдів клітин лінії MCF-7 та їх гістологічний аналіз	59



	17
2.3.3. Ініціація міграції клітин лінії MCF-7 із сфероїдів на адгезивну поверхню	60
2.3.4. Імунофлуоресцентний аналіз та конфокальна мікроскопія	62
2.3.5. Ідентифікація мітотичних клітин за допомогою антитіл проти білка Ki-67	63
2.4. Приготування препаратів та імуногістологічне дослідження нормальної тканини та раку молочної залози	63
2.5. Отримання стабільних клітинних ліній MCF-7 з різною експресією ізоформ S6K1	64
2.5.1. Морфологічний аналіз отриманих клітинних ліній MCF-7	65
2.5.2. Аналіз швидкості міграції отриманих клітинних ліній MCF-7 за методом раневої поверхні	65
2.5.3. Дослідження рівня проліферації отриманих клітинних ліній MCF-7	66
2.6. Біоінформатичний аналіз амінокислотної послідовності транскрипційного фактору TBR2	67
2.7. Статистичний аналіз	68
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>69</b>
3.1. Дослідження внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 у нормальних та пухлинних клітинах молочної залози людини	69
3.1.1. Вивчення ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у тканині молочної залози людини	69
3.1.2. Аналіз ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7	73
3.1.3. Вивчення внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 у сфероїдах клітин лінії MCF-7, які розпластуються на адгезивному субстраті	79

	18
3.1.4. З'ясування ролі релокалізації S6K1 під час міграції клітин лінії MCF-7	82
3.2. Роль mTOR/S6K1 сигнального каскаду у процесі поділу клітин раку молочної залози людини	89
3.2.1. Дослідження вмісту та внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 на різних етапах мітозу	89
3.2.2. Визначення внутрішньоклітинної локалізації та вмісту кінази mTOR у проліферуючих клітинах лінії MCF-7	92
3.3. Отримання та характеристика стабільних клітинних ліній MCF-7 із вибірковою експресією ізоформ S6K1	99
3.3.1. Отримання клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+	99
3.3.2. Характеристика клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+.	102
3.3.3. Мітотичний індекс клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+.	106
3.3.4. Вивчення потенціалу отриманих клітинних ліній до міграції за методом раневої поверхні.	108
3.3.5. Аналіз активності mTOR/S6K1 сигнального каскаду в отриманих клітинних лініях MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+.	110
3.3.6. Внутрішньоклітинна локалізація ізоформи p60S6K1 за різної щільності моношару клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+	114
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	117
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	129
ДОДАТОК А	146

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

а.з.	–	амінокислотних залишків
БСА	–	бичачий сироватковий альбумін
ЕДТА	–	етилен-діамін-тетраоцтова кислота
ЗН	–	злякисне новоутворення
ІБ	–	імуноблот
ІІ	–	імунопреципітація
кДа	–	кілодальтон
ПААГ	–	поліакриламідний гель
CREM	–	модулятор цАМФ чутливого елемента (CAMP Response Element Modulator)
DMEM	–	середовище Ігла, модифіковане Дюльбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
4E-BP1	–	білок, який приєднується до еукаріотичного фактора ініціації трансляції 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)
eEF2K	–	кіназа фактора елонгації eEF2 еукаріот (eukaryotic elongation factor 2 kinase)
IGF-1	–	інсулін-подібний фактор росту 1 (insulin like growth factor 1)
IGF-1R	–	рецептор IGF-1 (insulin-like growth factor 1 receptor)
MMPs	–	матриксні металопротеїнази (matrix metalloproteinases)
mTOR	–	мішень рапаміцину у ссавців (mechanistic target of rapamycin)
mTORC1	–	mTOR комплекс 1 (mTOR Complex 1)
mTORC2	–	mTOR комплекс 2 (mTOR Complex 2)
NLS	–	сигнал ядерної локалізації (nuclear localization signal)
PI3K	–	фосфотидилінозитол - 3- кіназа (phosphoinositide 3-kinase)
PKB	–	протеїнкіназа В (protein kinase B)
PTEN	–	фосфатаза з гомологією до тензину, делетована на хромосомі 10 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)

PP2A	–	фосфатаза 2A (protein phosphatase 2A)
PRAS40	–	пролін-збагачений субстратAkt з молекулярною масою 40кДа (proline-rich Akt substrate of 40 kDa)
Rac1	–	ras-споріднений C3 субстрат (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
Raptor	–	білок, регуляторно асоційований з mTOR (regulatory associated protein of mTOR)
Rictor	–	RPTOR незалежний партнер mTOR комплексу 2 (RPTOR independent companion of MTOR complex 2)
RHEB	–	гомолог білка Ras у мозку (Ras homolog enriched in brain)
rpS6	–	рибосомний протеїн S6 (ribosomal protein S6)
S6K1	–	кіназа 1 рибосомального білка S6 (ribosomal protein S6 kinase1)
SDS	–	додецил сульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)
TSC1/2	–	білки туберозно-склерозного комплексу 1 і 2 (Tuberous sclerosis proteins 1 and 2)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, онкологічні захворювання посідають друге місце серед причин людської смертності після серцево-судинних хвороб. В Україні за даними Національного канцер-реєстру злоякісні новоутворення молочної залози складають найбільшу питому вагу в структурі онкологічної захворюваності жіночого населення. 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 (1,2). 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 одним із ключових моментів онкогенезу. Генетичні та регуляторні помилки в процесі проліферації чи диференціювання клітин можуть призвести до виживання клітин з небажаними мутаціями, сприяючи їх злоякісній трансформації (3).

Важливим сигнальним каскадом, який забезпечує внутрішньоклітинну передачу сигналу в епітелії молочної залози, є PI3K/mTOR/S6K сигнальний шлях. Даний сигнальний каскад відіграє ключову роль у передачі сигналу від інсуліну, тиреотропного гормону, естрогену та низки факторів росту, забезпечуючи регулювання багатьох фізіологічних функцій у клітинах, зокрема: росту, обміну речовин, проліферації, диференціації, а також низки специфічних функцій, в основі яких лежать зміни у рівні біосинтезу білка в клітині (4). Зміна активації ланок цього сигнального каскаду була виявлена при виникненні неоплазій молочної залози (5,6). 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 (7). Отже, 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 (8,9). Однак механізми регуляції субклітинної локалізації S6K1 ще не повністю зрозумілі. Згідно даних літератури у клітинах людини існує низка ізоформ протеїнкінази S6K1, а саме: p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 та p31S6K1 (10–12). Найкраще вивченими є ізоформи p85S6K1 і p70S6K1, тоді як функції двох інших ізоформ залишаються до кінця нез'ясованими. Важливим завданням наразі 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 Акт-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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Загальна характеристика mTOR/S6K1 сигнального шляху

Підтримка нормального збалансованого гомеостазу організму потребує щоб клітини, тканини і цілі органи реагували відповідним чином на дію різноманітних факторів оточуючого середовища. Фізіологічна відповідь клітин на зазначені чинники опосередковується і регулюється системою сигнальних каскадів клітини. Порушення в механізмах функціонування сигнальних мереж лежать в основі численних патологій (13,14).

mTOR/S6K1 сигнальний шлях відіграє ключову роль у регулюванні багатьох фізіологічних функцій у клітинах, зокрема: росту, виживання, обміну речовин, проліферації, диференціації, а також низки специфічних функцій, в основі яких лежать зміни у рівні біосинтезу білка в клітині. Саме через mTOR сигнальний шлях відбувається інтеграція широкого спектру різноманітних сигналів, що надходять від ростових факторів, поживних речовин (амінокислоти), ліпідів (фосфатидна кислота), осмотичного стресу, енергії (АТФ) для контролю клітинного росту (15,16).

Найкраще вивченим механізмом активації mTOR/S6K1 шляху є передача мітогенного сигналу із залученням фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K). Взаємодія інсуліна або інсуліно-подібного фактору росту з рецепторами на поверхні клітини призводить до активації PI3K. Активована PI3K в свою чергу здійснює фосфорилування фосфатидилінозитол-4-монофосфату (PI4P) та фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (PI-4,5-P2) до PI3P, PI-3,4-P2 та PI-3,4,5-P3. Було відзначено, що продукти даної реакції (фосфатидилінозитолі, фосфорильовані по третьому гідроксилу інозитулу) є вторинними месенджерами та слугують сайтами зв'язування з мембраною білків, які мають РН-домени у своїй амінокислотній послідовності (4).

Такими білками є протеїнкіназа В (protein kinase B, PKB/Akt) та її ефектор PDK1 (фосфоліпід-залежна кіназа 1). Після стимуляції інсуліном Akt переміщується до плазматичної мембрани, де вона фосфорилується PDK1, низкою інших кіназ та повністю активується. Akt залучена до регуляції широкого спектру клітинних функцій, таких як ріст, транскрипція, трансляція, перебіг клітинного циклу, виживання, апоптоз, аутофагія та метаболізм (17,18).

Важливим антагоністом PI3K/Akt сигналіngu є фосфатаза PTEN (фосфатаза з гомологією до тензину, делетована на хромосомі 10). PTEN функціонує як фосфатаза з подвійною специфічністю, субстратами якої є як фосфоліпіди, так і фосфопротеїни. PTEN каталізує дефосфорилування продуктів PI3K – фосфатидилінозитолтрифосфатів, інгібуючи таким чином активність кіназ PDK1 та Akt. Таким чином фосфатаза PTEN функціонує як пухлинний супресор. Мутації у гені *PTEN*, які призводять до втрати кіназної активності, виявлені в різних типах онкологічних захворювань, включаючи гліобластому, меланому, пухлини простати і молочної залози (19–21).

Активована протеїнкіназа Akt фосфорилує ланку туберозно-склерозного комплексу, а саме TSC2 (туберин). Відомо, що комплекс TSC1/2, і туберин, зокрема, відіграє важливу роль у супресії утворення пухлин шляхом негативної регуляції PI3K-залежного сигнального шляху. TSC2, і комплекс TSC1/2 в цілому, завдяки своїй GAP (GTPаза активувальній) активності, спрямованій проти активатора mTOR GTPази Rheb, є негативним регулятором mTOR. Фосфорилування TSC2 протеїнкіназою Akt призводить до інактивації цього білка, а отже до стимуляції mTOR (22–24). Наразі точний молекулярний механізм регуляції mTOR GTPазою Rheb не встановлений.

Відомо, що mTOR – це серин-треонінова кіназа, яка належить до родини PI3K-подібних кіназ (PI3KK), оскільки С кінцева ділянка молекули mTOR гомологічна до каталітичного домену PI3K (фосфоінозитол-3-кінази). Білки цієї родини залучені до регуляції клітинного росту, клітинного циклу, рекомбінації та беруть участь у подовженні теломер. В клітинах ссавців mTOR утворює щонайменше два типи білкових комплексів відомих як mTORC1 (mTOR

комплекс 1) та mTORC2 (mTOR комплекс 2), що відрізняються як за білковим складом, так і механізмами регуляції, субстратною специфічністю та чутливістю до інгібітора рапаміцину, відомого в клініці як сіролімус (16,25–27).

mTORC1 регулює синтез білка та функціонує як сенсор наявності поживних речовин, АТФ, окисно-відновного стану клітини. mTORC2 функціонує в якості важливого регулятора актинового цитоскелета через стимуляцію стресових волокон F-актину, паксилліну, Cdc42 і протеїнкінази Ca (PKCa). mTORC2 також фосфорилує Akt у ділянці Ser473, таким чином, впливаючи на метаболізм і виживання клітини (15,28–33).

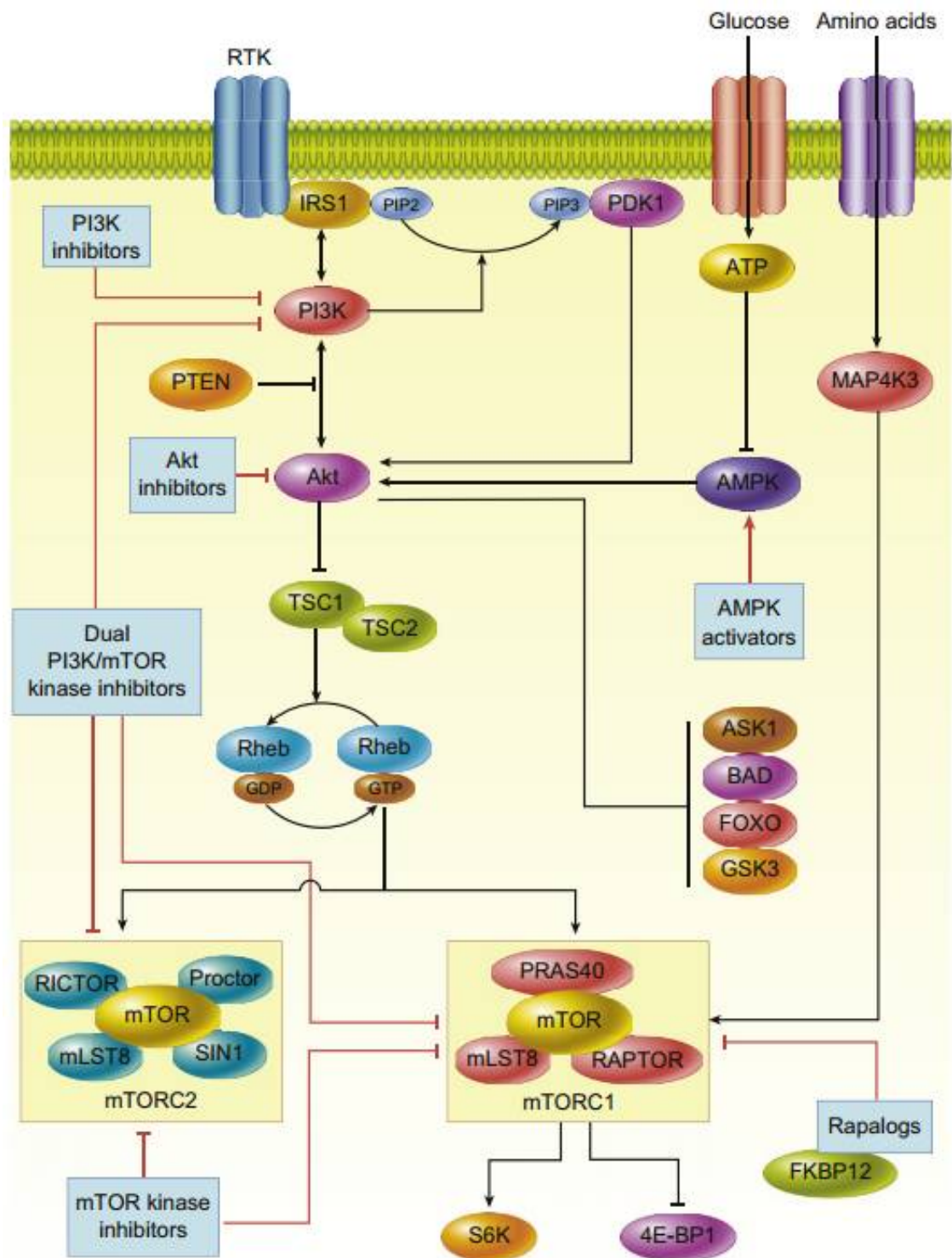
Кіназа рибосомного білка S6 (S6K) та зв'язувальний білок еукаріотичного фактору ініціації трансляції eIF4E (4EBP) є першими з ідентифікованих субстратів mTOR. mTOR-залежне фосфорилування 4EBP призводить до його дисоціації від фактору ініціації трансляції eIF4E, що в свою чергу сприяє утворенню активного комплексу ініціації трансляції і відповідно ініціації кеп-залежної трансляції мРНК. Одночасно mTOR-залежне фосфорилування S6K є абсолютно необхідним фактором активації кінази, яка в свою чергу фосфорилує низку мішеней, багато з яких напряму залучені до функціонування системи біосинтезу білка. Крім того, S6K є важливим механізмом зворотнього негативного зв'язку, адже вона фосфорилує та пригнічує активність субстрату інсулінового рецептору (IRS) та mTORC2 (10,34–36).

Узагальнена схема mTOR/S6K1 сигнальної мережі представлена на рисунку 1.1.

Порушеннями в функціонуванні mTOR-залежного сигнального каскаду супроводжується ціла низка патологій, серед яких найбільш розповсюдженими є онкологічні захворювання, метаболічні розлади (діабет I та II типів), серцево-судинні захворювання та інші. Саме тому компоненти зазначеного сигнального шляху розглядаються як перспективні мішені для терапії цих хвороб (37,38).

Отже, mTOR/S6K1 сигнальний каскад представляє собою складну розгалужену систему передачі сигналу від гормонів, ростових факторів та амінокислот всередину клітини. Кожного року дані про білки-партнери та мішені

кіназ mTOR та S6K1 доповнюються, тому загальні уявлення про цей сигнальний шлях потребують подальших досліджень та аналізу.



**Рис. 1.1.** Схематичне зображення передачі сигналу за участі PI3K/mTOR/S6K1 сигнального шляху, адаптовано до (39)

## 1.2. Будова та функції кінази рибосомного білка S6 (S6K1)

Кіназа рибосомного білка S6 (S6K) – серин-треонінова протеїнкіназа, яка каталізує реакцію перенесення  $\gamma$ -фосфатної групи АТФ на ОН-групу серину її субстратів при наявності консенсусної послідовності Арг-Х-Арг-Х-Х-Сер (де Х будь-яка амінокислота) (40).

S6K була вперше виділена з культивованих клітин ссавців у кінці 1980-х на початку 1990-х років. Тоді ж був встановлений зв'язок активації S6K із рівнем фосфорилування рибосомного білка S6 та синтезом білка. Ранні дослідження із використанням нокаутуваних мишей та мух *Drosophila melanogaster* показали, що відсутність експресії S6K призводить до зменшення розміру організмів, внаслідок пропорціонального зменшення розміру органів та клітин. Для нокаутуваних мишей була характерна поява ознак діабету II типу, що пояснювалось зменшенням розміру  $\beta$ -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози і викликаною цим гіпоінсуліноемією. У нокаутуваних мух спостерігався значний рівень летальності на ранніх етапах розвитку, знижена життєздатність, стерильність самиць. Фосфорилування рибосомного білка S6 також не було виявлене. На відміну від *Drosophila melanogaster* у нокаутуваних мишей спостерігався певний рівень фосфорилування грS6. Це викликало припущення про наявність іншої форми S6K (41). У 1998 році була виділена S6K2, яка не впливає на розмір клітин, але також залучена до процесу фосфорилування грS6 у ссавців (42). Пізніше S6K1 та S6K2 було віднесено до AGC родини протеїнкіназ за подібністю каталітичних доменів. Подальші дослідження S6K дозволили встановити будову та деякі функції даного ферменту.

Активність кіназ S6K1 та S6K2 регулюється фосфорилуванням та дефосфорилуванням, що відбувається у відповідь на різноманітні позаклітинні стимули (43). Обробка клітин факторами росту, цитокінами і гормонами, призводить до швидкої активації кіназ S6K, в той же час інгібітори росту, такі як стероїди і TGF $\beta$ , пригнічують їхню активність. Сигналінг, опосередкований R13K

та mTOR сигнальними шляхами, індукований факторами росту або поживними речовинами, відповідно, є ключовою подією в процесі активації кіназ білка S6 (44–46).

На сьогодні описано більше двадцяти субстратів для S6K, проте лише для деяких з них докладно охарактеризовано функціональні зв'язки (43).

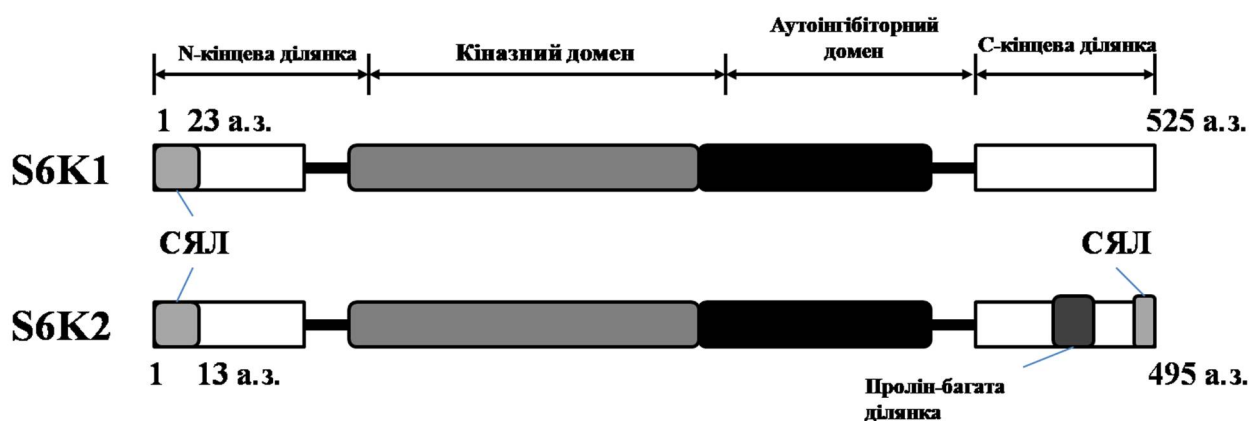
Встановлено цілу низку партнерів S6 кіназ, що залучені до регуляції їхньої активності. Серед них: малі GTPази Rac1 і cdc42, протеїнкінази PDK1 і PKC $\gamma$ , протеїнфосфатази PP2A, PP1, білок цитоскелету нейрабін та інші (43,47–49).

Наразі відомо, що у клітинах ссавців експресується дві високогомологічні форми S6K, а саме S6K1 та S6K2. Обидві кінази складаються із чотирьох консервативних структурних доменів: N-кінцевого, каталітичного, лінкерного, аутоінгібіторного. Для S6K2 характерна наявність пролінзбагаченого регіону на C-кінці молекули, що вказує на можливість взаємодії S6K2 із SH3-вмісними білками (50,51).

Узагальнена схема доменної будови кіназ S6K1 та S6K2 представлена на рисунку 1.2.

S6K1 та S6K2 кодуються двома різними генами (*RPS6KB1* та *RPS6KB2*), розташованими на 17 та 11 хромосомах відповідно. У людини обидва гени кодують коротку та довгу сплайсові ізоформи кіназ S6 (p70S6K1 і p85S6K1, p54S6K2 та p60S6K2), які утворюються в результаті використання альтернативних стартів трансляції мРНК (52). Кожна з довгих форм несе сигнал ядерної локалізації (СЯЛ) на N-кінці молекули. Відповідно для S6K1 та S6K2 СЯЛ становить 23 і 13 амінокислотних залишків. Дані сиквенсу були підтверджені імуноцитохімічно на культурі трансфікованих клітин ссавців, що надекспресували S6K: p70S6K1 виявлена у цитоплазмі, тоді як p85S6K1 має переважно ядерну локалізацію (52). Однак подальші дослідження внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у низці нормальних та злоякіснотрансформованих тканин людини отримали суперечливі дані щодо ядерно-цитоплазматичного розташування даної кінази. Тому питання субклітинної локалізації S6K1 потребує подальших досліджень.





**Рис. 1.2.** Доменна структура протеїнкіназ S6K1 та S6K2

На відміну від S6K1, обидві форми S6K2 можуть локалізуватись у ядрі. За даними доступної літератури це явище пояснюється присутністю СЯЛ у р54S6K2 і р60S6K2 на С-кінці молекули. Також було встановлено, що фосфорилування Ser486 р54S6K2 протеїнкіназою С пригнічує функціональну активність СЯЛ і призводить до накопичення р54S6K2 у цитоплазмі (53). Можна припустити, що таким чином здійснюється регуляція проведення позаклітинного сигналу в ядро клітини. Нещодавні дослідження виявили, що поява ядерної локалізації даних кіназ має місце при дедиференціюванні тиреоцитів щитовидної залози щурів (54,55).

Функція ядерних ізоформ на сьогодні достеменно не відома. Вважається, що р85S6K1 може бути відповідальною за фосфорилування хроматин-зв'язаного S6 білка та ініціацію біогенезу рибосом (56–58). Відтак, відкриття нових ядерних субстратів S6K значно розширить уявлення про функції кіназ білка S6 у ядрі.

Показано, що S6K2, але не S6K1, частково локалізована у перицентросомній ділянці впродовж клітинного циклу (59).

Наявність незначної відмінності у будові S6K1 та S6K2 і їх локалізації у клітині може вказувати на те, що, крім спільних функцій, роль кіназ у регуляції внутрішньоклітинних процесів може відрізнятись.

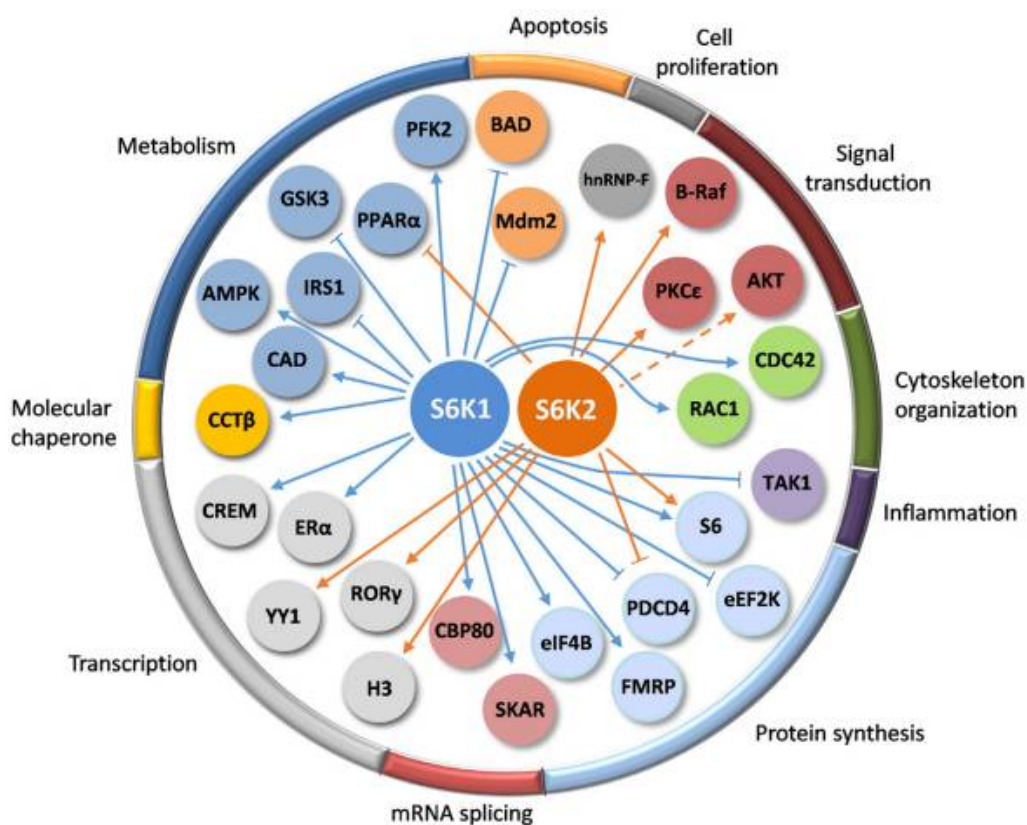
Незважаючи на високу гомологію S6K1 та S6K2, припускається, що дані кінази виконують неоднакові функції у клітинах ссавців. Отримання нокаутів S6K1<sup>-/-</sup> та S6K2<sup>-/-</sup> мишей дозволило встановити, що S6K1 відіграє важливу роль у регуляції розміру клітини, тоді як втрата S6K2 не призводить до значних змін метаболізму і морфології організмів. Наразі детальніше вивчені функції S6K1, роль S6K2 уточнюється (60).

До субстратів S6K належать як цитоплазматичні, так і ядерні білки (Рис. 1.3). Детально дослідженою мішенню S6K є білок S6 малої субодиниці еукаріотичної рибосоми. Фосфорилування рpS6 корелює із підвищенням рівня синтезу білка у клітині. Фосфорильовані форми рpS6 знаходять як у цитоплазмі, так і в ядрі. S6K фосфорилують п'ять залишків серину, які знаходяться на С-кінці молекули рpS6, а саме Сер235, Сер236, Сер240, Сер 244, Сер247. Встановлено, що для повного фосфорилування рpS6 необхідні обидві кінази S6K1 і S6K2. При їх відсутності у нокаутів мишей спостерігався незначний рівень фосфорилування білка S6 по залишках Сер235 та Сер236 МАРК-залежною кіназою (61–63). На підставі того, що рpS6 локалізується у сайті зв'язування малої субодиниці рибосоми з іРНК, припускається, що фосфорилування рpS6 кіназою S6K впливає на регуляцію трансляції та процес формування полісом (40).

Крім того, виявлено, що S6K1 бере участь у регуляції біосинтезу білка шляхом фосфорилування фактора ініціації трансляції еукаріот 4В (eIF4В). Фосфорильований eIF4В приєднується до гелікази eIF4А та підвищує її процесивність (64).

За даними літератури S6K1 переносить фосфатну групу на Сер366 у молекулі кінази еукаріотичного фактора елонгації трансляції 2 (eEF2К). Дана кіназа пригнічує приєднання eEF2 до рибосоми. При фосфорилуванні S6 кіназою eEF2К втрачає свою активність. Як наслідок, eEF2 забезпечує транслокацію рибосоми, а отже – елонгацію трансляції (10).

Узагальнюючи наведені вище дані, необхідно вказати, що S6K1 є важливою ланкою регуляції біосинтезу білка на рівні ініціації та елонгації трансляції, а також сприяє утворенню полісом.



**Рис. 1.3.** Схематичне зображення білкових мішеней S6K1 та S6K2, які залучені у процесах регуляції апоптозу, проліферації клітин, синтезу та фолдингу білків тощо, адаптовано до (10)

Низкою досліджень встановлено, що S6K1 бере участь у регуляції білкового синтезу також на рівні сплайсингу іРНК. Одним із ядерних субстратів S6K1 є білок SKAR (Aly/REF-подібна мішень S6 кінази). Він належить до родини Aly/REF РНК зв'язувальних білків та залучений до процесів транскрипції, сплайсингу пре-іРНК, експорту РНК з ядра. Наразі відомо, що S6K1, а не S6K2, фосфорилує SKAR по залишках Сер383 і Сер385 при стимуляції інсуліном.

Інгібування SKAR за допомогою si-РНК призводить до зменшення розміру клітин, що також спостерігається у S6K1-/- мишей (65).

Ще одним ядерним субстратом S6K1 є СВР 80. СВР80 – одна із субодиниць ядерного CAP-зв'язуючого комплексу. Регуляторна роль фосфорилування СВР80 S6 кіназою залишається нез'ясованою (66,67).

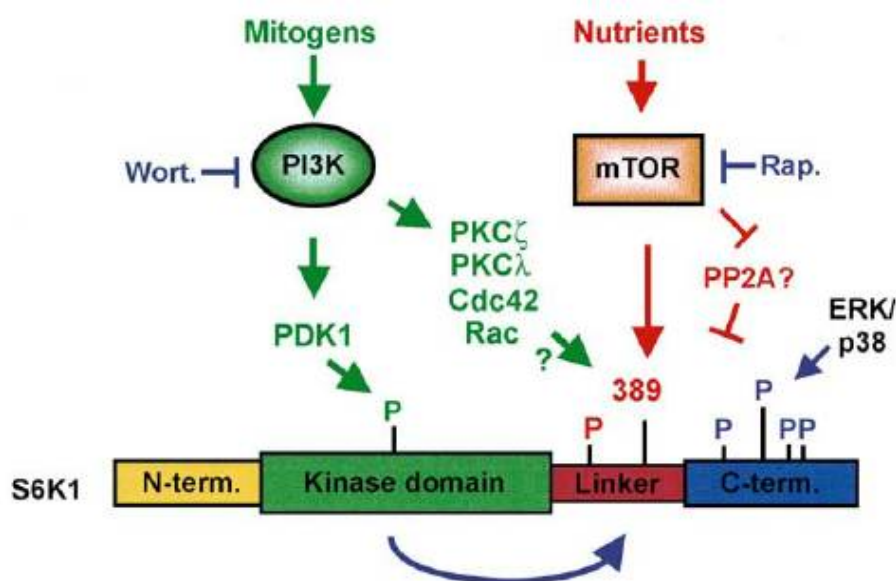
CREM $\tau$  (модулятор цАМФ-залежного елемента) належить до ZIP родини транскрипційних факторів і залучений до регуляції експресії цАМФ-залежних генів. Він активується аденілатциклазними сигнальними шляхами і модулює транскрипцію генів, зв'язуючись із цАМФ-залежним елементом CRE. Точно відомо, що CREM  $\tau$  є субстратом для S6K, але роль, яку відіграє його фосфорилування у регуляції транскрипції цАМФ-залежних генів досі до кінця не зрозуміла (68).

Низка праць вказує, що S6K1 необхідна для транскрипції генів рРНК та рибосомальних білків. Так, додавання екзогенної S6K1 активувало РНК полімеразу I за умов *in vitro*. Було показано, що експресія S6K1 активує транскрипцію рРНК, коли інші шляхи активації заблоковано. Механізм впливу S6K1 на транскрипцію генів рРНК потребує подальших досліджень. Отже, при активації, S6K1 здатна залучатися до синтезу нових рибосом (69–71).

Ліпополісахарид-індукована активація фосфоліпази D1 опосередковується Толл-подібним рецептором 4 (TLR4) та білком, що передає від нього сигнал усередину клітини – Myd88. І ця активація є вирішальною для експресії і продукції фактору некрозу пухлин  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) за допомогою активації S6K1/JNK/c-Jun сигнального шляху у клітинах Raw 264.7. Виходячи з цього, S6K1 залучено у процеси запалення та некрозу пухлин.

Кожного року додаються нові відомості про мішені S6K1, що дозволяє припускати, що S6K1 сигналінг залишається вивченим неповністю.

Регуляція активності S6K1 здійснюється за допомогою 8 виявлених сайтів фосфорилування, що регулюються mTOR та низкою інших кіназ. Так відомими на сьогодні активаторами, окрім mTOR є PDK1 та фосфоліпаза D1 (PLD1), а інгібіторами – фосфатази PHLPP2 і PP2A (рис. 1.4).



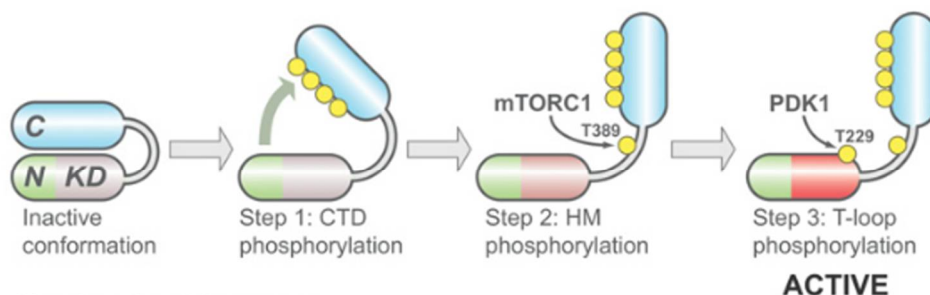
**Рис. 1.4.** Активація S6K1 ефекторами з PI3K та mTOR-сигнальних шляхів, адаптовано до (72)

Активація S6K1 відбувається за рахунок фосфорилювання чотирьох серинових залишків на С-кінцевому домені: серин 411, серин 418, серин 421 та серин 424. Цей процес призводить до відкриття внутрішньої ділянки білка, дозволяючи mTOR фосфорилювати треонін 389, що супроводжується фосфорилюванням треонін 229 кіназою PDK1. Також було зареєстровано фосфорилювання серин 317 та треонін 404, хоча наразі невідомо, які кінازی його забезпечують (73–76).

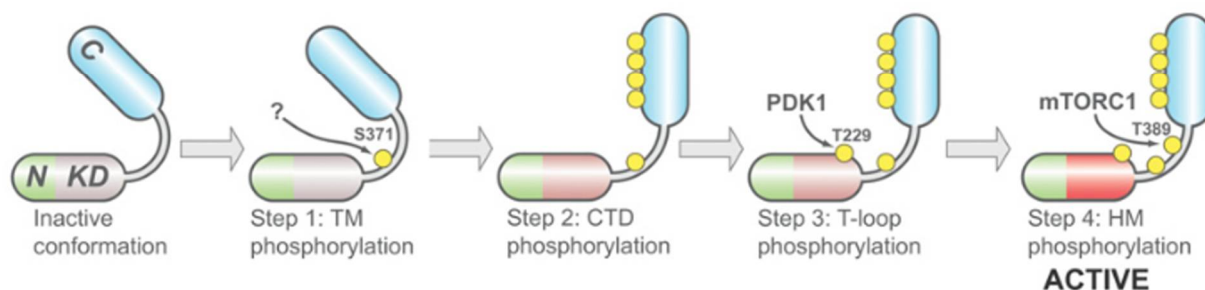
Активація мітогенами ізоформи p70S6K1 веде до підвищення трансляції РНК, що кодують компоненти синтетичного апарату білків. Активація кінازی здійснюється за допомогою поступового фосфорилювання у сайтах, що призводить до фосфорилювання треоніну 229 каталітичного домену. Гомологічний сайт знаходиться у протеїнкіназі В – треонін 308, який фосфорилюється за допомогою PDK1. Отже, була знайдена ланка між ізоформою p70S6K1 та РКВ, яка залучена у процесі контролю апоптозу, клітинного циклу, ангіогенезу тощо (77,78).

На сьогоднішній день існує дві важливі гіпотези щодо механізму активації S6K1, а саме загальноприйнята та альтернативна (рис. 1.5).

### A. Model 1: Conventional



### B. Model 2: Alternate



**Рис. 1.5.** Схематичне зображення двох можливих механізмів активації протеїнкінази S6K шляхом фосфорилування, адаптовано до (34)

Обидві гіпотези стверджують, що неактивна S6K знаходиться у закритій конформації, в якій N кінець молекули взаємодіє з C-термінальною ділянкою, що призводить до екранування кіназного домену.

Так звана загальноприйнята гіпотеза стверджує, що на першому етапі відбувається фосфорилування C-кінця молекули, що призводить до зміни конформації та доступності інших сайтів S6K. Припускають, що наступним відбувається фосфорилування треоніну 389 у лінкерному домені, а потім – треоніну 229 у кіназному домені, що призводить до повної активації кінази. Однак, визначити точну послідовність цих двох подій важко, так як обидва сайти є важливими для активації S6K (34).

Альтернативна гіпотеза припускає, що першою подією в активації S6K є фосфорилування треоніну 371 у лінкерній ділянці молекули. Однак, цей сайт наразі слабо досліджений, а кіназа, яка відповідає за його фосфорилування точно невідома. Далі фосфорилування відбувається подібно до загальноприйнятої моделі, тільки закінчує процес фосфорилування треоніну 389 mTORC1, що стабілізує активну конформацію S6K (34).

Білкові фосфатази грають важливу роль у дефосфорилуванні кіназ рибосомального білка S6. Дослідження показали, що PP2A залучена у інгібування S6K1. Це відбувається за рахунок процесів дефосфорилування і веде до інактивації кінази. Інші дані показують роль домену PHLPP2, збагаченого лейцином, у дефосфорилуванні S6K1, що інгібує клітинний ріст та білковий синтез (79–83).

Отже, протеїнкіназа S6K1 залучена до регуляції широкого спектру процесів у клітині. Раніше вважали, що основними функціями S6K1 є фосфорилування рибосомального білка S6 і таким чином підвищення рівня біосинтезу білка, утворення полісом та вплив на ріст і розмір клітин. Однак, сучасні дослідження вказують на те, що S6K1 має ряд цитоплазматичних та ядерних субстратів, які беруть участь у регуляції метаболізму, сплайсингу іРНК, транскрипції, поділі та реорганізації цитоскелету. Тому актуальним завданням на сьогодні залишається ідентифікація нових мішеней S6K1 та встановлення механізму регуляції цих процесів у клітині. Одним із таких механізмів може бути наявність низки різних ізоформ S6K1 у клітинах ссавців.

### **1.3. Множинність ізоформ S6K1 у клітинах людини**

Наразі відомо, що у клітинах ссавців експресуються декілька ізоформ S6K1, а саме: p85S6K1, p70S6K1, p31S6K1 та майже не досліджена p60S6K1 (рис. 1.6).

Протеїнкіназа S6K1 кодується геном *RPS6KB1*, який розташований в межах 17-ої хромосоми у людини. Використання альтернативного старту трансляції іРНК призводить до утворення двох довгих ізоформ, р85S6K1 та р70S6K1, які є найбільш повно вивченими на сьогоднішній день.



**Рис. 1.6.** Доменна структура ізоформ S6K1

р85S6K1 складається з 525 а.з. (амінокислотних залишків) та має молекулярну масу приблизно 85 кДа. N-кінець молекули містить подовження з 23-х а.з., яке відсутнє в р70S6K1. До складу цього подовження входить сигнал ядерної локалізації (СЯЛ), а також аргінін-збагачена ділянка. Раніше вважалось, що р85S6K1 є виключно ядерною формою протеїнкінази S6K1, однак нові дослідження із використанням клітинного фракціонування показали, що р85S6K1 локалізується у цитоплазмі нормальних фібробластів людини (12). Цікаво, що імунофлуоресцентний аналіз із використанням моноклональних та поліклональних антитіл проти унікальної N-кінцевої ділянки р85S6K1 детектує виключно ядерне розташування даної ізоформи у клітинах лінії MCF-7, HEK293, що може вказувати на вплив умов фіксування та аналізу або на специфічні особливості різних типів клітин (84). Більш того, у 2018 році було виявлено, що аргінін-збагачена ділянка р85S6K1 відповідає за секрецію даної ізоформи поза



межі клітин, що може відігравати важливу роль у ремоделюванні пухлинними клітинами їх мікрооточення (85).

Наразі найбільш вивченою ізоформою S6K1 є p70S6K1, яка містить у своєму складі 502 амінокислоти та має молекулярну масу близько 70 кДа. Дана ізоформа є домінантною у більшості типів клітин ссавців та експресується найбільше, порівняно з іншими ізоформами S6K1. Незважаючи на те, що p70S6K1 не містить СЯЛ чи інших сигнальних мотивів, низка досліджень вказує, що p70S6K1 може локалізуватись як у цитоплазмі, так і в ядрі клітин (86).

Так, було показано, що стимуляція ростовими факторами призводить до переміщення p70S6K1 до ядра клітин фібробластів миші лінії NIH3T3. При голодуванні p70S6K1 навпаки розташовувалась у цитоплазмі клітин. Пізніше було показано, що за експорт p70S6K1 із ядра до цитоплазми відповідає фосфорилування сайту серин 17 протеїнкіназою СК2 (87). Однак, точний механізм регуляції внутрішньоклітинної локалізації p70S6K1 досі не вивчено повністю.

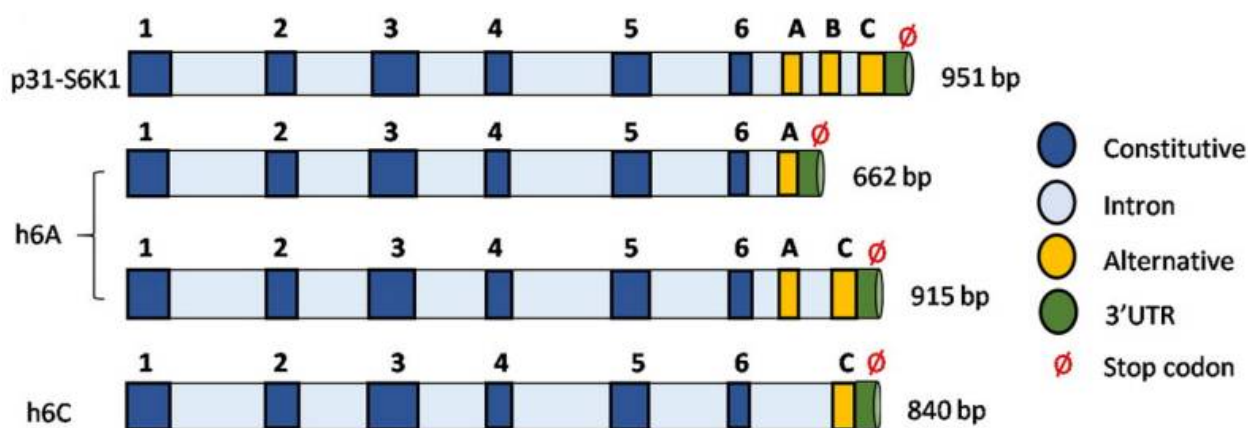
Аналіз мутантних форм p70S6K1 із дефектними сайтами фосфорилування показав, що фосфорилування p70S6K1 у сайті треонін 389 є важливим регулятором її ядерного розташування. Дійсно, активація протеїнкінази mTOR, яка відповідає за фосфорилування цього сайту, у TSC2<sup>-/-</sup> фібробластах призводила до накопичення p70S6K1 у ядрах таких клітин.

Цікавим механізмом регуляції внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 є її взаємодія з білком нейрабіном у нервовій тканині. Було встановлено, що нейрабін приєднується до С-кінця S6K1 та рекрутує кіназу до цитоскелетних арок у синапсах нейронів. У S6K1<sup>-/-</sup> мишей спостерігалися порушення когнітивних функцій та пам'яті. Припускають, що це може бути пов'язано із фосфорилуванням S6K1 білка fragile X mental retardation protein (FMRP) (88).

Субклітинна локалізація ізоформ S6K1 також може бути пов'язана з фазами клітинного циклу, у яких перебуває клітина. Ізоформа p70S6K1 може знаходитись у цитоплазмі протягом усіх фаз, а її ядерна локалізація залежить від патерну фосфорилування, наявності ростових факторів та спостерігається у

середині фази G1. Однак дане спостереження потребує подальших досліджень, а механізми регуляції розташування ізоформ S6K1 у різних фазах клітинного циклу ще не повністю зрозумілі (12).

Сучасні дослідження встановили наявність коротших ізоформ S6K1, які виникають при альтернативному сплайсингу та мають меншу довжину кіназного домену: p31S6K1, h6A та h6C (рис. 1.7).



**Рис. 1.7.** Мінорні ізоформи S6K1, що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу, адаптовано до (10)

У клітинах мишей, за рахунок процесів альтернативного сплайсингу додаються 3 екзони, названі А, В і С, між 6 та 7 екзоном мРНК S6K1. У складі екзону С є стоп-кодон, саме за рахунок цього утворюється ізоформа p31S6K1. У клітинах людей екзони А та С можуть бути сплайсовані разом або поодиноці. Так, як вони мають стоп кодон, це веде до утворення коротших ізоформ, названих h6A та h6C. Було показано, що обидві ізоформи h6A та h6C, разом з p31S6K1 експресуються у клітинах раку молочної залози. Зниження кількості h6A та h6C призводило до зменшення рівня клітинної проліферації (89,90).

Подальші дослідження показали, що ізоформа p31S6K1 має онкогенні властивості та часто надекспресується у клітинних лініях раку молочної залози та сечового міхура. Надекспресія білка SF2/ASF, який регулює альтернативний

сплайсинг S6K1, призводила до збільшення вмісту p31S6K1 у клітинах та злоякісної трансформації цих клітин за умов *in vitro* та *in vivo*. У таких клітин значно збільшувався рівень проліферації, а також виживаності після голодування та стресу. Однак, яким саме чином p31S6K1 залучена до регуляції цих процесів залишається невідомим. Фракціонування клітин показало, що p31S6K1 локалізується у ядрі в клітинній лінії нормальних фібробластів людини IMR-90. Щоб дізнатись, чи правдиво це і для інших клітинних ліній необхідні подальші дослідження (12,91).

Найменш вивченою на сьогоднішній день є ізоформа p60S6K1. Вперше вона була описана у 2009 році за допомогою антитіл проти С-кінця S6K1. Однак, було не докінця зрозуміло: це повноцінна ізоформа чи продукт протеолітичної деградації. Дослідження у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України дозволили встановити, що p60S6K1 є продуктом альтернативної трансляції іРНК S6K1 з використанням третього старту трансляції, внаслідок чого p60S6K1 має вкорочений N-кінцевий домен (92,93).

Більш того, експресія лише p60S6K1 у клітинах лінії НЕК 293 призводила до збільшення виживаності та швидкості міграції цих клітин за умов *in vitro* (92). Однак, фізіологічна роль даної ізоформи залишається нез'ясованою та потребує подальших досліджень. Також актуальним є створення модельних клітин та організмів для вивчення функцій різних форм S6K1, а особливо p60S6K1, та їх ролі у злоякісній трансформації клітин.

#### **1.4. Участь mTOR/S6K1 сигнального каскаду у розвитку злоякісних новоутворень людини**

За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я, онкологічні захворювання посідають друге місце серед причин людської смертності після серцево-судинних. З року в рік їхня кількість зростає, зокрема, внаслідок збільшення населення Землі і його старіння, а також поширення таких чинників

ризиком, як куріння, надмірна вага, низька фізична активність, несприятливий екологічний стан і зміна репродуктивних моделей, пов'язаних з урбанізацією. Згідно даних проекту GLOBOCAN Міжнародного центру досліджень ракових захворювань, у 2012 році було виявлено 14,1 мільйонів нових випадків розвитку раку та 8,2 мільйонів смертей унаслідок цієї хвороби (94).

В Україні за даними Національного канцер-реєстру у 2015 році було зареєстровано 136 225 нових випадків захворювання на злоякісні новоутворення (ЗН). При цьому загальний показник поширення ЗН складав 375,7 на 100 тис. населення, в тому числі 389,9 у чоловіків та 363,4 у жінок. Найбільшу питому вагу в структурі онкологічної захворюваності чоловічого населення України мали ЗН легені, передміхурової залози, шкіри, шлунка та товстої кишки (разом 56,4%), у жінок – ЗН молочної залози, шкіри, тіла та шийки матки і колоректальний рак (59,9%) (95).

Сучасні дослідження вказують на те, що рак – це група захворювань, які характеризуються аномальним клітинним ростом, внаслідок якого клітини можуть набувати потенціалу до поширення з місця виникнення (первинна пухлина) до інших ділянок тіла (вторинні пухлини або метастази). За здатністю до поширення і метастазування новоутворення поділяють на доброякісні та злоякісні. Доброякісні пухлини зазвичай інкапсульовані і не здатні до інвазії в оточуючі тканини, а їх клітини в цілому є високодиференційованими і нагадують тканину, з якої вони походять. Злоякісні новоутворення характеризуються низькою диференціацією клітин і здатністю до міграції та утворення метастазів (96).

Спільною рисою усіх онкологічних захворювань є наявність в клітинах ряду мутацій, які забезпечують їм селективну перевагу перед нормальними клітинами. Низка досліджень встановила, що ракові клітини характеризуються моноклональним ростом, тобто походять від однієї клітини-попередника. Наприклад, такий тип росту був достовірно показаний для лейоміом і мієлом. Однак, сучасні дані вказують на те, що раковим клітинам властива висока генетична та фенотипова нестабільність. Тобто, окремі клітини всередині

пухлини можуть набувати нових мутацій протягом онкогенезу і спричиняти високу гетерогенність клітинної популяції новоутворення. Результуюча генетична гетерогенність може маскувати початковий моноклональний ріст пухлини (97).

У 2000 році D. Hanahan і R. Weinberg, базуючись на відкриттях молекулярної біології і генетики, запропонували 6 основних ознак злякиснотрансформованих клітин. А саме: самодостатність у виробленні сигналів росту, нечутливість до сигналів-інгібіторів росту, ухилення від запрограмованої клітинної смерті (апоптозу), необмежений реплікативний потенціал, підтримуваний ангиогенез, здатність до інвазії в тканини і метастазування (98). Даний огляд був позитивно прийнятий науковою спільнотою і розширив знання про природу онкогенезу. У 2011 році до вже існуючих ознак раку було додано 4 нових: порушений метаболізм, уникнення дії імунної системи, нестабільність генома, запалення (99).

Отже, наразі вважається, що новоутворення – це група захворювань, які мають низку спільних ознак, характеризуються аномальним ростом і високою геномною нестабільністю. Незважаючи на велику кількість робіт за даною тематикою, молекулярні та клітинні механізми онкогенезу залишаються слабо зрозумілими і потребують подальших досліджень.

Порушеннями в функціонуванні mTOR-залежного сигнального шляху супроводжується ціла низка патологій серед яких найбільш розповсюдженими є онкологічні захворювання, метаболічні розлади (діабет I та II типів), серцево-судинні захворювання та інші. Саме тому компоненти зазначеного сигнального шляху розглядаються як перспективні мішені для терапії цих захворювань (52,53).

Крім того, низка компонентів PI3K/mTOR-залежного сигнального каскаду піддаються мутаціям, які призводять до канцерогенезу. Онкогенетична активація mTOR сигналінгу індукує декілька процесів, потрібних для росту, виживання і проліферації ракових клітин (54).

Наприклад, порушення білкового синтезу на рівні субстратів mTORC1, а саме 4E-BP1 та eIF4E, грає центральну роль у формуванні пухлин. Втрата 4E-BP1/2 та одночасна активація кеп-залежної трансляції підвищує прогресію клітинного циклу і розмноження клітин в культурі. Вважається, що eIF4E впливає на утворення пухлин та клітинну проліферацію шляхом підвищення трансляції специфічних мРНК, що кодують про-онкогенні протеїни. До того ж, підвищення синтезу рибосом, що пов'язано з активацією mTOR, стимулює клітинну проліферацію шляхом підтримання клітинного росту на високому рівні (100).

Крім того, залишається актуальним вивчення функцій S6K при злоякісній трансформації клітин, оскільки надекспресія обох форм цієї кінази, як і її ефektorів, має місце у клітинах пухлин різного походження. Так, ампліфікація гену 17q23, який кодує S6K1, виявлена у пухлинах молочної та щитовидної залози, яєчника, ендометрія. Надекспресія S6K2 спостерігається при лейкемії, а також показана у культурах дрібноклітинного раку легень, пухлинах молочної залози (7,101,102). Більш того, було показано, що пригнічення S6K1 сигналіну запобігає міграції клітин раку молочної залози, що вказує на важливу роль S6K1 в процесі метастазування (103).

Зростання синтезу ліпідів *de novo* є відмінною ознакою ракових клітин, що розмножуються. Адже таким клітинам необхідно продукувати жирні кислоти для синтезу мембран. Надактивованій mTOR сигналінг прискорює активацію проліпогенетичного фактору SREBP1 і як наслідок призводить до збільшення синтезу ліпідів у злоякіснотрансформованих клітинах (104).

Підвищення рівня mTOR-залежного сигналіну, за рахунок активуючих мутацій або надмірної дії ростових факторів, пригнічує аутофагію. Як таке явище впливає на онкогенез наразі до кінця не вивчено. Показано, що аутофагія з одного боку може знижувати швидкість злоякісної трансформації, а з іншого навпаки стимулювати розвиток ракових клітин. Так, клітини з порушеною функцією аутофагії накопичують білкові агрегати, пошкоджені мітохондрії та радикали активного кисню. Все це підвищує рівень пошкодження ДНК та

спричинює пухлиноутворення. Але, з іншого боку, інгібування аутофагії може погіршити формування пухлин через зниження спроможності ракових клітин виживати в бідних на поживні речовини та енергію умовах. Отже, функція аутофагії, яка залежить від діяльності mTORC1, дуже специфічна і неоднозначна (105,106).

Дослідження виявили, що гліоми продукують у надлишку субодиницю комплексу mTORC2 – Rictor. Така надекспресія прискорює збір і активацію mTORC2 та надає раковим клітинам підвищений проліферативний та інвазійний потенціал (107,108). Усі ланки PI3K/mTOR-залежного сигнального шляху наразі розглядаються як потенційні мішені для протиракової терапії.

На сьогодні специфічний інгібітор протеїнкінази mTOR рапаміцин та його аналоги (рапалоги) проходять клінічні випробовування як імуносупресанти після трансплантації органів, для зменшення стенозу судин при операціях в кардіології, та для лікування раку нирок в онкології, тим самим підтверджуючи важливу роль зазначеного сигнального шляху в підтримці нормального фізіологічного стану організму в цілому (109).

**1.4.1. Роль mTOR/S6K сигнального ланцюга у регуляції процесу міграції пухлинних клітин.** Однією з найбільш загрозливих для організму стадій є метастазування, яке починається з проникнення ракових клітин через базальну мембрану. На цьому етапі новоутворення вважається злякисним. Відомо, що первинна пухлина призводить до смерті лише у 10% хворих, тоді як 90% смертельних випадків викликано метастазами (110). Так, показано, що більшість первинних карцином молочної залози не загрожують життю людини, що також пов'язано з відсутністю прямої загрози життю 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 (111). Тому дослідження причин та механізмів метастазування є необхідним для розуміння процесів канцерогенезу та вдосконалення протиракової терапії.

Розвиток метастазів – це клінічно важливий, останній крок прогресії пухлини. Метастаз – кінцевий продукт процесу, при якому генетична нестабільність пухлинних клітин, гетерогенність їх популяції, різноманітні взаємодії між пухлинними клітинами і їх мікрооточенням приводять до змін, які дозволяють злоякісній пухлині долати фізичні бар'єри враженого органу або тканини, розповсюджуватись і колонізувати віддалені органи. Метастазування – надзвичайно складний ряд молекулярно-клітинних і біохімічних процесів на генетичному та епігенетичному рівні, які супроводжуються дирегуляцією генів, зміною експресії та взаємодії білків та інших макромолекул (112).

Механізми, за якими mTOR/S6K сигнальний каскад регулює клітинну міграцію та процес метастазування залишаються до кінця не визначеними, однак низка робіт демонструють, що сигналінг через S6K1 контролює клітинну міграцію шляхом: а) реорганізації F-актину (формування ламеллоподій), б) формування фокальної адгезії (фосфорилування білків фокальної адгезії, таких як FAK (focal adhesion kinase), Paxillin та p130Cas, в) ремоделювання тканини через протеолітичне розщеплення позаклітинного матриксу через надрегуляцію MMP-9 та г) впливу на експресію та активність Rho (63). Крім того було показано, що актинові арки (кавеолін-збагачені цитоскелетні структури локалізовані на передньому краї мігруючих клітин) характеризуються підвищеним вмістом активованих mTOR, S6K1, PI3K, Akt1 та PDK1. Більш того, активація mTOR та S6K1 необхідна для формування актинових арок (64). Також було з'ясовано, що S6K1 та 4E-BP1 незалежно регулюють експресію та активність MMP-9 під час міграції злоякісних клітин (65). Раніше також зазначалося, що комплекси mTOR залучені до регуляції процесу клітинної міграції. Так mTORC1 розглядають як уже відомий регулятор пухлинного метастазування та ангиогенезу багатьох різновидів раку (63).

Здатність mTORC2 регулювати актинову мережу вважається залученою до контролю над клітинною міграцією. Низка досліджень демонструє, що однією з головних функцій TORC2 є перебудова актинового цитоскелету. Делеція TOR2 руйнує полярну організацію актинового цитоскелету клітин дріжджів і цей ефект



опосередковується RhoГТФ-азним шляхом (66). ПодібнодоTORC2 дріжджів, mTORC2 також контролює актиновий цитоскелет через Rho ГТФ-ази. Нокдаун генів mTOR, Rictor (mAVO3) і mLST8 (GβL) призводить до виникнення дефектних F-актинових волокон (стресових волокон або ламелоподій). Нокдаун mTORC2 запобігає фосфорилуванню паксиліну, білка, що у фосфорильованому стані локалізується і рекрутує інші сигнальні молекули у точках фокальної адгезії. Крім того, посередником такої дії mTORC2 слугує PKCα. Проте, молекулярний механізм, за яким mTORC2 опосередковує активацію Rho ГТФ-аз та цитоскелетні перебудови все ще мало досліджений (67).

Рапаміцин, інгібітор mTOR/S6K сигнального каскаду ефективно блокує клітинний ріст і рухливість численних пухлинних клітинних ліній, а також здатен інгібувати метастазування трансплантованих пухлин у різних мишачих моделях *in vivo* (67). З іншого боку слід зазначити, що mTORC1-опосередковані S6K1 і 4EBP1 сигнальні ланцюги пов'язані з езрин-залежною метастатичною поведінкою. Езрин – субстрат тирозинових кіназ, зв'язує молекули адгезії, такі як CD43, CD44 і ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1), і залучений до внутрішньоклітинної передачі сигналу, пов'язаної з клітинною міграцією та метастазуванням. Пригнічення експресії езрину за допомогою РНК-інтерференції або порушення його функції трансфекцією мутантним езрином-T567A призводить до зниження фосфорилування як S6K1, так і 4E-BP1 (68).

Також раніше було встановлено, що пригнічення рапаміцином IGF-I-стимульованої клітинної рухливості є наслідком інгібування mTOR-кіназної активності. Рапаміцин інгібує IGF1-індуковану реорганізацію F-актину та фосфорилування білків фокальної адгезії шляхом руйнування mTOR-raptor комплексу. Окрім того, інгібіторний ефект рапаміцину на пухлинний ріст і метастазування частково пов'язаний зі здатністю пухлинних клітин блокувати синтез протопухлинних цитокінів (VEGF-АіTGF-β1) (69).

Отже наразі існує чимало свідчень про участь mTOR/S6K сигнального каскаду у регуляції міграції пухлинних клітин, проте залишається багато недосліджених аспектів цього питання.

**1.4.2. Участь mTOR/S6K сигнального каскаду в регуляції клітинного поділу та проліферації пухлинних клітин.** Окрім порушення локомоторних властивостей клітин, важливою характеристикою малігнізації є підвищення проліферативного потенціалу пухлинних клітин у порівнянні із нормальними. Літературні джерела свідчать про залучення mTOR/S6K сигнального каскаду до механізму регуляції мітотичної активності клітин. Так, експериментально показано, що високий вміст S6K1 спостерігається у М фазі клітинного циклу, а S6K2 – у G2 та М фазах (70). Підвищений вміст S6K1 виявлений у проліферуючих клітинах ліній раку прямої кишки LoVo, SW480, CaCO2, CaRI, DLD-1, COLO205.

Непряме інгібування S6K призводить до зупинки клітинного клітинного циклу в G1 періоді. Окрім того, було виявлено додатковий субстрат S6K1 – шаперонін вмісний мультисубодиничний комплекс TCP-1, що відповідає за фолдинг білка в еукаріотичних клітинах. TCP-1 залучений до фолдингу актину, тубуліну і таких регуляторів клітинного циклу як циклін E, cdc20, polo-like kinase 1 (PLK1). Отже, TCP-1 відіграє істотну роль у регуляції клітинного поділу та організації цитоскелету. S6K1 разом з RSK фосфорилує субодиницю бета TCP-1 за сайтом Ser-260, що призводить до активації даного комплексу (71). Окрім того, існують припущення про подібність функціонування кінази mTOR та низки мітоз-регулюючих кіназ при проходженні клітинного поділу. Недавні дослідження показали, що фосфо-mTOR (Ser2481) спів локалізований із хромосомними пасажирськими білками (chromosomal passenger proteins, CPP) під час цитокінезу. Виявлено, що фосфо-mTOR (Ser2481) та CPP INCENP та Aurora B перекриваються під час анафази, телофази та цитокінезу. Таким чином, було висунуто гіпотезу, що фосфорильований mTOR може поводитися як CPP-подібний білок у серединній перетяжці та у борозні розщеплення при клітинному поділі (72). Наведені дані свідчать про залучення mTOR/S6K сигнального каскаду до регуляції проліферації клітин ссавців та людини.

Отже, mTOR/S6K1 сигнальний каскад залучений до регуляції міграції та проліферації пухлинних клітин людини. Однак, остаточні молекулярні

механізми цієї регуляції залишаються неповністю зрозумілими, особливо з огляду на наявність низки ізоформ протеїнкінази S6K1 в клітинах. Дослідження ролі ізоформ S6K1 у локомоторній та проліфераційній активностях пухлинних та нормальних клітин дозволять розширити знання про функціонування mTOR/S6K1 сигнальної мережі та до підходів її специфічного інгібування у злоякіснотрансформованих клітинах.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та обладнання

Усі використані реагенти відповідали вимогам, прийнятим для застосованих методів.

В роботі використовували хімічні реактиви компаній “Sigma” (США), “Serva” (Німеччина), “NEB” (Великобританія), “Bio Rad” (США), “Amersham Pharmacia Biotech” (Швеція/Великобританія), “Difco” (США), “Fermentas” (Литва) або вітчизняні реактиви кваліфікації “х.ч.” і “ос.ч.”. Буферні системи та розчини готували на воді надвисокої очистки, звільненій від органічних та неорганічних домішок, отриманій з використанням сертифікованої системи очистки води виробництва “Millipore” (США). Контроль за рівнем рН здійснювали за допомогою цифрової вимірювальної системи з комбінованим водневим електродом точністю до 0,01 рН компанії “Beckman Coulter” (США).

В роботі було використано наступні буферні системи та розчини:

Фосфатний буфер PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, рН 7,4); буфер PBST (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, Tween-20 0,1%, рН 7,4); буфер для пригнічення аутофлуоресценції (CuSO<sub>4</sub> 10 mM, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 50 mM, рН 5,0); розчин акриламиду (акриламід 30%, біс акриламід 0,8%), тріс-гліциновий буфер для ПААГ (тріс 25 mM, гліцин 250 mM, SDS 0,1%); буфер для електропереносу білків (тріс 48 mM, гліцин 39 mM, SDS 0,03%, метанол 20%); 5x буфер Лемлі (тріс 200 mM, SDS 5%, гліцерол 50%, бромфеноловий синій 0,1%, дитіотреїтол 250 mM); середовище для заключення препаратів Mowiol 4-88 (“Sigma”, США) згідно рекомендацій виробника.

Середовища, антибіотики, трипсин та глютамін для культивування еукаріотичних клітинних ліній були виробництва компаній “Invitrogen”,

“HyClone” та “Lonza Xpress™” (США). Для роботи у стерильних умовах використовували вертикальний ламінарний бокс II класу захисту з HEPA фільтром виробництва “Nuairе” (США). Культивування проводили у CO<sub>2</sub>-інкубаторі “Nuairе” (США). Також, для проведення досліджень використовували автоклав настільний GSM 200 (Швейцарія). Для морфологічних досліджень культури клітин використовували інвертований мікроскоп CETI Versus (CETI, Бельгія) з можливістю використання ефекту фазового контрасту та люмінесцентний мікроскоп Leica DM 1000 (Німеччина), обладнаний цифровою фотокамерою Canon Power Shot S70 (Японія). Вивчення імунофлюоресценції та субклітинної локалізації проводили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss LSM510 (Німеччина).

Всі операції, пов'язані із приготуванням, зберіганням та транспортом хімічних речовин і розчинів здійснювали з використанням високочистого пластикового і скляного посуду, сертифікованого для роботи в біологічній лабораторії, кінчиків для піпеток одноразового використання, одноразових гумових рукавичок та автоматичних піпеток фірми «Eppendorf». Для роботи з культурами клітин використовували стерильний одноразовий посуд TPR (Швейцарія).

## 2.2. Методи роботи з білками

**2.2.1. Приготування екстракту клітин ссавців.** Клітини лінії MCF-7, які культивували на чашках Петрі, двічі промивали холодним PBS та екстрагували додаванням лізуючого буфера, що містив: 20 мМ тріс, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1% v/v Triton-X100, 5 мМ ЕДТА, 50 мМ фториду натрію, 1 мМ ортованадату натрію, коктейль інгібіторів протеаз виробництва “Roshe” (Німеччина) згідно рекомендацій виробника. Клітинні лізати інкубували 15 хв. на льоду та центрифугували при 13000 об/хв протягом 20 хв. за 4°C для видалення нерозчинних клітинних компонентів. Надосад відділяли та використовували в подальших дослідженнях. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд.

Перед нанесенням у поліакриламідний гель екстракти клітин інкубували протягом 5 хв за 95°C із буфером Лемлі (трис 200 мМ, SDS 5%, гліцерол 50%, бромфеноловий синій 0,1%, дитіотреїтол 250 мМ).

**2.2.2. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд.** Для визначення концентрації білка в екстрактах клітин застосовували колориметричний метод з використанням Coomassie Protein Reagent (“Pierce”, Франція). Метод базується на зміні довжини хвилі поглинання розчину кумасі діамантового блакитного G-250 з 465 на 595 нм, що відбувається при зв’язуванні з білком у кислому середовищі. До 0,5 мл Coomassie Protein Reagent додавали 0,5 мл дистильованої води та 3 мкл екстракту клітин з невідомою концентрацією білка. Після інкубації протягом 10 хв при кімнатній температурі вимірювали поглинання при 595 нм за допомогою спектрофотометра UV1101 Biotec Photometr (Велика Британія). Отримане значення порівнювали з кривою концентрації бичачого сироваткового альбуміну (БСА, “Pierce”, Франція).

**2.2.3. Електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі.** Аналіз клітинних білків проводили з використанням електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах з додаванням SDS за методом Лемлі. Композиції концентруючого та розділяючого гелів наведені у таблиці 2.1. Вибір концентрації акриламіду в нижньому розділяючому гелі залежав від молекулярної маси досліджуваних білків і становив від 8% до 12%. Після змішування компонентів гелю, розчин негайно вносили до електрофоретичних касет і залишали на 20 хв при кімнатній температурі для полімеризації. Нижній гель полімеризувався під шаром ізопропілового спирту. Після полімеризації спирт видаляли та промивали поверхню геля дистильованою водою. Далі заливали верхній гель, в якому формували лунки за допомогою тefлонової пластинки.

Екстракт клітин наносили у концентрації 20 мкг на лунку. У одну із лунок вносили суміш маркерних білків із відомою молекулярною масою “PageRuler Plus Prestained Protein Ladder” виробництва “ThermoFischer Scientific” (США). Електрофорез проводили при 4°C в електрофорезному буфері при фіксованій

силі струму 25 mA на 1 гель. Процес закінчували, коли фронт з барвником досягав кінця нижнього геля.

Таблиця 2.1.

### Композиція верхнього концентруючого гелю (5%)

Компоненти	Кількість (мл)
H <sub>2</sub> O	1,4
30% розчин акриламідю	0,33
1 М тріс, рН 6,8	0,25
10% розчин SDS	0,02
10% розчин персульфату амонію	0,02
TEMED	0,002

Таблиця 2.2.

### Композиція нижнього розділяючого гелю

Компоненти	Кількість (мл)		
	8%-й гель	10%-й гель	12%-й гель
H <sub>2</sub> O	4,6	4,0	3,3
30% розчин акриламідю	2,7	3,3	4,0
1 М тріс, рН 6,8	2,5	2,5	2,5
10% розчин SDS	0,1	0,1	0,1
10% розчин персульфату амонію	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,006	0,004	0,004

**2.2.4. Вестерн-блот аналіз.** Після електрофоретичного розділення білки з гелю переносили на полівініліденфторидну (PVDF) мембрану за допомогою напівсухого електроперенесення. Для цього PVDF мембрану відповідного розміру вимочували в метанолі протягом 3-5 хв., після чого її промивали у дистильованій воді та вимочували у буфері для електропереносу 5 хв.

Поліакриламідний гель з білками також калібрували у буфері для електропереносу протягом 5 хв. 4 шари фільтрувального паперу змочували у буфері, на них клали зволожену мембрану, на яку вміщували гель, і вкривали зверху 4-ма шарами змоченого фільтрувального паперу. Електроперенесення проводили протягом 1 год., використовуючи прилад для напівсухого переносу фірми “Bio-Rad” (США) за рекомендаціями виробника.

Після електроперенесення розділених білкових сумішей PVDF мембрану відмивали 5 хв. у PBS. Сайти неспецифічного зв'язування на мембрані блокували протягом 30 хв. у буфері PBST із додаванням 5% знежиреного сухого молока. У випадках аналізу фосфорильованих білків із відповідними фосфоспецифічними антитілами, неспецифічне зв'язування блокували із використанням зазначеного вище буферу та 5% БСА замість сухого молока. Після блокування мембрану інкубували у розчині первинних антитіл (1мкг/мл у PBST буфері) протягом ночі при 4°C. Після цього, мембрану відмивали три рази по 10 хв вказаним буфером та інкубували із видоспецифічними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому у відповідному розведенні протягом 1 год при кімнатній температурі. Детектування специфічного зв'язування вторинних антитіл проводили за допомогою реакції підвищеної хемолюмінісценції (ECL). Мембрану інкубували протягом 1 хв в розчині, який містив 100 мМ тріс-НСІ (рН 8,5), 0,02% люмінолу (“Sigma”, США), 0,004 % кумарової кислоти (“Sigma”, США) та 9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, загортали у поліетилен і експонували з рентгенівською плівкою фірми “Agfa” (США) або користувались приладом “ChemiDoc” (“BioRad”, США).

**2.2.5. Імунопреципітація білкових комплексів.** Мишачі моноклональні антитіла проти С-кінця кінази S6K1 інкубували з суспензією протеїн-А/G-агарози (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом ночі при 4°C. Після цього до зразків додавали білкові екстракти клітин лінії MCF-7 із розрахунку 1 мг тотального білка на зразок та інкубували протягом ночі при 4°C. У якості контролю протеїн-А/G-агарозу інкубували лише з антитілами або лише клітинними екстрактами. Імунні комплекси зв'язані із агарозою відмивали 4 рази



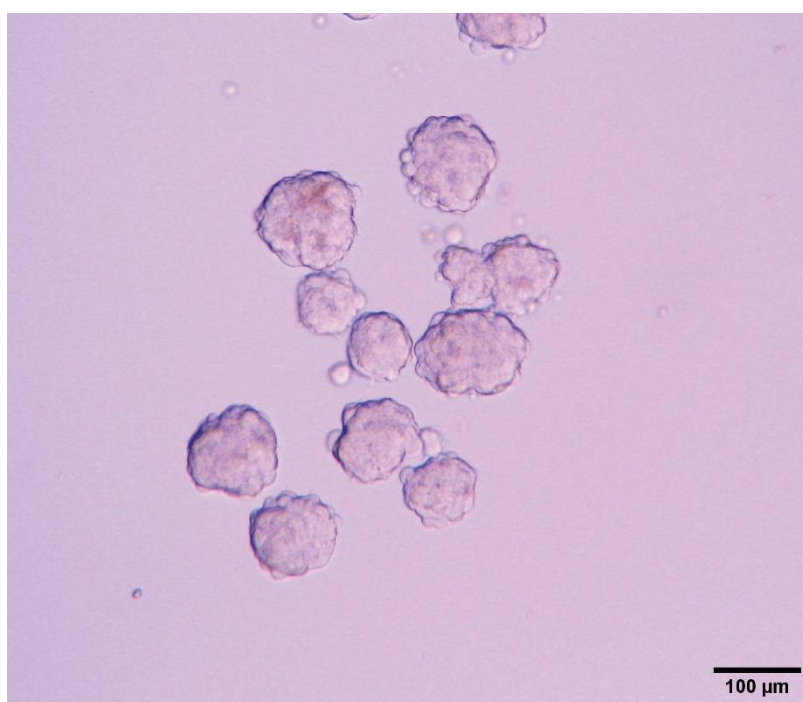
холодним буфером для лізису клітин і кип'ятили 5 хв у буфері Лемлі. Отримані таким чином зразки розділяли в 10% ПААГ та аналізували за допомогою методу імуноблоту. Для детекції протеїнкінази S6K1 використовували поліклональні кролячі антитіла проти С-кінця S6K1 у розведенні 1:3000 (отримані у нашій лабораторії). Для детекції транскрипційного фактору TBR2 мембрану інкубували з поліклональними кролячими антитілами проти TBR2 у розведенні 1:500 (#ab23345 Abcam, Велика Британія).

### **2.3. Методи роботи з культурами клітин ссавців**

**2.3.1. Культивування клітин.** У роботі були використані клітини карциноми молочної залози людини лінії MCF-7. До початку роботи клітини зберігали у банку клітин при  $-70^{\circ}\text{C}$  у консервуючому розчині з вмістом 10% диметилсульфоксиду. Культивування клітин проводили при  $37^{\circ}\text{C}$  у зволоженій атмосфері, що містила 5%  $\text{CO}_2$ . Клітини вирощували у середовищі Ігла, модифікованому Дюльбекко (DMEM), з додаванням 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби ("Gibco BRL" США), L-глутаміну (2 мМ), пеніциліну (50 од/мл) та стрептоміцину (0,25 мкг/мл). При досягненні клітинами 90% конфлюентності їх пасажували у стерильну чашку Петрі діаметром 10 см у розведенні  $1 \cdot 10^6$  клітин/чашку. Для відкріплення клітин з поверхні чашки культуральне середовище відбирали, клітини промивали PBS, попередньо нагрітим до  $37^{\circ}\text{C}$ , та інкубували у протеолітичному розчині 0,25% трипсину та 0,02% ЕДТА ("Gibco BRL", США) протягом 2-4 хв. Після цього клітини ресуспендували в середовищі DMEM з додаванням усіх компонентів та вносили у нові культуральні чашки.

**2.3.2. Отримання сфероїдів клітин лінії MCF-7 та їх гістологічний аналіз.** Клітини лінії MCF-7 культивували на неадгезивному середовищі, щоб отримати тривимірну культуру сфероїдів. Для цього готували 1% розчин агарози у воді надвисокої очистки та автоклаували його протягом 45 хв. у автоклаві GSM 200 (Швейцарія) згідно рекомендацій виробника. Теплий розчин

агарози наносили на чашки Петрі діаметром 10 см. тонким шаром та залишали застигати у ламінарному боксі. Після повної полімеризації агарози на чашки вносили 10 мл поживного середовища і залишали на 15 хв, після чого середовище відбирали. Далі 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. Протягом цього часу клітини формували оформлені сфероїди округлої форми (рис. 2.1). Утворення сфероїдів спостерігали за допомогою світлового інвертованого мікроскопа CETI Versus (Бельгія).



**Рис. 2.1.** Мікрофотографія сфероїдів клітин лінії MCF-7, отриманих після 72 год. культивування клітин на 1% агарозі; світлова мікроскопія

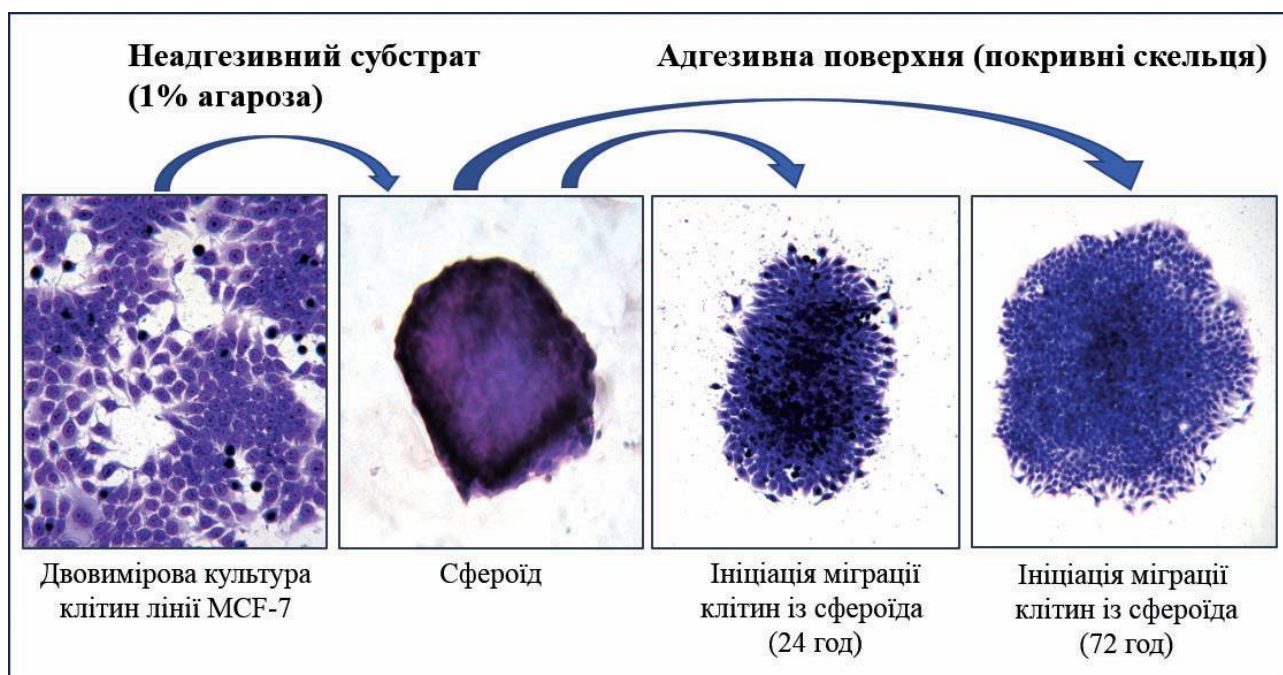
Для приготування парафінових зрізів сформовані сфероїди збирали за допомогою стерильної піпетки із широким носиком та переносили у пластикову камеру, дно якої було закрито нейлоновим фільтром із діаметром пор 30 мкм. Камеру разом з культурами переносили у 10% забуферений формалін та фіксували протягом ночі. На наступний день сфероїди переносили у розчин етиловий спирт – формалін (1:1) на 30 хв. Потім зразки проводили по спиртах

наступним чином: 90% спирт – 30 хв, 96% – двічі по 30 хв, після чого їх переносили у 96% спирт та витримували у ньому протягом ночі. На наступну добу сфероїди переносили у розчин спирт – ксилол (1:1) на 30 хв. Після цього зразки тричі переносили у ксилол, де тримали по 30 хв. Після ксилолу сфероїди вміщували у парафін на 30 хв, а потім іще двічі по 30 хв при температурі 56°C. Після цього виготовляли парафінові блоки, для чого сфероїди заплавляли у парафін. Потім готували зрізи завтовшки 4 мкм, переносили на попередньо знежирені предметні скельця, висушували добу на гістологічному столику при 45°C. Депарафінізацію зрізів проводили у двох змінах ксилолу та розчинах спиртів спадаючої концентрації по 5 хв, після чого переносили зрізи у дистильовану воду. Гістологічний аналіз проводили за допомогою класичної методики із використанням забарвлення гематоксиліном-еозином та заключенням у канадський бальзам або Cytoseal 60 (Thermo Fisher Scientific).

**2.3.3. 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. Загальна схема ініціації міграції зображена на рис. 2.2.

Для морфологічного дослідження сфероїди фіксували метанолом протягом 10 хв за кімнатної температури і забарвлювали за методом Май-Грюнвальда-Гімза. Для імунофлуоресцентної детекції протеїнкінази S6K1 сфероїди фіксували 10% формаліном протягом 15 хв за кімнатної температури.

Потім наносили розчин 0,2% Triton X-100 у PBS на 10 хв., після чого препарати інкубували з буфером для пригнічення аутофлуорисценції протягом 30 хв за кімнатної температури. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували за допомогою інкубації зразків з 1% БСА протягом 1 год за +37°C. Для визначення субклітинної локалізації кінази S6K1 наносили поліклональні кролячі антитіла проти С-кінцевої ділянки S6K1 (отримані у нашій лабораторії) у розведенні 1:100 та інкубували протягом ночі при +4°C.



**Рис. 2.2.** Схематичне зображення методу ініціації міграції клітин лінії MCF-7 із сфероїдів на адгезивну поверхню. Світлова мікроскопія; забарвлення за Май-Грюнвальдом-Гімза

Для детекції активованої форми S6K1 (фосфо-S6K1 T389) на препарати наносили поліклональні кролячі антитіла проти фосфо-S6K1 T389 (#9205 Cell Signaling Technology, США) у розведенні 1:50 та інкубували протягом ночі при 4°C. На наступний день препарати інкубували з вторинними антитілами проти-імуноглобулінів кроля, міченими флуоресцеїн ізотіоціанатом (FITC), протягом 45 хв при 37°C. Ядра клітин зафарбовували флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) у кінцевій концентрації 5 мкг/мл протягом 30 хв. Після усіх інкубацій зразки промивали PBS тричі. Наприкінці препарати заключали у середовище Mowiol 4-88 (Sigma, США) та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії.

**2.3.4. Імунофлуоресцентний аналіз та конфокальна мікроскопія.** Для виявлення внутрішньоклітинної локалізації досліджуваних білків, клітини лінії MCF-7 вносили у 24-х лункову плату (TPP, Швейцарія) на стерильні покривні скельця (Menzel-Gläser, Німеччина) у концентрації  $30 \cdot 10^3$  клітин на лунку та

культивували протягом 48 год. Після цього клітини фіксували 10% формаліном протягом 15 хв за кімнатної температури. Мембрану клітин пермеабілізували за допомогою 0,2% розчину Triton X-100 у PBS протягом 10 хв. Аутофлуоресценцію клітинних структур пригнічували за допомогою інкубації зразків з буфером, який містив  $\text{CuSO}_4$  10 mM,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  50 mM, pH 5,0, розчинені у воді надвисокої очистки. Буфер для пригнічення аутофлуоресценції наносили на препарати на 30 хв та інкубували при кімнатній температурі. Далі неспецифічне зв'язування пригнічували, інкубуючи зразки у розчині 1% БСА протягом 1 год при  $+37^\circ\text{C}$  у вологій камері. Після цього наносили первинні антитіла у розчині 1% БСА на ніч при  $+4^\circ\text{C}$ . Між усіма інкубаціями препарати промивали тричі PBS. На наступний день на зразки наносили вторинні видоспецифічні антитіла, мічені флуоресцентною міткою, розчинені у 1% БСА у концентрації, рекомендованій виробником. Інкубацію з вторинними антитілами проводили протягом 1 год при  $+37^\circ\text{C}$  у вологій камері. Після цього на зразки наносили PBST на 10 хв, і наприкінці відмивали PBS.

У випадках дослідження співлокалізації двох білків, після кроків описаних вище на клітини наносили первинні антитіла проти іншого білка на 1 год при  $+37^\circ\text{C}$  у вологій камері. Та повторювали інкубації, як описано вище.

Ядра клітин дофарбовували флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) у кінцевій концентрації 5 мкг/мл протягом 30 хв.

У окремих випадках також візуалізували актиновий цитоскелет. Для цього на зразки наносили розчин фалоїдину (Sigma, США), міченого тетраметилпродаміном (TRITC) у концентрації 5 мкг/мл на 30 хв при кімнатній температурі.

Оброблені таким чином клітини заключали у середовище Mowiol 4-88 (Sigma, США) та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії.

**2.3.5. Ідентифікація мітотичних клітин за допомогою антитіл проти білка Ki-67.** Для дослідження внутрішньоклітинної локалізації кіназ S6K1 і mTOR у клітинах на різних стадіях мітозу у відділі сигнальних систем Інституту молекулярної біології і генетики було отримано та охарактеризовано антитіла

проти білка Ki-67 (113). Характеристику даних антитіл проводили на клітинах лінії MCF-7 та на парафінових зрізах тканини меланоми людини. Дані клітинні моделі були вибрані опираючись на їх високий проліферативний потенціал. Імунофлуоресцентний аналіз проводили, як описано у пункті 2.3.4. Первинні антитіла наносили на ніч за +4°C у наступних поєднаннях:

Моноклональні мишачі антитіла проти-Ki-67 1:1000;

Поліклональні кролячі антитіла проти-С-кінцевої ділянки S6K1 1:100;

Поліклональні кролячі антитіла проти-фосфо-mTOR S 2481 (#2974, Cell Signaling Technology, UK) 1:100;

Моноклональні кролячі антитіла проти-фосфо-mTOR S 2448 (#5536, Cell Signaling Technology, UK) 1:100.

У ході характеристики отриманих нами антитіл було підібрано умови для імуногістохімічного виявлення Ki-67 у парафінових зразках тканини людини, що є перевагою даних антитіл перед комерційними аналогами, які були доступні на момент проведення дослідження.

#### **2.4. Приготування препаратів та імуногістологічне дослідження нормальної тканини та раку молочної залози**

Післяопераційні зразки тканин раку молочної залози та оточуючої нормальної тканини отримували у Національному інституті раку МОЗ України на основі договору про співробітництво між інститутами. Матеріал одержали від 10 пацієнтів.

Тканину молочної залози ополіскували від крові та фіксували 8% розчином забуференого формаліну протягом 2 діб. На третю добу шматочки переносили у розчин: етиловий спирт – формалін (1:1) на 2 год. Двічі інкубували у етиловому спирті, у третій порції спирту інкубували протягом ночі. На четверту добу зразки переносили у ксилол та інкубували тричі по 1 год. Після цього зразки переносили у парафін та заливали за стандартною методикою. Потім готували зрізи

завтовшки 4,5 мкм, переносили на адгезивні предметні скельця (Menzel-Gläser, Німеччина), висушували щонайменше добу на гістологічному столику при 45<sup>0</sup>С.

Для гістологічного аналізу зразки забарвлювали еозином та гематоксиліном. Зрізи заключали під покривні скельця, використовуючи у якості середовища канадський бальзам. За допомогою світлової мікроскопії проводили гістологічне дослідження отриманих препаратів. На основі виявлених змін у будові злоякісно трансформованої тканини молочної залози встановлювали тип новоутворення.

Для вивчення внутрішньоклітинної локалізації досліджуваних білків проводили імуногістологічний аналіз. Парафінові зрізи молочної залози депарафінували у ксилолі та проводили по спиртах спадаючої коцентрації за стандартною методикою. Для відновлення антигену зрізи вміщували у цитратний буфер з рН6 та кип'ятили у мікрохвильовій печі 2 рази по 5 хв. Давали зрізам охолонути протягом 20 хв. та переносили у дистильовану воду на 5 хв. Після цього повторювали методику, описану у розділі 2.3.4. Імунофлуоресцентний аналіз і конфокальна мікроскопія.

## **2.5. Отримання стабільних клітинних ліній MCF-7 з різною експресією ізоформ S6K1**

Для отримання стабільних клітинних ліній MCF-7 було використано систему редагування геному CRISPR/Cas9. Вектори pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459) V2.0, які несли гідові РНК олігонуклеотиди комплементарні до послідовності *RPS6K1* гена, були люб'язно надані м.н.с. відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики Зайцем І. В. Клітини лінії MCF-7 були трансфіковані отриманими векторами за допомогою реагента jetPEI (Polyplus transfection, США), дотримуючись рекомендацій виробника. Через 24 год після трансфекції клітини були перенесені на 10 см чашку Петрі та селектовані пуроміцином (4 мкг/мл) протягом 48 год. Після селекції окремі клони були перенесені у свіже поживне середовище без пуроміцину та

використані в подальшому для імуноблот аналізу і імунофлуоресцентного аналізу вмісту і локалізації кінази S6K1.

**2.5.1. Морфологічний аналіз отриманих клітинних ліній MCF-7.** Для морфологічного аналізу клітини висаджували на стерильні покривні скельця у 24-х лункову плату (TPP, Швейцарія) у концентрації  $30 \cdot 10^3$  клітин на лунку та культивували протягом 48 год. Після цього клітини фіксували 10% забуференим формаліном протягом 15 хв за кімнатної температури. Пермеабілізацію мембрани проводили шляхом інкубації зразків з 0,2% розчином Triton X-100 у PBS протягом 10 хв. Після цього на клітини наносили розчин фалоїдину (Sigma, США), міченого тетраметилродаміном (TRITC) у концентрації 5 мкг/мл на 30 хв при кімнатній температурі. Ядра клітин зафарбовували флуоресцентним барвником Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) у кінцевій концентрації 5 мкг/мл протягом 30 хв. Після усіх інкубацій зразки промивали PBS тричі. Наприкінці препарати заключали у середовище Mowiol 4-88 (Sigma, США) та аналізували за допомогою конфокальної або флуоресцентної мікроскопії.

**2.5.2. Аналіз швидкості міграції отриманих клітинних ліній MCF-7 за методом раневої поверхні.** Здатність клітин до міграції визначали за допомогою моделі «раневої поверхні». Отримані клітинні лінії MCF-7 розсівали на 6-лункову плату (TPP, Швейцарія) та культивували до досягнення 90% моношару. Після цього посередині лунки проводили подряпину стерильним носиком сэмплера, промивали клітини PBS та вносили свіже поживне середовище. Фотографували 10 полів зору одразу після проведення подряпини та через 24 год культивування клітин. Експеримент повторювали тричі. Вимірювання ширини раневої поверхні проводили, як описано у (114). Коротко, обчислювали площу поверхні «рани» (Пл) та довжину (Д) в мікрометрах, після чого вираховували ширину раневої поверхні (Ш) за формулою:

$$\text{Ш} = \frac{\text{Пл}}{\text{Д}}$$



Для того, щоб дізнатись швидкість міграції клітин в мкм за 24 год, від ширини подряпини на початку експерименту (Ш0) віднімали ширину подряпини через 24 год (Ш24) та отримане число ділили на 2, так як ширина «рани» забезпечується міграцією двох протилежних країв «рани».

$$\text{Швидкість} = \frac{\text{Ш0} - \text{Ш24}}{2} \text{ (мкм/24год)}$$

Отримане значення виражали як середнє арифметичне  $\pm$  стандартне відхилення.

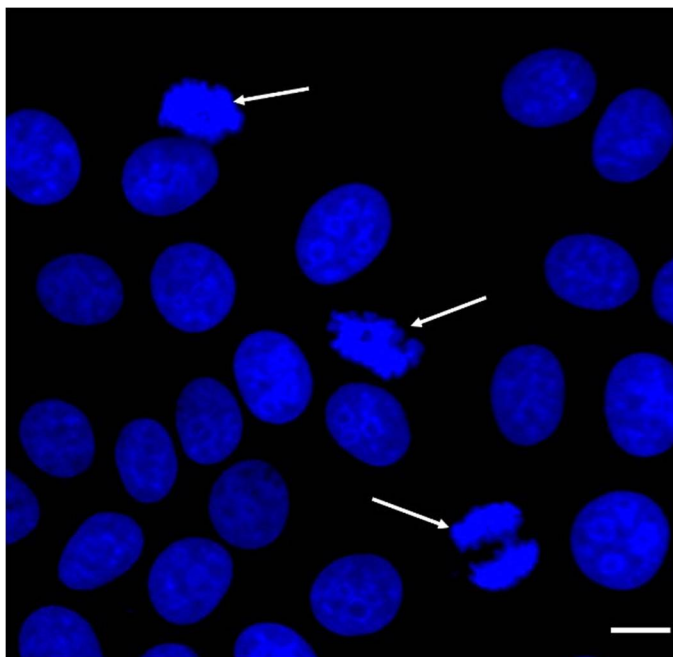
**2.5.3. Дослідження рівня проліферації отриманих клітинних ліній MCF-7.** Рівень проліферації клітин досліджували, підраховуючи мітотичний індекс. Для цього клітини вносили у 24-х лункову плату (TPP, Швейцарія) у концентрації  $30 \cdot 10^3$  клітин на лунку. Клітини фіксували 10% формаліном протягом 15 хв при кімнатній температурі на 24 год, 72 год, 5-ий та 7-ий день культивування. Зразки обробляли 0,2% розчином Triton X-100 10 хв, після чого наносили Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) у кінцевій концентрації 5 мкг/мл на 30 хв. Між усіма інкубаціями клітини промивали PBS.

Забарвлені таким чином препарати заключали у середовище Mowiol 4-88 (Sigma, США) та аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа. Фотографували 10 випадкових полів зору кожного зразка. На фотографіях рахували клітини на стадії мітозу та загальну кількість клітин. Мітоз визначали морфологічно за виглядом конденсованих хромосом, які значно відрізняються від ядер клітин у інтерфазі (рис. 2.3), що дозволяє легко візуально визначити мітотичні клітини.

Показник мітотичного індексу обраховували за формулою:

$$\text{Мітотичний індекс} = \frac{\text{к} - \text{сть клітин на стадії мітозу}}{\text{загальна к} - \text{сть клітин}} \times 100\%$$

Експеримент повторювали тричі. Отримане значення виражали як середнє арифметичне  $\pm$  стандартне відхилення.



**Рис. 2.3.** Мікропрепарат клітин лінії MCF-7 дикого типу, забарвлений Ноеchst 33342 для візуалізації ДНК (блакитний). Масштаб становить 10 мкм. Конденсовані хромосоми клітин на стадії поділу вказані стрілками

## **2.6. Біоінформатичний аналіз амінокислотної послідовності транскрипційного фактору TBR2.**

Для аналізу використовували амінокислотну послідовність транскрипційного фактору TBR2 з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://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](http://www.phosphosite.org)).

## 2.7. 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 тетрагоричного показника зв'язку із урахуванням поправки Йейтса. Для цього клітини підраховували у 10 випадково обраних полях зору для кожної форми досліджуваної кінази.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

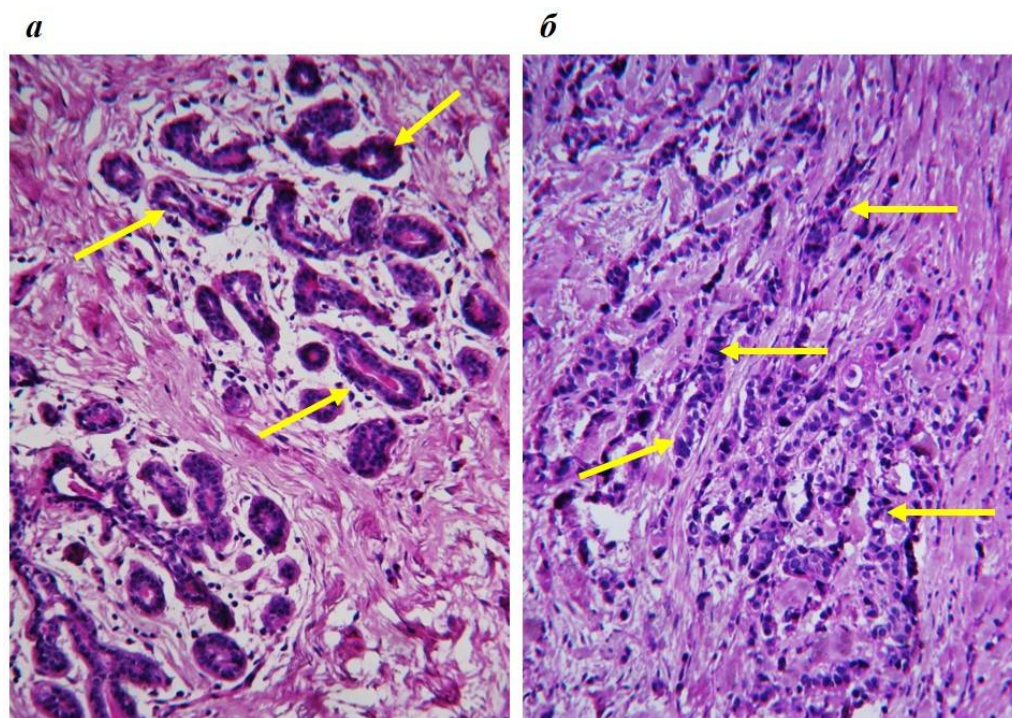
#### 3.1. Дослідження внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 у нормальних та пухлинних клітинах молочної залози людини

**3.1.1. Вивчення ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у тканині молочної залози людини.** Попередніми дослідженнями відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики було встановлено значне підвищення рівня експресії кінази S6K1 як у доброякісних, так і в злоякісних пухлинах молочної залози людини у порівнянні із умовно нормальною тканиною. Імуногістохімічний аналіз внутрішньоклітинної локалізації S6K1 виявив тенденцію до накопичення даної кінази у ядрах злоякіснотрансформованих клітин. Однак, причина цього явища залишається невідомою і потребує подальших досліджень.

Тому на першому етапі роботи було отримано та охарактеризовано зразки післяопераційного матеріалу раку та оточуючої тканини молочної залози людини. Для встановлення типу новоутворень було проведене гістологічне дослідження отриманих зразків (рис.3.1. а, б). У контрольних препаратах була виявлена типова будова молочної залози. На гістологічних зразках визначалися розгалужені внутрішньочасточкові протоки, вислані одношаровим кубічним епітелієм, та міжчасточкові протоки, вислані двошаровим кубічним епітелієм. Секреторний відділ був представлений лактоцитами, які формували ацинуси. Залозисті часточки були розділені між собою прошарками пухкої сполучної та жирової тканин (рис.3.1. а).

На препаратах злоякіснотрансформованої тканини молочної залози було виявлено значні зміни морфологічної будови. Характерна морфологія ацинусів та молочних протоків була відсутня. У сполучній тканині були наявні одно- та дворядні тяжі епітеліоцитів, що свідчило про міграцію епітеліальних клітин за

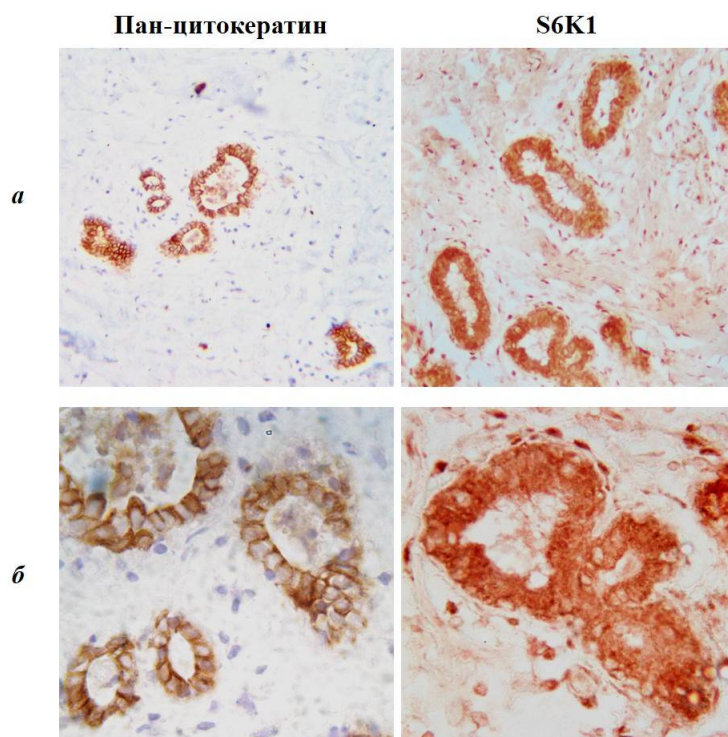
межі базальної мембрани. Епітеліоцити були різні за формою та розміром, а також характеризувалися поліморфними ядрами (рис.3.1. б). За отриманими даними морфологічного аналізу встановлено діагноз - інвазивна часточково-протокова карцинома молочної залози, який було підтверджено в Національному інституті раку МОЗ України.



**Рис. 3.1.** Гістологічні препарати аденокарциноми та оточуючої умовно нормальної тканини молочної залози людини. Забарвлення гематоксиліном та еозином: *а* – гістологічний препарат умовно нормальної тканини молочної залози людини. Об. 20х, ок.10х. Стрілками позначені молочні протоки, характерні для будови нормальної молочної залози; *б* – гістологічний препарат аденокарциноми молочної залози людини. Об. 20х, ок.10х. Стрілками позначені тяжі епітеліоцитів, які мігрували за межі базальної мембрани

На наступному етапі роботи за допомогою імуногістохімічного аналізу виявляли лактоцити за допомогою антитіл проти маркеру епітеліальних клітин – пан-цитокератину (рис.3.2. *а*, *б*). Надалі зразки умовно нормальної тканини

молочної залози обробляли антитілами проти С-кінцевої ділянки протеїнкінази S6K1 (рис.3.2. *a*, *б*). Порівнюючи отримані результати, виявили переважно цитоплазматичну локалізацію S6K1 у епітеліальних клітинах умовно нормальної тканини молочної залози людини.



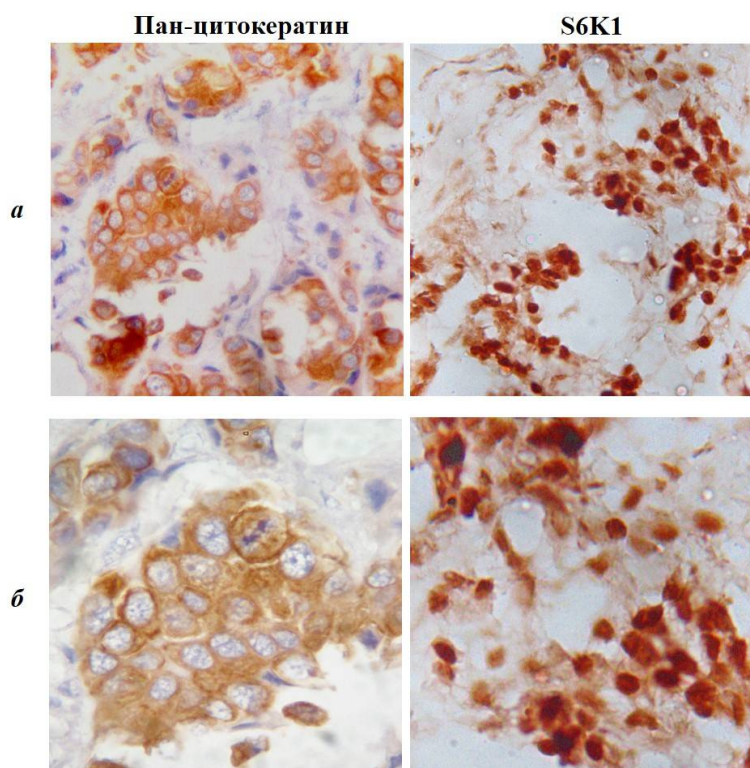
**Рис. 3.2.** Гістопрепарати умовно нормальної тканини молочної залози людини. Імуногістологічне визначення пан-цитокератину та протеїнкінази S6K1: *a* – об.20х, ок.10х; *б* – об.40х, ок.10х. У випадку виявлення пан-цитокератину зрізи були дофарбовані гематоксиліном

Сучасна література наводить дещо суперечливі дані стосовно внутрішньоклітинної локалізації протеїнкінази S6K1 у злоякіснотрансформованій тканині молочної залози людини. Дану кіназу детектували як у цитоплазмі, так і у ядрах пухлинних клітин. Було показано, що ядерна локалізація S6K1 може корелювати із гіршим прогнозом для пацієнтів.

Імуногістохімічний аналіз вмісту та локалізації кінази S6K1 у отриманих нами препаратах аденокарциноми молочної залози людини виявив яскраву



позитивну реакцію переважно у ядрах клітин епітеліального походження (рис.3.3. *а, б*).



**Рис. 3.3.** Гістопрепарати аденокарциноми молочної залози людини. Імуногістологічне визначення пан-цитокератину та протеїнкінази S6K1: *а* – об.40х, ок.10х; *б* – об.100х, ок.10х. У випадку виявлення пан-цитокератину зрізи були дофарбовані гематоксиліном

Отримані результати узгоджуються із попередніми дослідженнями відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Однак, причини та механізм релокації S6K1 до ядра пухлинних клітин молочної залози людини наразі залишаються невідомими. Тому наступним етапом роботи було вивчення внутрішньоклітинної локалізації у клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 за умов *in vitro*. Дана клітинна лінія є всебічно охарактеризованою та широко використовується для дослідження біології раку молочної залози. Крім того клітинам MCF-7 властивий

високий рівень експресії компонентів mTOR/S6K сигнального шляху, що робить їх зручною моделлю для вивчення вмісту і локалізації S6K1.

**3.1.2. Аналіз ядерно-цитоплазматичного розподілу кінази S6K1 у клітинах аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7.** За допомогою імунофлуоресцентного забарвлення та наступної лазерної скануючої мікроскопії виявлено, що клітинам лінії MCF-7 притаманна переважно ядерна локалізація протеїнкінази S6K1 за умов моношарової культури (рис. 3.4).

Однак, більш детальний аналіз показав, що яскрава ядерна реакція зустрічається у поодиноких клітинах або за низького рівня конфлюентності моношару клітин MCF-7 (рис. 3.4. *a*). Тоді як у ділянках із вищою щільністю клітин спостерігається підвищення вмісту S6K1 у цитоплазмі та, подекуди, зафарбовування однакової інтенсивності як у ядрі, так і в цитоплазмі клітин (рис. 3.4. *б*). Натомість, при культивуванні MCF-7 за тривимірних умов у вигляді багатоклітинних сфероїдів кіназа S6K1 детектувалась виключно у цитоплазмі клітин (Рис. 3.4. *в*). Отримані результати дозволили нам припустити, що ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 може залежати від щільності клітин та рівня конфлюентності моношару.

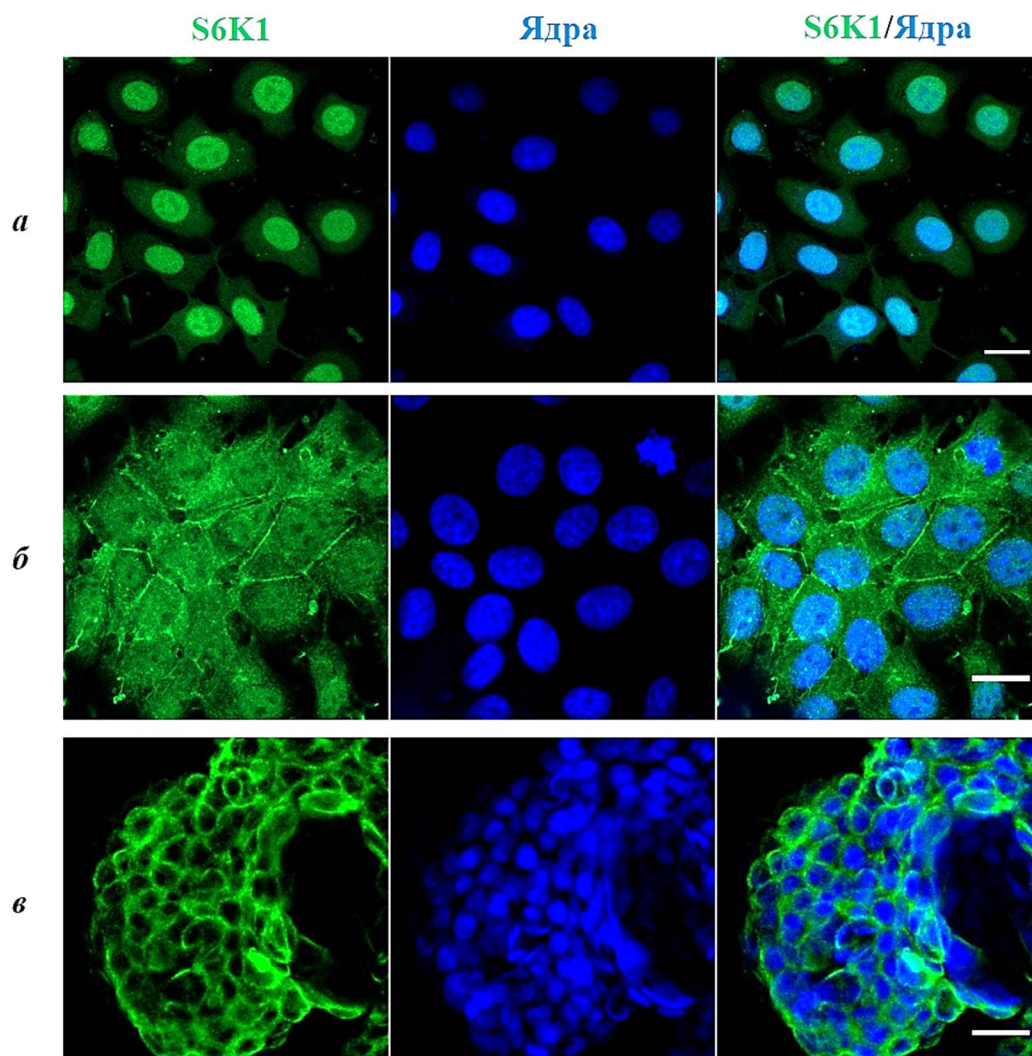
З метою подальшого дослідження виявленого нами явища клітини лінії MCF-7 були внесені у 24-х лункову плату за різної щільності, а саме: 10 тис. кл/лунку, 30 тис. кл/лунку, 50 тис. кл/лунку, 70 тис. кл/лунку та 100 тис. кл/лунку. Через 48 год. після пасажування клітини були зафіксовані і проаналізовані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

Для виявлення цитоплазматичного компартменту клітини були проінкубовані з флуоресцентно міченим фалоїдином, який дозволив візуалізувати актиновий цитоскелет (рис. 3.5).

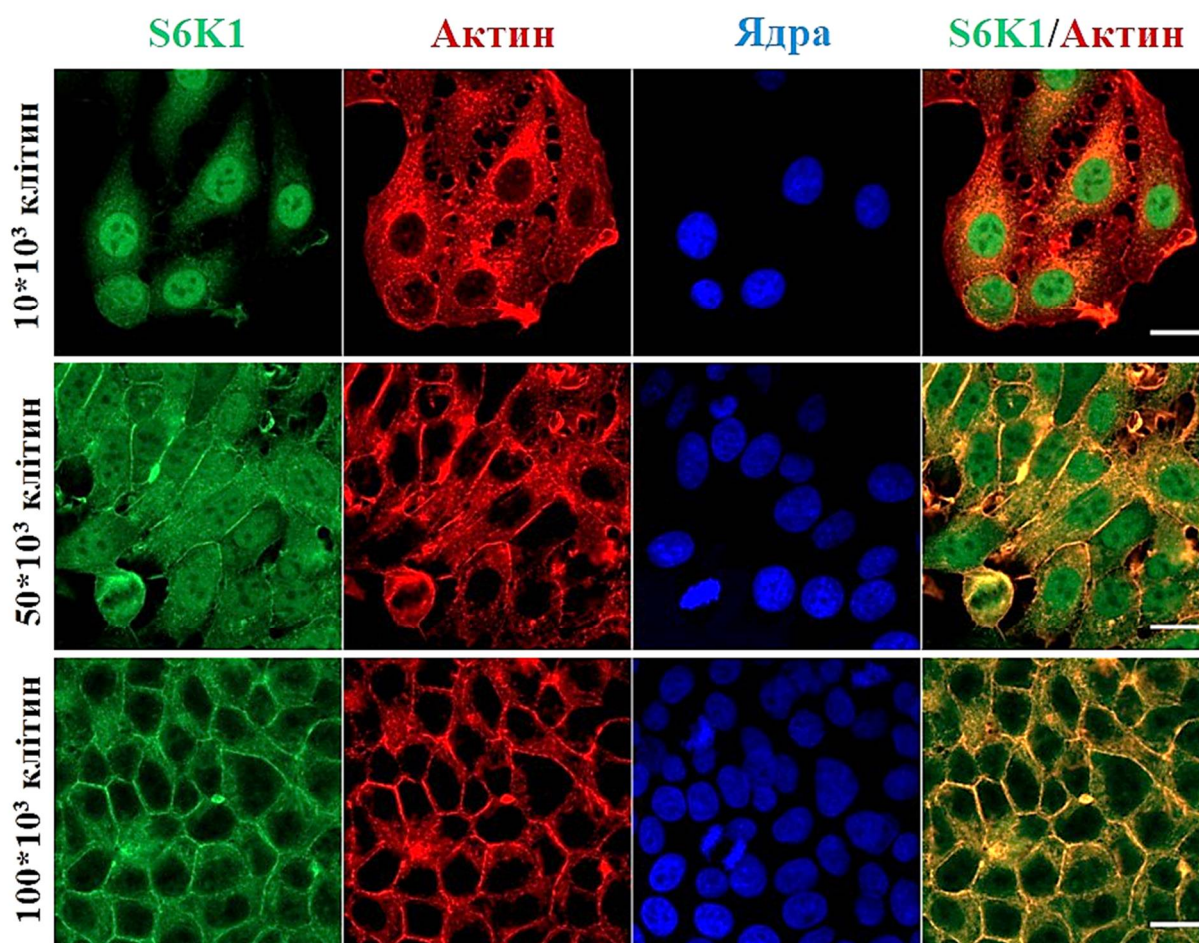
Так, за щільності клітин 10 тис. кл/лунку спостерігалась яскраво виражена ядерна імунофлуоресцентна реакція (рис. 3.5). За щільності 30 тис. кл/лунку починала зростати цитоплазматична імунофлуоресцентна реакція проти S6K1, тоді як при 50 тис. кл/лунку та 70 тис. кл/лунку кіназа S6K1 детектувалась як в



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



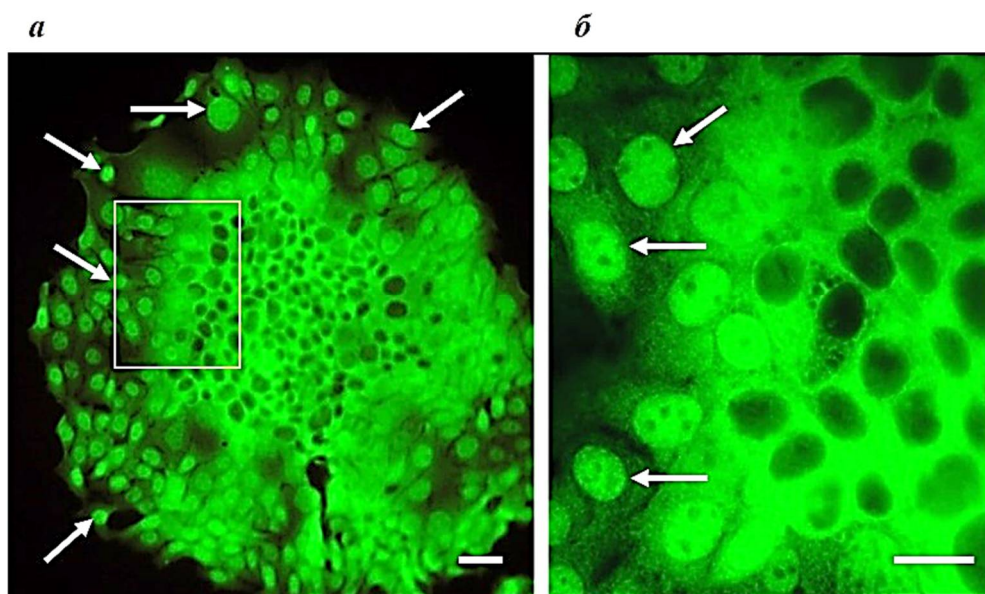
**Рис. 3.4.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у клітинах лінії MCF-7: *а* – ядерна локалізація S6K1 у поодиноких клітинах лінії MCF-7; *б* – ядерна та цитоплазматична локалізація S6K1 у ділянках 60-70% конфлюентного моношару клітин лінії MCF-7; *в* – цитоплазматична локалізація S6K1 у сфероїдах клітин MCF-7 в умовах тривимірної культури. ДНК клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм



**Рис. 3.5.** Мікропрепарати клітин лінії MCF-7, які культивували за різного рівня конфлюентності моношару. Імунофлуоресцентне визначення внутрішньоклітинної локалізації S6K1 (зелений) проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1. Цитоплазматичний компартмент візуалізований за допомогою флуоресцентно міченого фалоїдину, який специфічно забарвив актиновий цитоскелет (червоний). Ядра клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм

Дослідження фрагментів суперконфлюентного моношару після їх прикріплення до нової культуральної поверхні також показало значну відмінність у локалізації S6K1, яка корелювала із щільністю клітин (рис. 3.6). Клітини лідуючого краю, які мігрували на культуральну поверхню характеризувалися яскравим ядерним забарвленням на S6K1, тоді як клітини, які

знаходились у щільному центрі фрагмента мали цитоплазматичну реакцію на S6K1.



**Рис. 3.6.** Мікропрепарат фрагмента суперконфлюентного моношару, який прикріплювався до культурального пластику протягом 48 год. Імунофлуоресцентне визначення внутрішньоклітинної локалізації S6K1 (зелений) проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1: *a* – загальний вигляд фрагмента суперконфлюентного моношару; *б* – збільшена ділянка фрагмента. Стрілки вказують на появу ядерного розташування S6K1 у клітинах лідуючого краю фрагмента. Масштаб 20 мкм

Отже, нами вперше було показано, що ядерно-цитоплазматичний розподіл S6K1 залежить від щільності клітин молочної залози лінії MCF-7 і рівня конфлюентності моношару за умов *in vitro*.

Антитіла проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1 розпізнають три відомі ізоформи досліджуваної протеїнкінази при розділенні білків у поліакриламідному гелі за денатуруючих умов, а саме: p60S6K1, p70S6K1 та p85S6K1. Найдовша форма p85S6K1 містить додатковий N-кінцевий фрагмент із



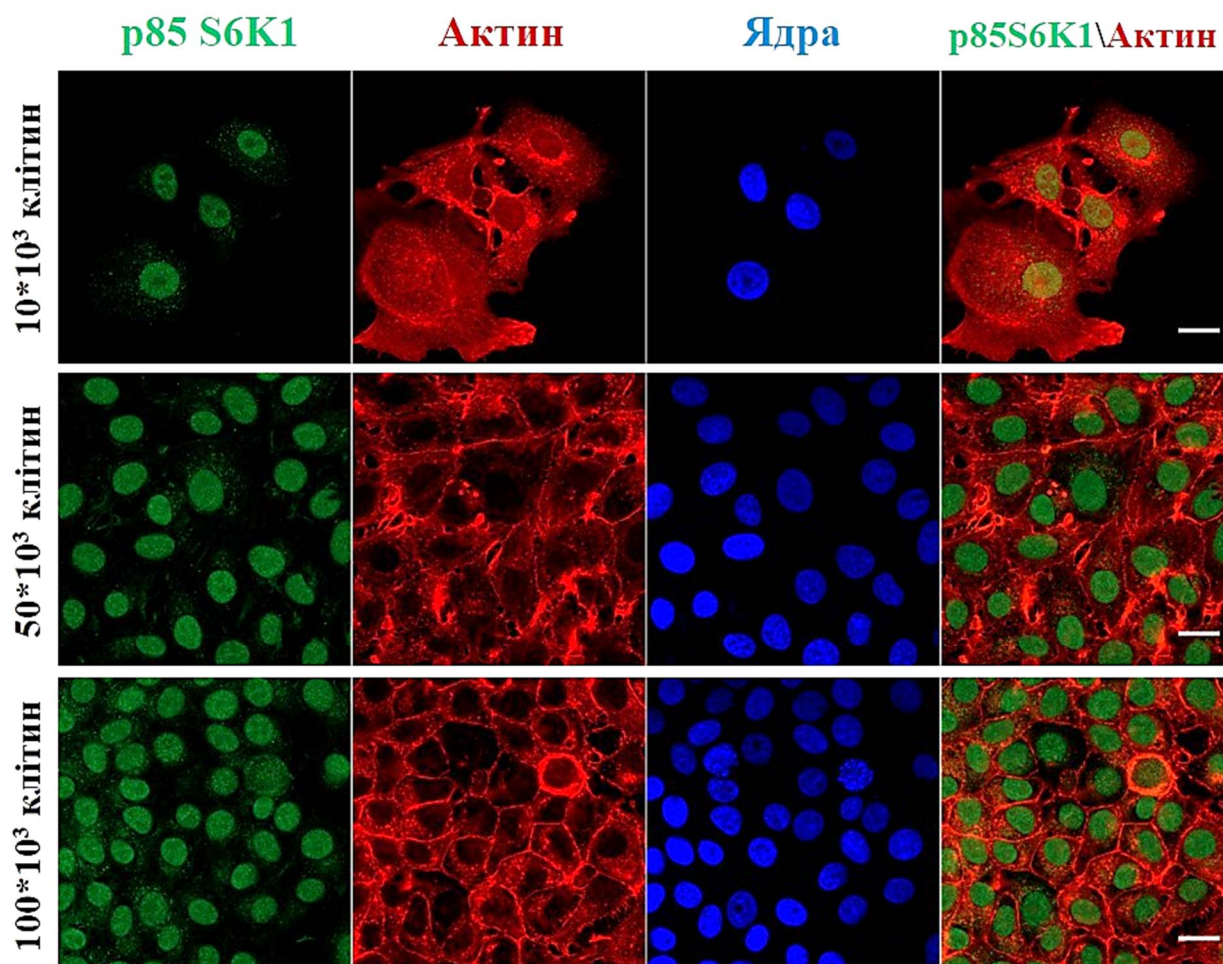
23-х амінокислот, до складу якого входить послідовність із 6-и залишків аргініну. Вважається, що ця послідовність є сигналом ядерної локалізації. Експерименти інших авторів із використанням клітинних ліній, що надекспресували p85S6K1 дійсно виявили дану ізоформу у ядерному компартменті клітин. Однак, p85S6K1 була детектована також у цитоплазмі за допомогою методу клітинного фракціонування. Більш того, нещодавні дослідження показали, що унікальний N-кінцевий фрагмент p85S6K1 відповідає також і за секрецію даної ізоформи за межі клітини.

З огляду на суперечливі дані ми вирішили перевірити, чи залежить внутрішньоклітинна локалізація p85S6K1 від щільності клітин лінії MCF-7. Для цього було використано антитіла, які специфічно розпізнають N-кінцеву послідовність p85S6K1. Перевагою даного дослідження стала візуалізація ендогенної кінази, чого не було зроблено раніше.

Аналогічно до попереднього досліду клітини лінії MCF-7 культивувалися у 24-х лунковій платі за різної щільності. Після фіксації цитоплазматичний компартмент візуалізували за допомогою детекції актинового цитоскелету. Ядра клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342. Імунофлуоресцентний аналіз ядерно-цитоплазматичного розподілу p85S6K1 показав, що ендогенна p85S6K1 локалізувалась у ядрах клітин лінії MCF-7 (рис. 3.7). У цитоплазмі клітин було виявлене слабе забарвлення у вигляді окремих гранул, яке може бути пояснене секрецією даної ізоформи. Встановлено, що ядерна локалізація p85S6K1 не залежить від щільності клітин та рівня конфлюентності моношару (рис. 3.7).

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 багаті на міжклітинні контакти. За допомогою імунофлуоресцентного аналізу встановлено, що внутрішньоклітинна локалізація ізоформи p85S6K1 не залежить

від щільності клітин і p85S6K1 є виключно ядерною кіназою у клітинах лінії MCF-7. У свою чергу, це дозволяє припустити, що зміна ядерно-цитоплазматичного розподілу S6K1 при досягненні конфлюентного моношару притаманна p70S6K1 та, можливо, p60S6K1.



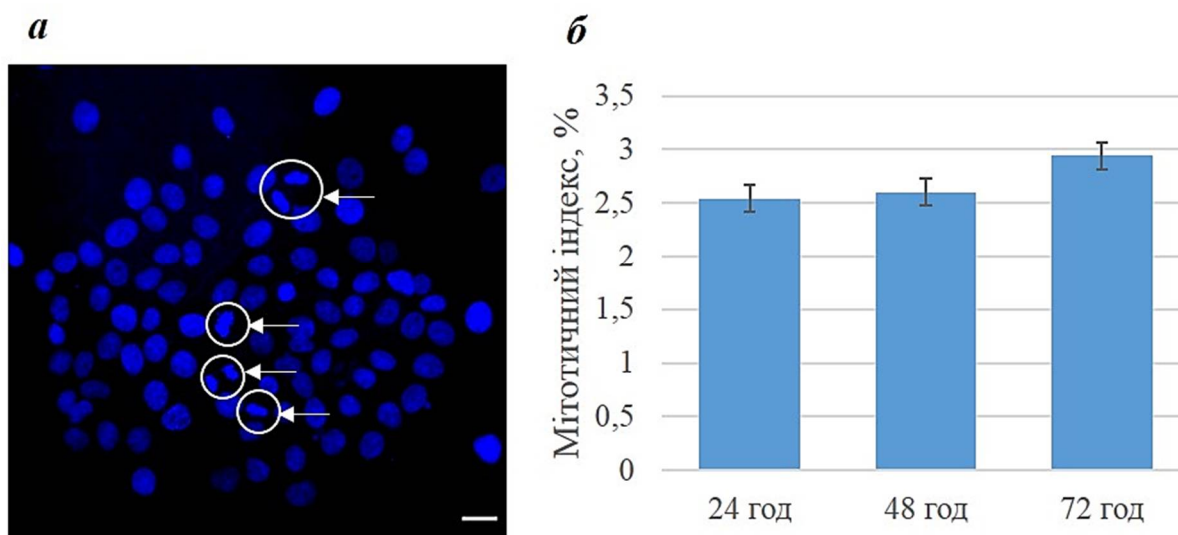
**Рис. 3.7.** Мікропрепарати клітин лінії MCF-7, які культивували за різного рівня конфлюентності моношару. Імунофлуоресцентне визначення ядерно-цитоплазматичного розподілу p85S6K1 (зелений). Цитоплазматичний компартмент візуалізований за допомогою флуоресцентно міченого фалоїдину, який специфічно забарвив актиновий цитоскелет (червоний). Ядра клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм

### 3.1.3. Вивчення внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 у сфероїдах клітин лінії MCF-7, які розпластуються на адгезивному субстраті.

Як зазначено вище, імуногістохімічний аналіз післяопераційного матеріалу зразків карциноми молочної залози та умовно нормальної оточуючої тканини виявив переважно цитоплазматичну локалізацію S6K1 у нормальній тканині та здебільшого ядерну її локалізацію при раку молочної залози. За даними літератури культивування клітин у тривимірних умовах наближує експериментальну модель до умов *in vivo*, порівняно із моношаровою культурою. Тому для дослідження внутрішньоклітинної локалізації протеїнкінази S6K1 у мігруючих клітинах було використано тривимірну модель сфероїдів клітин лінії MCF-7 та їх реверсії на культуральний пластик.

Взагалом, клітини лінії MCF-7 переносили на неадгезивний субстрат, яким слугувала 1% агароза, і залишали на 48 год. Далі сформовані сфероїди переносили на покривні скельця. Клітини лідируючого краю мігрували на адгезивний субстрат, що дозволяє використовувати дану модель для дослідження локомоторних властивостей клітин.

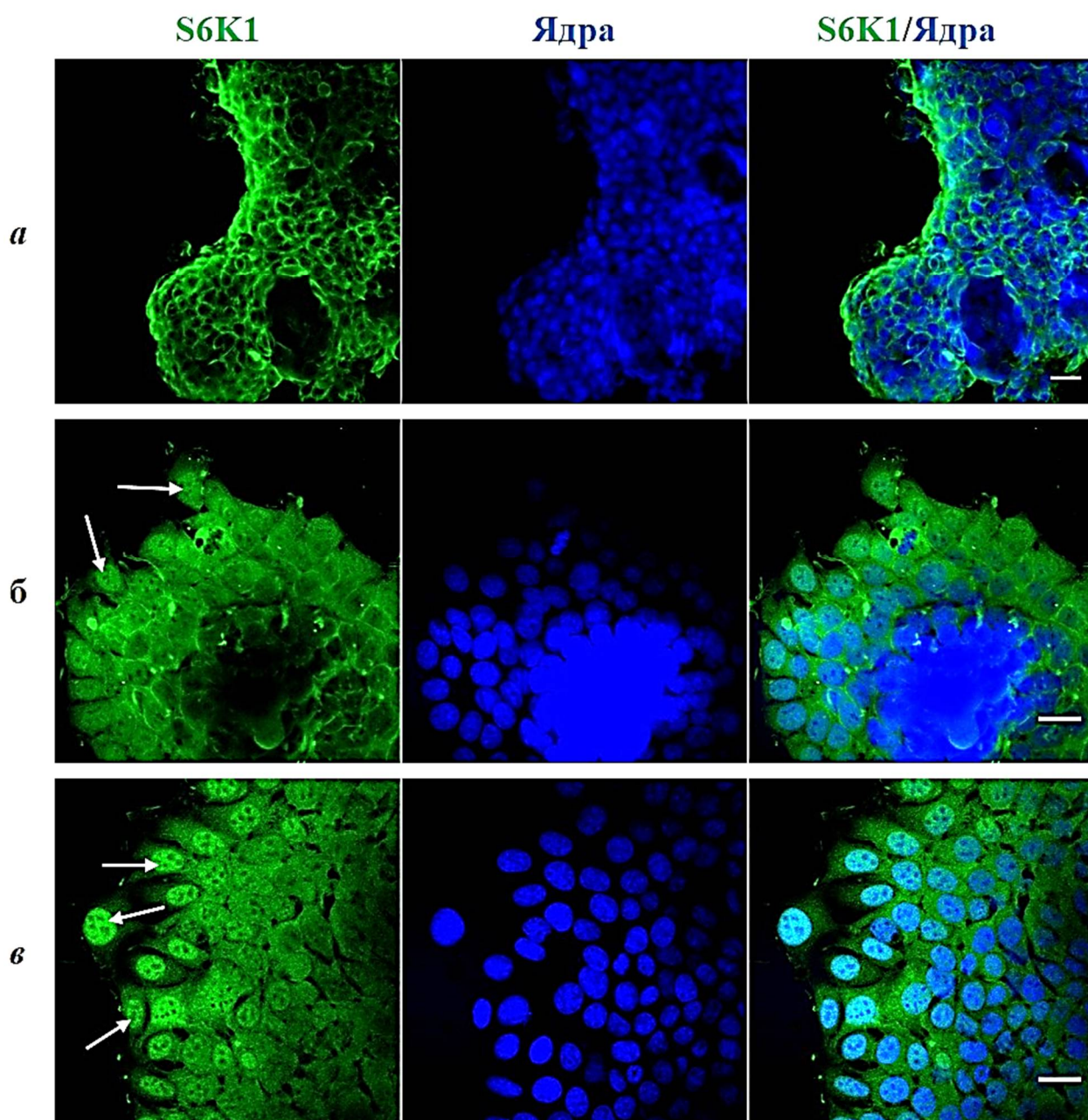
Одним із обмежень моделей для вивчення міграції клітин поза організмом є можливий вплив проліферації на досліджуваний процес. Це може спонукати дослідників значно скорочувати термін проведення експерименту. Для виявлення та врахування такого впливу у ході роботи був проаналізований мітотичний індекс у сфероїдах за різного часу реверсії на адгезивний пластик (рис. 3.8). Було виявлено, що після 24 годин реверсії сфероїдів мітотичний індекс становив 2.54%, після 48 год – 2.6%, після 72 год – 2.94% (рис. 3.8). Таким чином, інтенсивність проліферації протягом експерименту була сталою і не мала значущого ефекту на міграцію клітин та дозволяла порівнювати сусідні часові точки, що дозволяє використовувати модель реверсії багатоклітинних сфероїдів протягом 72 годин.



**Рис. 3.8.** Аналіз мітотичного індексу сфероїдів клітин MCF-7, які розпластувалися на культуральному пластику протягом 24 год, 48 год та 72 год: *a* – мікропрепарат сфероїда клітин MCF-7, який розпластувався протягом 48 год. Ядра клітин дофарбовані барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 25 мкм. Стрілками позначені клітини на стадії мітозу; *б* – діаграма, яка зображує значення мітотичного індексу у % на 24 год, 48 год та 72 год розпластування сфероїдів

Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинного розподілу кінази S6K1 у багатоклітинних сфероїдах показав, що S6K1 локалізується переважно цитоплазматично у сфероїдах клітин лінії MCF-7 (рис. 3.9. *a*). Однак при розпластуванні багатоклітинних сфероїдів на адгезивну поверхню спостерігалась релокалізація протеїнкінази S6K1 у ядра мігруючих клітин. Так, поява ядерного забарвлення було виявлене у клітинах лідуючого краю сфероїдів на 24 год розпластування (рис. 3.9. *б*). Тоді як значне посилення ядерної реакції відбувалося у клітинах, які мігрували із багатоклітинних сфероїдів, на 72 год розпластування (рис. 3.9. *в*). У клітинах, які почали розпластуватись, але ще не мігрували повністю на адгезивну поверхню і знаходились між лідуючим краєм та щільною центральною частиною сфероїда спостерігалась реакція приблизно однакового рівня як в ядрі, так і в цитоплазмі.

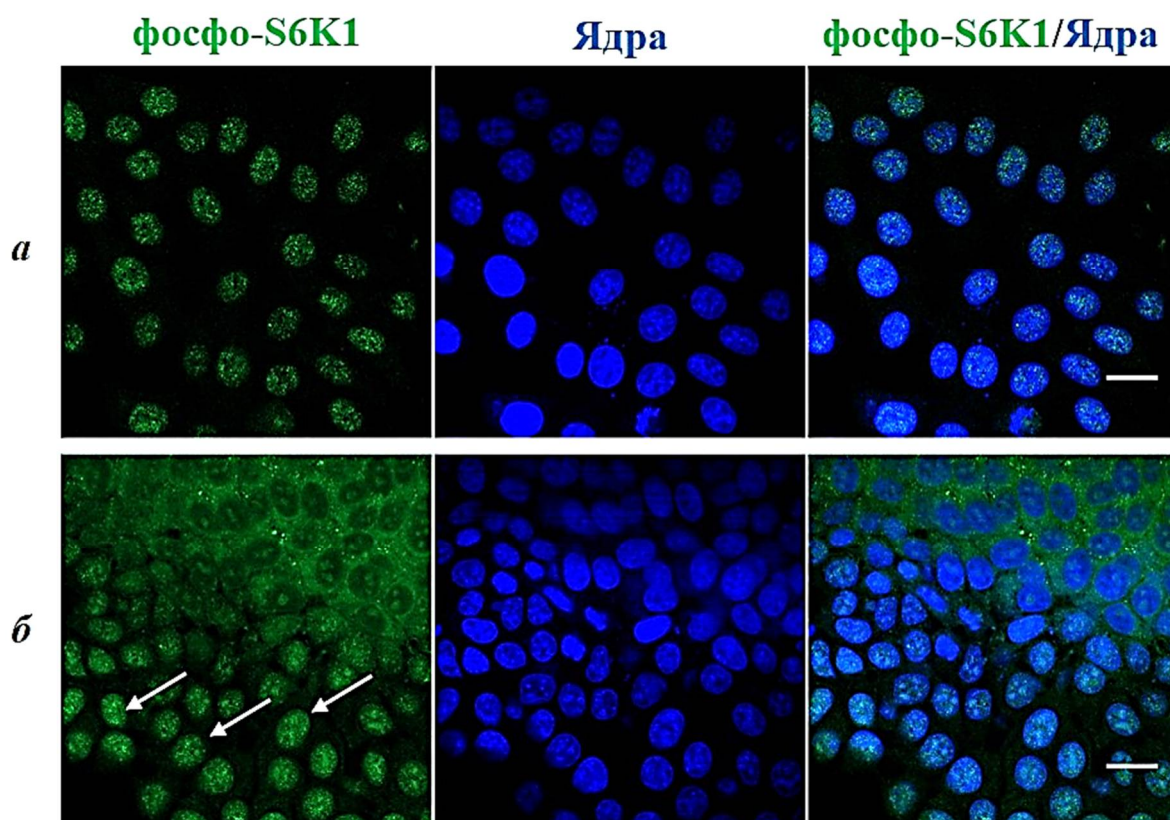




**Рис. 3.9.** Мікропрепарати сфероїдів клітин лінії MCF-7, які були отримані за умов тривимірної культури (*а*), сфероїдів, які розпластувалися на адгезивному пластику протягом 24 год (*б*) або 72 год (*в* - на знімку представлений лідируючий край сфероїда). Детекцію білка S6K1 проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1 (зелений). Стрілки вказують на позитивну реакцію на S6K1 у ядрах клітин. Ядра клітин дофарбовані барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 25 мкм



Кіназна активність S6K1 залежить від статусу фосфорилування самої молекули S6K1. Найбільш поширеним маркером активації S6K1 в клітинах є фосфорилування залишку треоніну 389. Імунофлуоресцентний аналіз показав, що паттерн внутрішньоклітинної локалізації фосфорильованої форми S6K1 загалом не відрізняється від описаного для загальної S6K1. Так, у моношаровій культурі фосфо-S6K1 розташовувалась у ядрах клітин MCF-7 (рис. 3.10. *а*). Тоді як у багатоклітинному сфероїді, що розпластується, клітини лідуючого краю мали ядерне забарвлення, а клітини, які знаходились в центрі сфероїда, мали позитивну реакцію у цитоплазмі (рис. 3.10. *б*).



**Рис. 3.10.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації фосфорильованої форми кінази S6K1 за залишком треоніну 389 (зелений) у клітинах лінії MCF-7: *а* – мікропрепарат клітин лінії MCF-7 за умов моношарової культури; *б* – мікропрепарат сфероїда клітин лінії MCF-7, який розпластувався на культуральний пластик протягом 72 год. Стрілки вказують на позитивну реакцію до фосфо-S6K1 у ядрах клітин. Ядра клітин дофарбовані барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20мкм

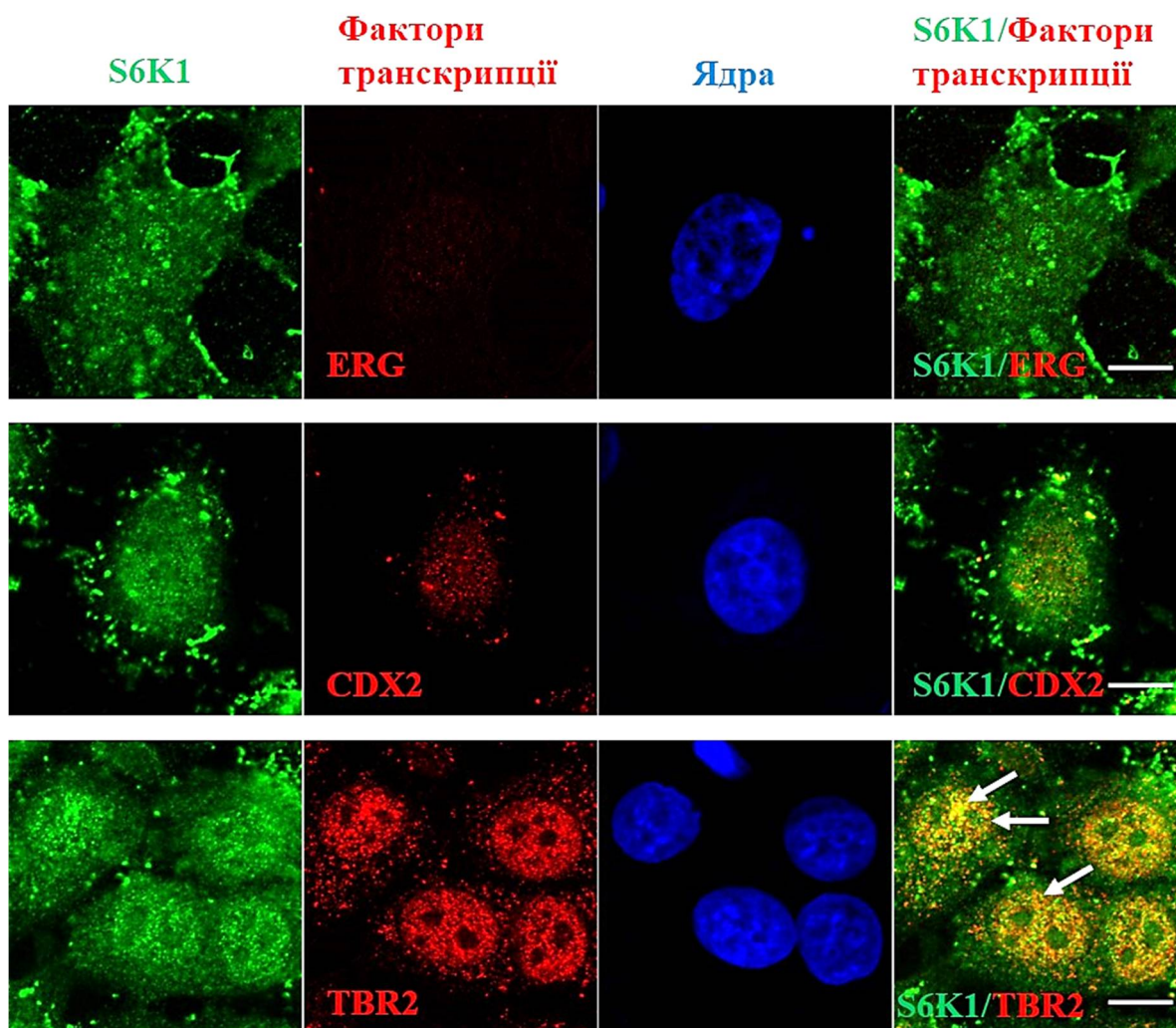
**3.1.4. З'ясування ролі релокалізації S6K1 під час міграції клітин лінії MCF-7.** Отримані результати вказують на те, що міграція супроводжується релокалізацією S6K1 з цитоплазми до ядра клітин. Одним із можливих пояснень цього явища може бути участь S6K1 у регуляції активності транскрипційних факторів 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/еомезодермін.

Імунофлуоресцентний аналіз показав, що транскрипційний фактор ERG відсутній у клітинах лінії MCF-7 або експресується у незначних кількостях (рис. 3.11). CDX2 був виявлений у вигляді яскравих точок у ядрах клітин, однак аналіз співлокалізації S6K1 та CDX2 не виявив можливої взаємодії між цими білками. Транскрипційний фактор TBR2 був задетектований як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин. Більш того, було виявлено ділянки співлокалізації TBR2 та S6K1 (рис. 3.11).

Оскільки нами показано, що внутрішньоклітинна локалізація протеїнкінази S6K1 залежить від щільності моношару клітин лінії MCF-7, ми перевірили можливу співлокалізацію TBR2 та S6K1 за різного рівня конфлюентності клітин. Виявлено, що TBR2 також переміщується до цитоплазми клітин при досягненні ними 90-100% конфлюентності. У літературі раніше вже було показана подібна поведінка для низки інших транскрипційних факторів (115,116).

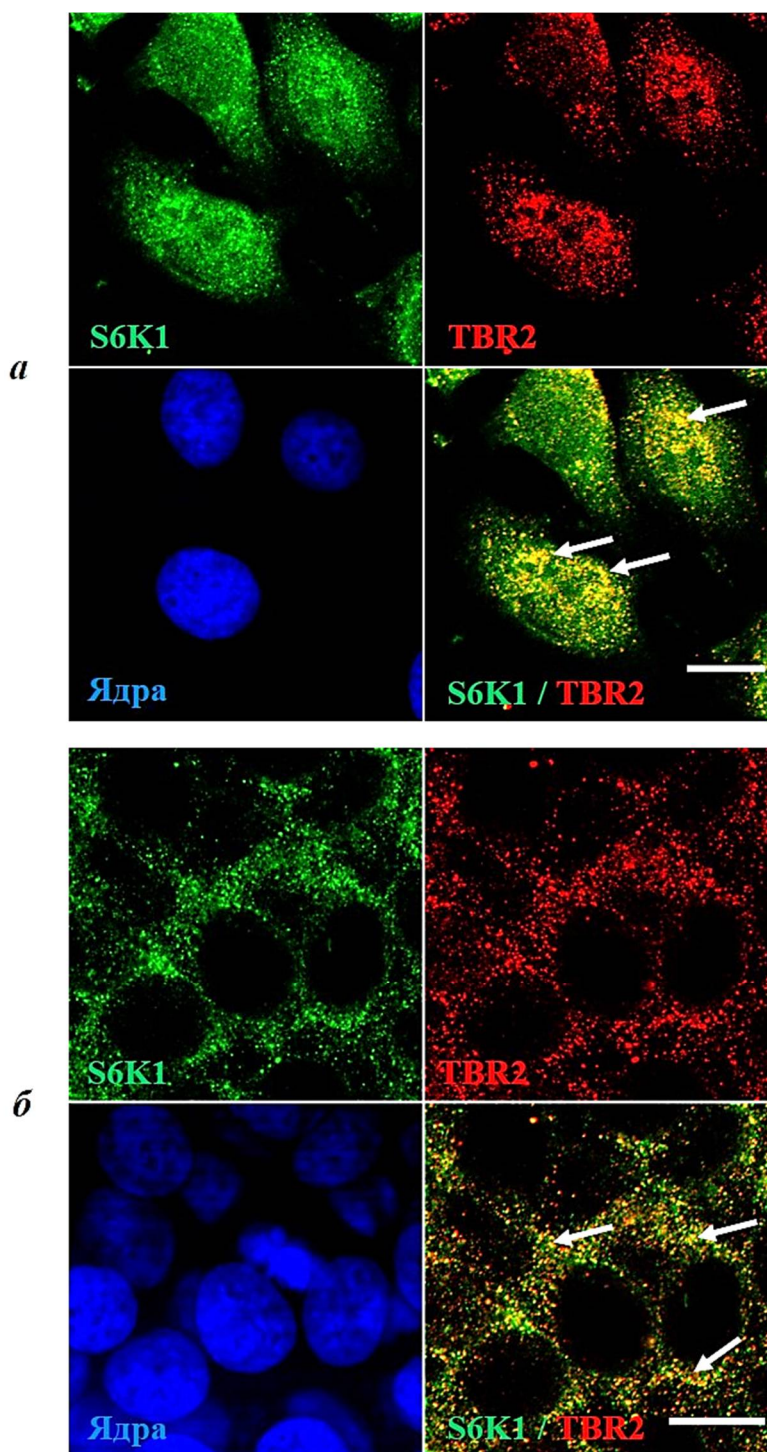
Як за низької щільності моношару, так і за високої була виявлена часткова співлокалізація TBR2 та протеїнкінази S6K1 (рис. 3.12). Кількісний аналіз співлокалізації досліджуваних білків показав, що коефіцієнт Пірсона для моношару клітин з низьким рівнем конфлюентності становить  $R_t = 0.55 \pm 0.113$ , тоді як коефіцієнти Мандерса відповідно:  $M_1 = 0.999 \pm 0.01$ ,  $M_2 = 0.84 \pm 0.087$ , що відповідає середньому рівню співлокалізації між S6K1 та TBR2.



**Рис. 3.11.** Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації кінази S6K1 (зелений) та транскрипційних факторів (червоний) ERG, CDX2 та TBR2/еомезодермін у клітинах лінії MCF-7. Ядра клітин дофарбовані барвником Hoechst 33342 (блакитний). Стрілки вказують на наявність часткової співлокалізації S6K1 та TBR2. Масштаб 10 мкм

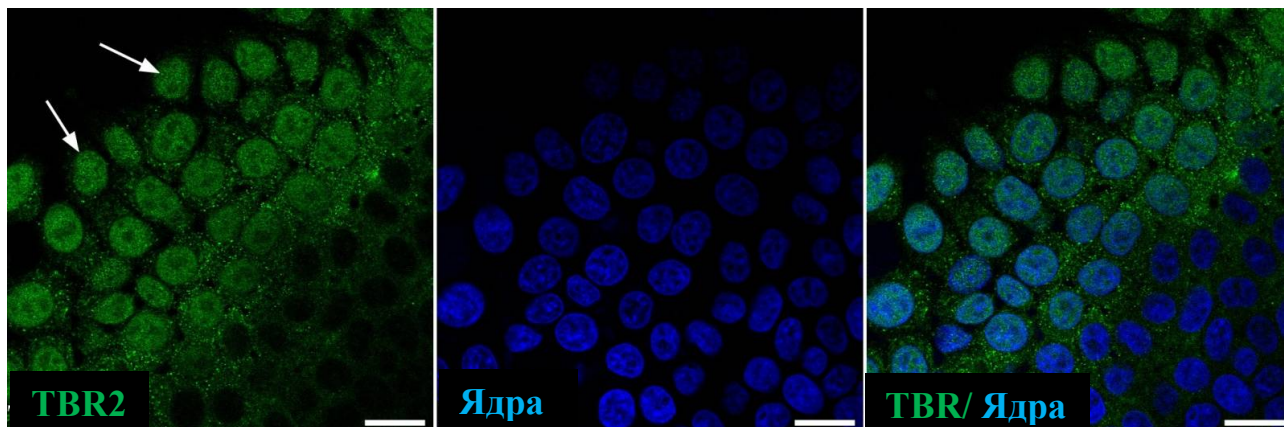
Дещо нижчий, але також достовірний рівень колокалізації був виявлений у моношарі високої щільності, а саме: коефіцієнт Пірсона становив  $R_r = 0.47 \pm 0.064$ , коефіцієнти Мандерса були рівні  $M1 = 0.995 \pm 0.004$  and  $M2 = 0.62 \pm 0.187$ . Таким чином, дещо вищий рівень співлокалізації транскрипційного фактора TBR2 та протеїнкінази S6K1 був встановлений у клітинах лінії MCF-7 за умов моношарової культури низької щільності, коли обидва білки знаходяться переважно у ядрі клітин (рис. 3.12. a).





**Рис. 3.12.** Імунофлуоресцентна детекція співлокалізації кінази S6K1 та транскрипційного фактора TBR2 у моношаровій культурі різної щільності: *а* – клітини лінії MCF-7 в умовах культивування при низькій щільності; *б* – клітини лінії MCF-7 в умовах культивування при високій щільності. ДНК клітин дофарбована барвником Hoechst 33342 (блакитний). Стрілки вказують на наявність часткової співлокалізації S6K1 та TBR2. Масштаб 15 мкм

Більш того, накопичення TBR2 у ядрах клітин було виявлено при міграції клітин лінії MCF-7 з сфероїдів на адгезивну культуральну поверхню (рис.3.13). Отримані результати дозволяють припустити, що співлокалізація TBR2 та S6K1 може мати місце також під час процесу міграції клітин.

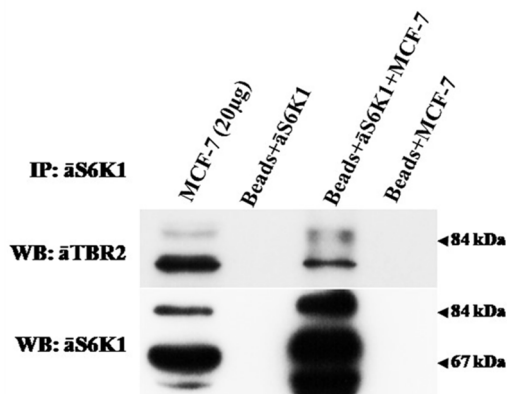


**Рис. 3.13.** Імунофлуоресцентна реакція на транскрипційний фактор TBR2 (зелений) у сфероїдах, які розпластуються на адгезивному пластику. ДНК клітин дофарбована барвником Hoechst 33342 (блакитний). Масштаб 20 мкм

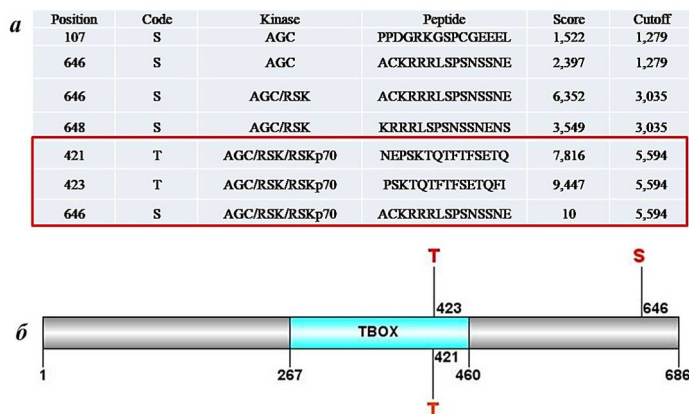
Метод ко-імунопреципітації підтвердив наявність білок-білкових взаємодій між S6K1 та TBR2. Білкові комплекси були преципітовані з лізатів клітин MCF-7 за допомогою антитіл проти С-кінця молекули S6K1. Отримані комплекси були нанесені на поліакриламідний гель та проаналізовані за допомогою методу Вестерн-блот. Антитіла проти транскрипційного фактору TBR2 виявили наявність білка TBR2 у отриманих білкових комплексах (рис. 3.14). Отримані результати дозволяють припустити можливість фосфорилування TBR2 кіназою S6K1.

Подальший комп'ютерний аналіз молекули TBR2 з використанням програм GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org>) та PSP ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)) виявив наявність низки потенційних сайтів фосфорилування для кінази S6K1 (рис. 3.15). Три встановлені сайти, а саме треонін 421, треонін 423, серин 646, можуть бути фосфорильовані з високим рівнем ймовірності. Крім того, сайти треонін 421 та 423 розташовані у ділянці молекули TBR2, яка відповідає за

зв'язування з ДНК. Сайт серин 646 розміщується у домені, який залучений до активації транскрипції. Отже, можна припустити, що S6K1 може бути залучена до регуляції активності фактора TBR2. Однак, дане питання потребує подальших досліджень.



**Рис. 3.14.** Вестерн-блот аналіз преципітованих білкових комплексів з лізатів клітин MCF-7 за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1. У якості контролів агароза була проінкубована лише з антитілами  $\bar{a}$ S6K1 або лише з лізатами клітин MCF-7



**Рис. 3.15.** Біоінформатичний аналіз фосфорилювання транскрипційного фактора TBR2 кіназою S6K1: *a* – за допомогою програмного забезпечення GPS 2.1 (Group-based Prediction System v2.1) було виявлено можливі сайти фосфорилювання TBR2; *b* – сайти з найвищою ймовірністю фосфорилювання кіназою S6K1 розташовуються у важливих ділянках молекули і потенційно можуть впливати на транскрипційну активність TBR2

Таким чином, 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.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

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. – Vol. 7:1332.
2. **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.
3. 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.
4. **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.

### **3.2. Роль mTOR/S6K1 сигнального каскаду у процесі поділу клітин раку молочної залози людини**

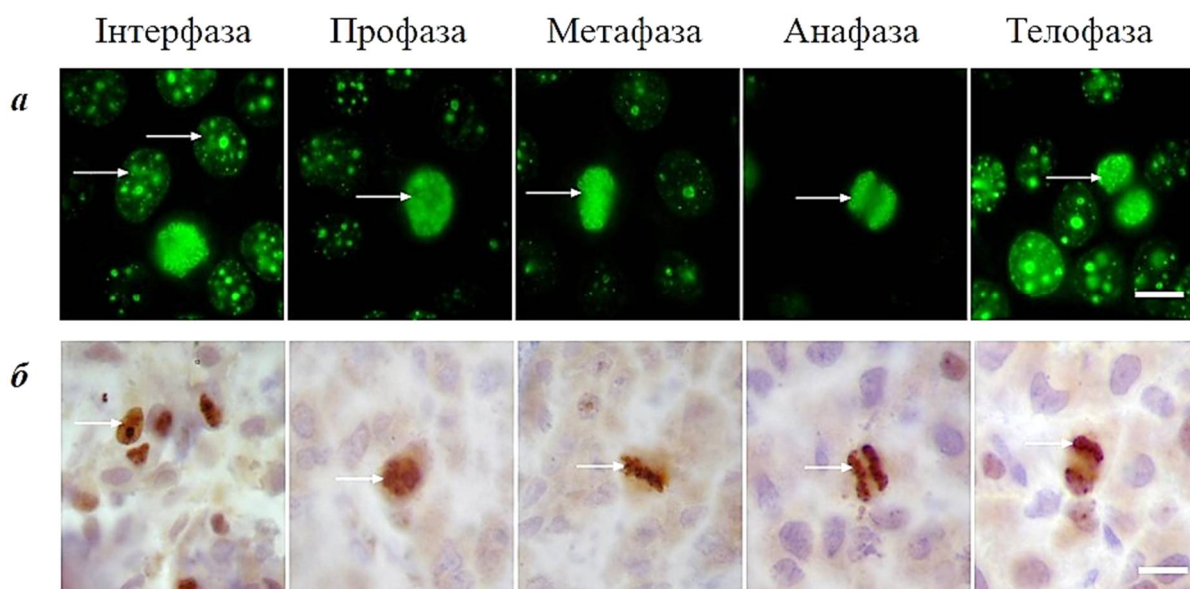
Підвищену проліферативну активність вважають однією із ряду ознак малігнізованих клітин (117). Раніше вважалось, що mTOR/S6K1 сигнальний шлях бере опосередковану участь у регуляції поділу шляхом стимуляції синтезу білка та росту клітин, що і було основою їх подальшої проліферації (118). Наразі з'являються окремі повідомлення про те, що кінази mTOR та S6K1 можуть бути залучені до регуляції безпосередньо процесу мітозу (119,120). Проте цілісної картини ролі зазначеного сигналіngu у проліферації пухлинних клітин немає. Тому одним із завдань роботи було вивчення вмісту та внутрішньоклітинної локалізації протеїнкіназ mTOR і S6K1 на різних етапах поділу клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7. Дане дослідження є важливим з огляду на те, що великий відсоток протиракових препаратів спрямована на пригнічення проліферації пухлинних клітин.

**3.2.1. Дослідження вмісту та внутрішньоклітинної локалізації кінази S6K1 на різних етапах мітозу.** Сучасні дослідження вказують на те, що протеїнкіназа S6K1 залучена не лише до регуляції біосинтезу білка, але й може брати певну участь у контролі за проліферацією пухлинних клітин. Однак, особливості цього процесу при новоутвореннях молочної залози людини наразі є слабо вивченими. Тому важливим завданням роботи було визначення вмісту і внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у клітинах лінії MCF-7 на різних стадіях клітинного циклу.

Для специфічної візуалізації мітотичних клітин нами було обрано антитіла проти ядерного антигену Ki-67. Антиген Ki-67 – це ядерний ДНК-зв'язувальний білок негістонного типу, який експресується лише у проліферуючих клітинах, але відсутній у клітинах на стадії G<sub>0</sub>. Під час мітозу Ki-67 локалізується на поверхні конденсованих хромосом, що дозволяє специфічно ідентифікувати фазу клітинного циклу (121). Дані антитіла було отримано у відділі сигнальних систем Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (113).



Основною перевагою порівняно із комерційними пропозиціями є їх яскрава специфічна реакція не лише при імунофлуоресцентному аналізі, але й при роботі з парафіновими зрізами (рис. 3.16).

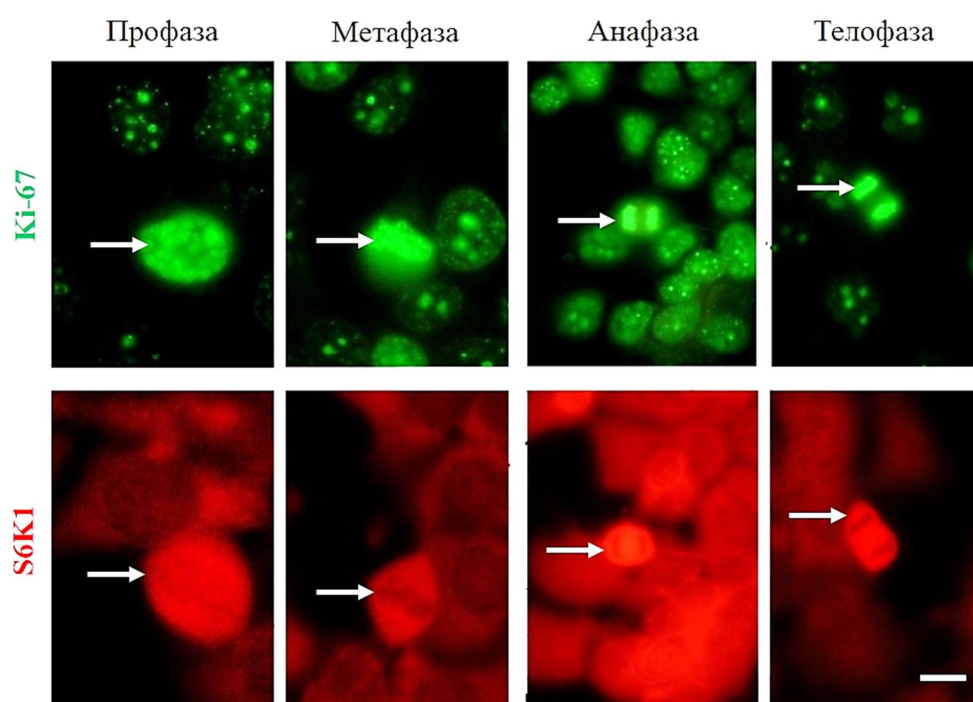


**Рис. 3.16.** Візуалізація різних фаз мітозу за допомогою антитіл проти білка Ki-67: *а* – імунофлуоресцентний аналіз локалізації антигена Ki-67 (зелений) у клітинах лінії MCF-7. Стрілки вказують на клітини у відповідній стадії поділу. Масштаб 10 мкм; *б* – імуногістохімічний аналіз локалізації антигена Ki-67 (коричневий) у парафінових зрізах тканини людини. Ядра дофарбовані гематоксиліном. Стрілки вказують на клітини у відповідній стадії поділу. Масштаб 10 мкм

На наступному етапі дослідження був проведений подвійний імунофлуоресцентний аналіз з використанням антитіл проти маркера проліферації – білка Ki-67 і проти кінази S6K1. Було виявлено, що клітинам MCF-7 на стадії поділу властиве суттєве підвищення вмісту S6K1, порівняно з інтерфазними клітинами (рис. 3.17).

Детальний аналіз вмісту та локалізації S6K1 у клітинах на кожній стадії мітозу дозволив встановити, що під час профазі спостерігається незначне

підсилення імуофлуоресцентної реакції на S6K1 порівняно з клітинами на стадії інтерфази (рис. 3.17). Більш того, підвищення внутрішньоклітинного вмісту відбувалося у цитоплазмі як у ранній профазі (до розбирання ядерної оболонки), так і у пізній профазі. Зв'язування з конденсованим хроматином при цьому не спостерігалось. Значне зростання внутрішньоклітинного вмісту S6K1 у клітинах лінії MCF-7 було виявлено у метафазі (рис. 3.17). При цьому спостерігалася дифузна локалізація досліджуваних кіназ у клітині. Високий вміст S6K1 зберігався протягом анафази та до пізньої телофази (рис. 3.17).



**Рис. 3.17.** Подвійний імуофлуоресцентний аналіз наявності білка Ki-67 (зелений) і вмісту кінази S6K1 (червоний) у клітинах лінії MCF-7 на різних фазах мітозу. Стрілки вказують на клітини у відповідних стадіях поділу. Масштаб 10 мкм

Статистичний аналіз кореляції між посиленою реакцією на S6K1 та розташуванням антигену Ki-67 на конденсованих хромосомах підтвердив наявність зв'язку між процесом активації проліферації та зростанням вмісту кінази рибосомального білка S6,  $\chi^2 = 9,7$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 991$  (Табл. 3.1).

**Аналіз кількості клітин лінії MCF-7 із підвищеним вмістом кінази S6K1**

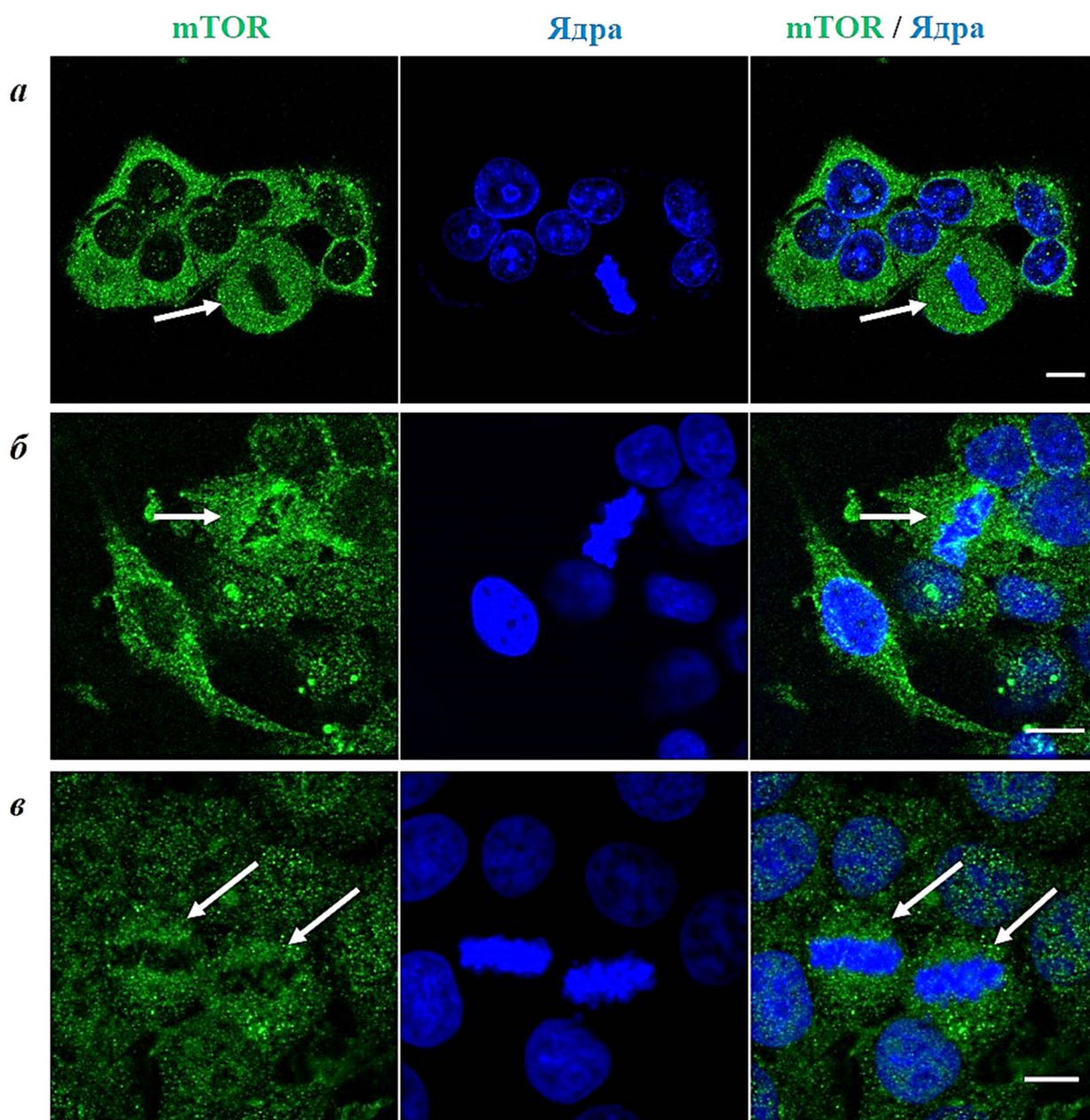
Рівень вмісту S6K1	Білок Ki-67 зв'язаний з хромосомами (мітоз)	Білок Ki-67 локалізується у зоні ядерець (інтерфаза)
Підвищений вміст S6K1	128	60
Низький вміст S6K1	8	795

Відтак нами було показано, що вміст протеїнкінази S6K1 зростає на усіх стадіях мітозу порівняно з інтерфазними клітинами лінії MCF-7.

**3.2.2. Визначення внутрішньоклітинної локалізації та вмісту кінази mTOR у проліферуючих клітинах лінії MCF-7.** Протеїнкіназа mTOR є верхньою ланкою mTOR/S6K1 сигнального каскаду і безпосереднім регулятором активності S6K1. Окрім того, сама молекула mTOR є мішенню для зворотньої регуляторної петлі і фосфорилується кіназою S6K1 за залишком Серину 2448 (122). Тому було вирішено перевірити внутрішньоклітинну локалізацію та вміст кінази mTOR і її фосфорильованих форм фосфо-mTOR S 2448 і фосфо-mTOR S 2481 у клітинах лінії MCF-7 на різних етапах мітозу.

mTOR є великою молекулою з масою 289 кДа, тому доцільним є використання кількох антитіл проти різних епітопів досліджуваної кінази. У дисертаційній роботі для вивчення вмісту та локалізації mTOR були використані комерційні антитіла проти N-кінцевої, C-кінцевої та центральної ділянки молекули mTOR.

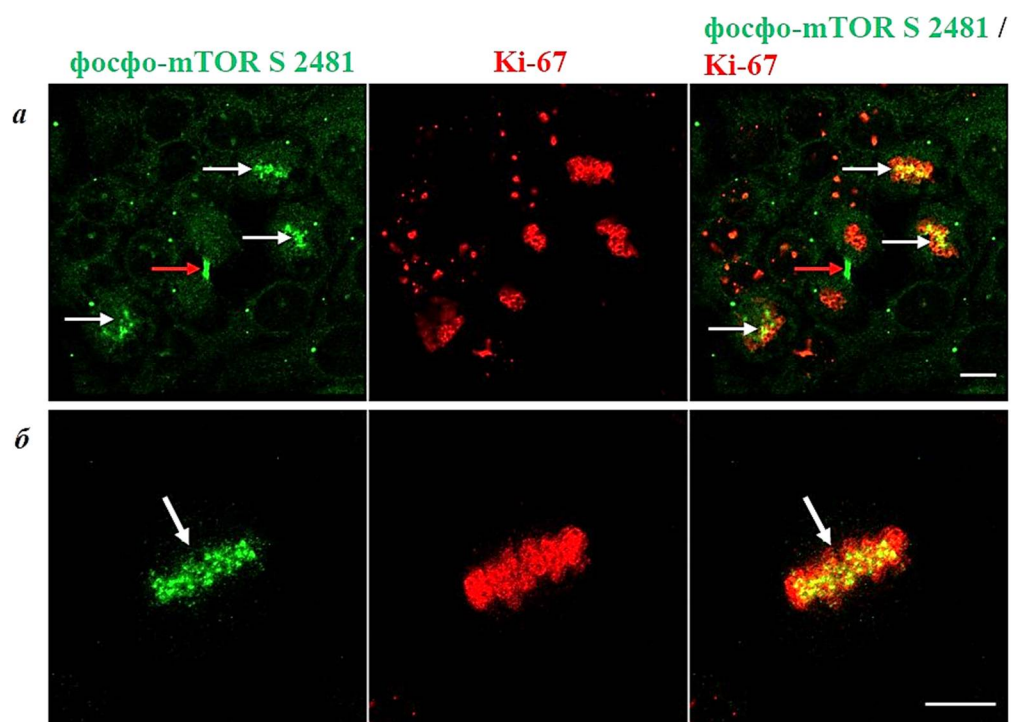
За допомогою імунофлуоресцентного аналізу було встановлено, що протеїнкіназа mTOR розташовується дифузно у цитоплазмі мітотичних клітин (рис. 3.18). Значного збільшення внутрішньоклітинного вмісту mTOR під час поділу порівняно з інтерфазними клітинами виявлено не було. Реакція отримана з використанням антитіл до різних епітопів кінази mTOR не мала суттєвих відмінностей (рис. 3.18).



**Рис. 3.18.** Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинного вмісту і локалізації протеїнкінази mTOR (зелений) у мітотичних клітинах лінії MCF-7: *а* – детекція mTOR за допомогою антитіл проти центральної частини кінази; *б* – аналіз вмісту mTOR за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули; *в* – визначення кінази mTOR з використанням антитіл проти N-кінцевої частини білка. Ядра клітин були дофарбовані ДНК-зв'язувальним барвником Hoechst 33342 (синій). Стрілки вказують на клітини на стадії поділу. Масштаб 10 мкм



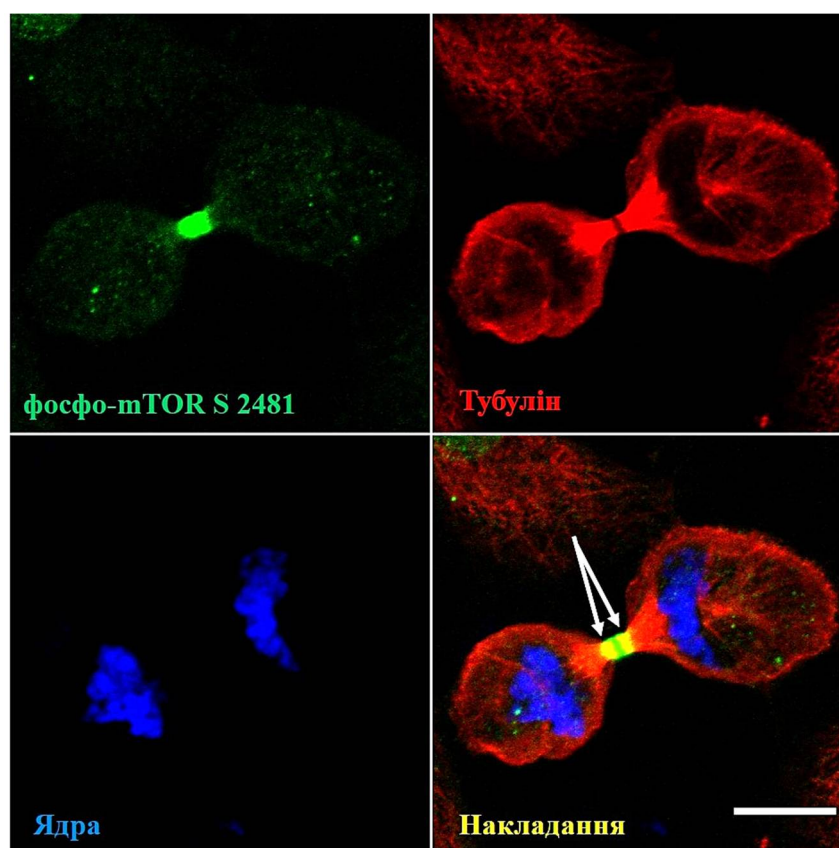
Для дослідження ролі активованої кінази mTOR у проліферуючих клітинах лінії MCF-7 було проведено подвійний імуофлуоресцентний аналіз із застосуванням антитіл проти білка Ki-67 як маркера проліферації. Було встановлено, що реакція на фосфо-mTOR S 2481 була дуже слабкою або відсутньою у клітинах на стадії інтерфази, тоді як у мітотичних клітинах було виявлене яскраве забарвлення, що значно змінювало своє внутрішньоклітинне розташування залежно від фази мітозу (рис. 3.19).



**Рис. 3.19.** Подвійне імуофлуоресцентне визначення внутрішньоклітинної локалізації та вмісту фосфо-mTOR S 2481 (зелений) та маркера проліферації, антигена Ki-67 (червоний) у мітотичних клітинах лінії MCF-7: *a* – мікрофотографія клітин MCF-7 з використанням об. 40х. Білі стрілки вказують на співлокалізацію фосфо-mTOR S 2481 із конденсованими хромосомами у метафазних клітинах. Червона стрілка вказує на локалізацію фосфо-mTOR S 2481 у серединній перетяжці клітини на стадії телофази. Масштаб 10 мкм; *б* – мікрофотографія клітини MCF-7 на стадії метафази мітозу з використанням об. 100х. Стрілка вказує на співлокалізацію фосфо-mTOR S 2481 із конденсованими хромосомами у метафазній пластинці. Масштаб 10 мкм

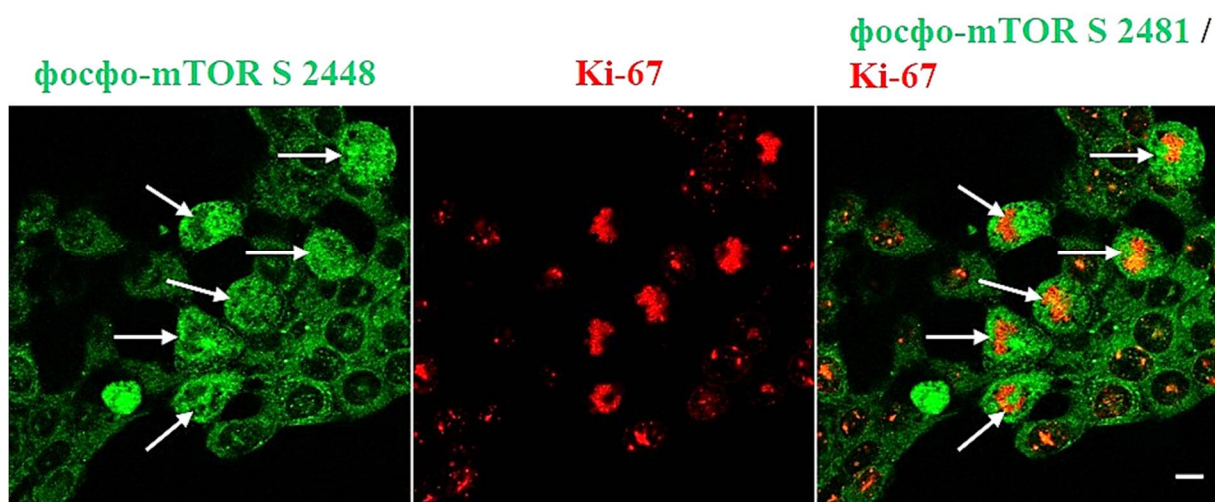
Фосфорильована форма кінази фосфо-mTOR S 2481 була виявлена у серединній перетяжці клітин, які знаходились на стадіях анафази і телофази мітозу (рис. 3.19. *a*). Отримані дані узгоджуються із результатами попередніх досліджень (123). Однак, нами вперше було задетектовано наявність яскравої гранулоподібної реакції, яка співлокалізувалася з плечами конденсованих метафазних хромосом (рис. 3.19. *a, б*).

Крім того, вперше була виявлена співлокалізація фосфо-mTOR S 2481 з тубуліном у серединній перетяжці клітин, які знаходились на стадіях анафази і телофази мітозу (рис. 3.20). Що дозволяє припускати важливу роль фосфорильованої форми mTOR у процесі цитокінезу.



**Рис. 3.20.** Подвійний імуофлуоресцентний аналіз співлокалізації фосфо-mTOR S 2481 (зелений) та тубуліну (червоний) у серединній перетяжці клітини на стадії телофази мітозу. ДНК дофарбована барвником Hoechst 33342 (блакитний). Стрілка вказує на ділянки співлокалізації досліджуваних білків. Масштаб 10 мкм

Аналіз вмісту і локалізації білка mTOR, фосфорильованого за залишком Серину 2448 (фосфо-mTOR S 2448) виявив підвищення внутрішньоклітинного вмісту фосфо-mTOR S 2448 під час проходження мітозу (рис. 3.21). Серин 2448 є сайтом фосфорилювання кінази S6K1. Отримані результати можуть вказувати на те, що підвищення вмісту S6K1 у проліферуючих клітинах може призводити до загальної активації mTOR/S6K1 сигналіngu під час поділу.



**Рис. 3.21.** Подвійний імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації та вмісту фосфо-mTOR S 2448 (зелений), та маркера проліферації, антигена Ki-67 (червоний) у мітотичних клітинах лінії MCF-7. Стрілки вказують на клітини на стадії поділу. Масштаб 10 мкм

Таким чином, було виявлено суттєве зростання внутрішньоклітинного вмісту протеїнкінази S6K1 у клітинах лінії MCF-7 на усіх стадіях мітозу. Встановлено, що описане явище може бути пов'язаним із активацією mTOR кінази та її фосфорилюванням за сайтом Серин 2448 у мітотичних клітинах. Також вперше показано співлокалізацію фосфорильованої форми білка mTOR, а саме фосфо-mTOR S 2448 з конденсованими хромосомами під час метафази, що ймовірно вказує на важливу неканонічну функцію mTOR/S6K1 сигнального каскаду у регуляції поділу клітин.

**Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:**

1. 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.
2. **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.
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.
4. **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.
5. **Kukharchuk V.**, Cherednyk O., Tykhonkova I., Khoruzhenko A., Filonenko V. Immunocytochemical analysis of subcellular localisation and content of S6 kinases during cell cycle progression // 35th FEBS Congress. – Gothenburg, Sweden. – 2010. – P. 125.
6. Cherednyk O., **Kukharchuk V.**, Khoruzhenko A., Filonenko V. Proliferation of rat thyrocytes and MCF-7 cells is accompanied by increased expression of of ribosomal protein S6 kinases S6K1 and S6K2 // 35th Annual Meeting of the European Thyroid Association. – Krakow, Poland. – 2011. – P 190.
7. **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”. – Wroclaw, Poland. – 2016 – P. 68.



8. **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.
9. **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.
10. **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.

### 3.3. Отримання та характеристика стабільних клітинних ліній MCF-7 із вибірковою експресією ізоформ S6K1

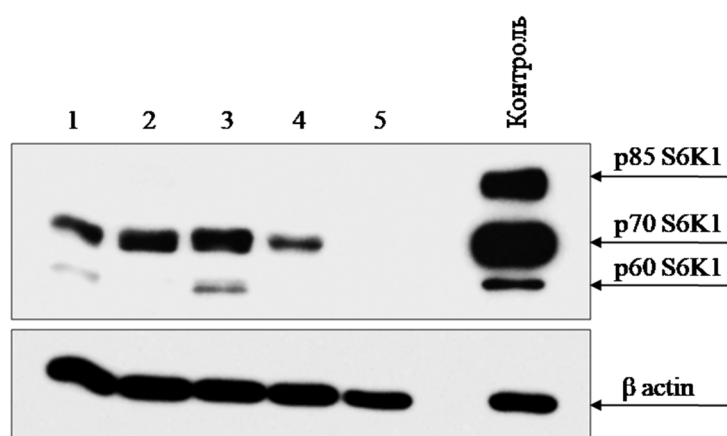
#### 3.3.1. Отримання клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та

**MCF-7 p85-/p70-/p60+.** Наразі у клітинах ссавців ідентифіковано низку ізоформ протеїнкінази S6K1, а саме: p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. На відміну від двох перших ізоформ, залишається невідомою роль p60S6K1 як 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. gRNA олігонуклеотиди комплементарні до послідовності *RPS6K1* гена були люб'язно надані м.н.с. відділу сигнальних систем клітини інституту молекулярної біології і генетики НАН України Зайцем І. В. Клітини лінії MCF-7 були трансфіковані конструктами CRISPR/Cas9 та селектовані як описано у Матеріалах і методах. Після селекції було відібрано 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.

Встановлено, що у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- експресія усіх ізоформ суттєво знижувалась в усіх клонах порівняно з контролем (рис. 3.22). При цьому спостерігалось повне пригнічення експресії p85S6K1 у клонах 1-5. Також було виявлено повне (клони 2,4,5) або значне (клони 1,3) зниження вмісту p60S6K1 порівняно з клітинами дикого типу. Ізоформа p70S6K1 характеризувалась суттєвим зниженням рівня експресії у клонах 1-4, тоді як її повна відсутність встановлена у клоні 5. Таким чином, повне вимкнення генів S6K1 було

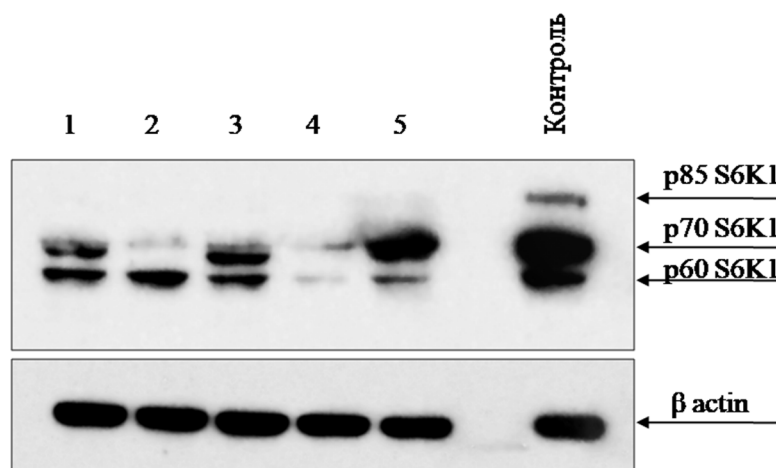
досягнутим у клоні №5. Із літературних даних відомо, що клітини лінії MCF-7 містять підвищену кількість копій гену *RPS6K1*, внаслідок ампліфікації ділянки хромосоми 17q22-24. Крім того, незначна гетерогенність за кількістю хромосом може спостерігатись всередині популяції самої клітинної лінії MCF-7. 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-.



**Рис. 3.22.** Вестерн-блот аналіз експресії ізоформ кінази S6K1 у клонах стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60-, отриманих після редагування гену *RPS6K1* системою CRISPR/Cas9. Детекцію білка S6K1 у лізатах проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1.  $\beta$  актин був використаний у якості контролю нанесення зразків. 1-5 – клони стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60-; контроль – клітини MCF-7 дикого типу

Для виокремлення та характеристики ролі саме p60S6K1 у життєдіяльності клітин, актуальним вбачається створення клітинної лінії, яка дозволить вивчення p60S6K1 без впливу інших ізоформ кінази S6K1. Така клітинна лінія була отримана. Вестерн-блот аналіз лізатів стабільної лінії MCF-7 p85-/p20-/p60+ виявив експресію p60S6K1 у всіх отриманих клонах (рис. 3.23). Також було детектовано повну відсутність експресії p85S6K1 та значно знижений рівень p70S6K1, що дозволить використовувати отримані клітини як модель для

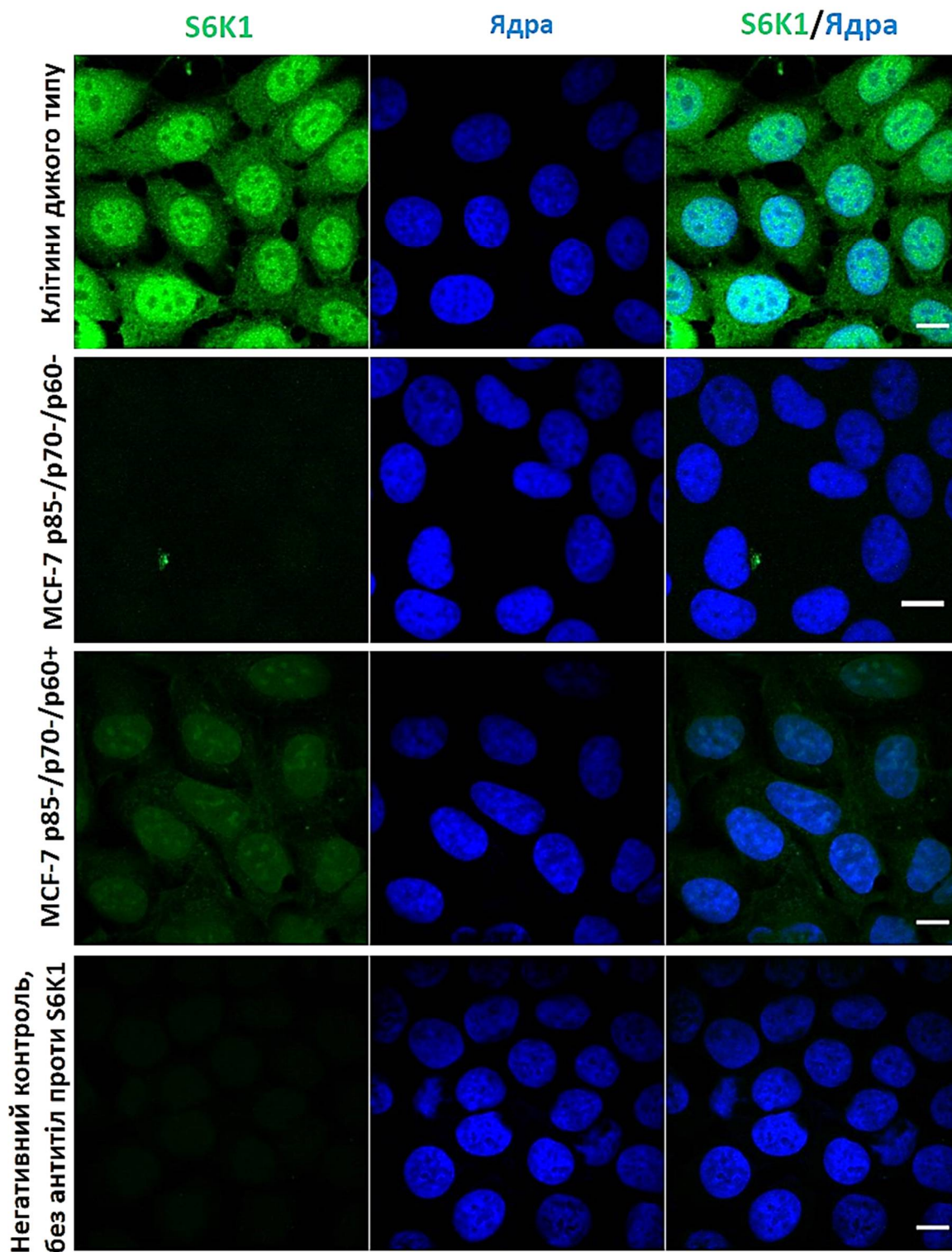
дослідження функцій ізоформи p60S6K1 у зляквіснотрансформованих клітинах. Для подальшої роботи було обрано клон №2, у клітинах якого рівень експресії p60S6K1 був максимальним, а p85S6K1 та p70S6K1 мінімальними у порівнянні із іншими клонами.



**Рис. 3.23.** Вестерн-блот аналіз експресії ізоформ кінази S6K1 у клонах клітин лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+, отриманих після редагування гену *RPS6K1* системою CRISPR/Cas9. Детекцію білка S6K1 у лізатах проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1.  $\beta$  актин був використаний у якості контролю нанесення зразків. 1-5 – клони стабільної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+; контроль – клітини MCF-7 дикого типу.

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 кінази S6K1 у клітинах раку молочної залози.

**3.3.2. Характеристика клітинних ліній MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+.** З метою подальшого використання отриманих клітинних ліній був проведений імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинного вмісту та локалізації протеїнкінази S6K1 з наступною конфокальною мікроскопією (рис. 3.24).

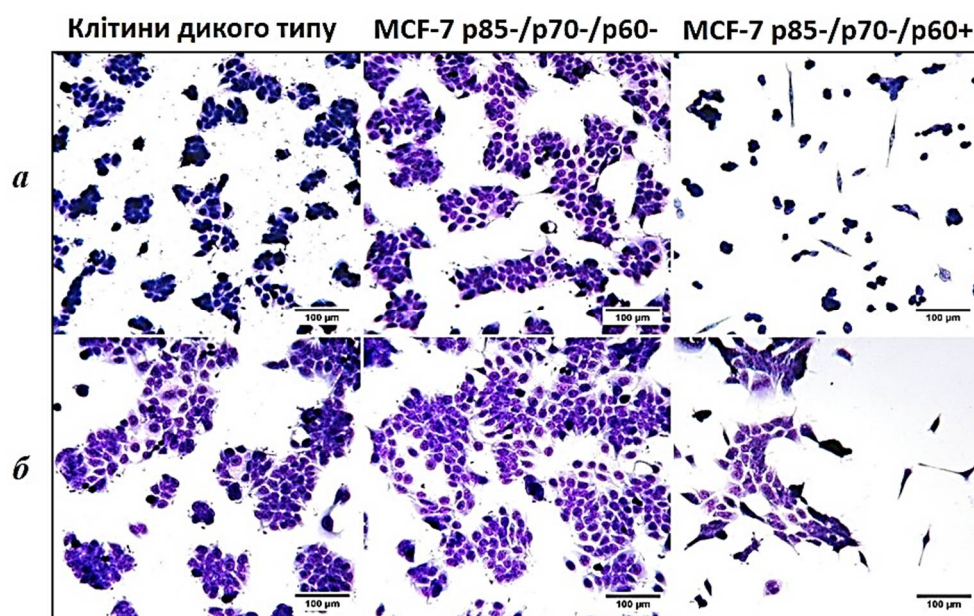


**Рис. 3.24.** Імунофлуоресцентний аналіз вмісту та локалізації кінази S6K1 у клітинах MCF-7 після редагування гену *RPS6K1* системою CRISPR/Cas9. Детекцію білка S6K1 проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1 (зелений). ДНК клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (синій). Масштаб 10 мкм



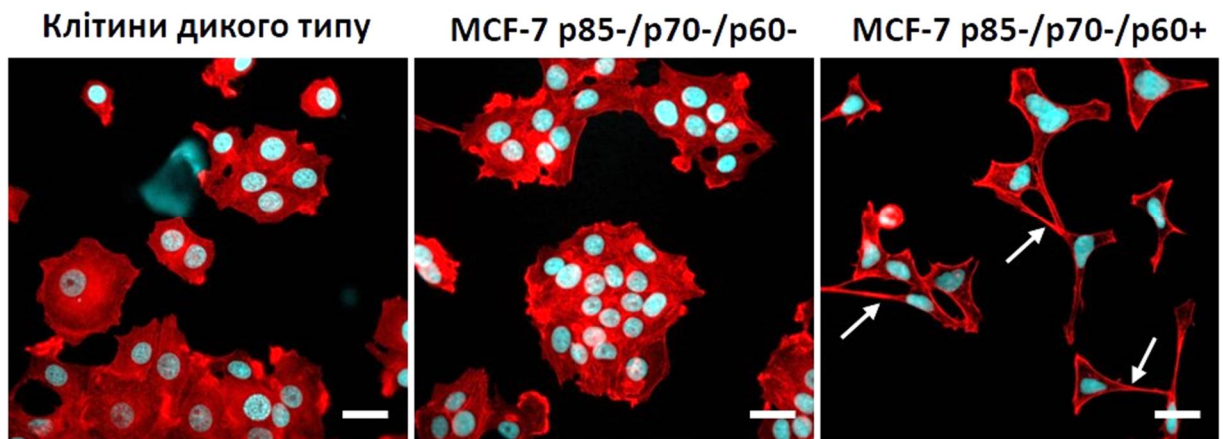
Усі зображення були отримані за однакових налаштувань конфокального мікроскопу Zeiss LSM 510 (Німеччина), що дає можливість порівнювати їх між собою. Імунофлуоресцентний метод підтвердив пригнічення експресії усіх ізоформ S6K1 у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60-. Тоді як клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризувалися слабкою, здебільшого ядерною позитивною реакцією проти S6K1, що корелює з попереднім Вестерн-блот аналізом.

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. Вони мали характерну епітеліальну, багатогранну форму та формували окремі острівці клітин за рахунок міжклітинних контактів. Однак, клітинна лінія зі збереженою експресією p60S6K1 MCF-7 p85-/p70-/p60+ характеризувалась появою видовжених клітин, що значно відрізнялось від морфології клітин дикого типу (рис 3.25).



**Рис. 3.25.** Мікропрепарати клітин дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ забарвлених за методом Май-Грюнвальда з візуалізацією через 24 год (а) та 48 год (б) після початку культивування. Масштаб 100 мкм

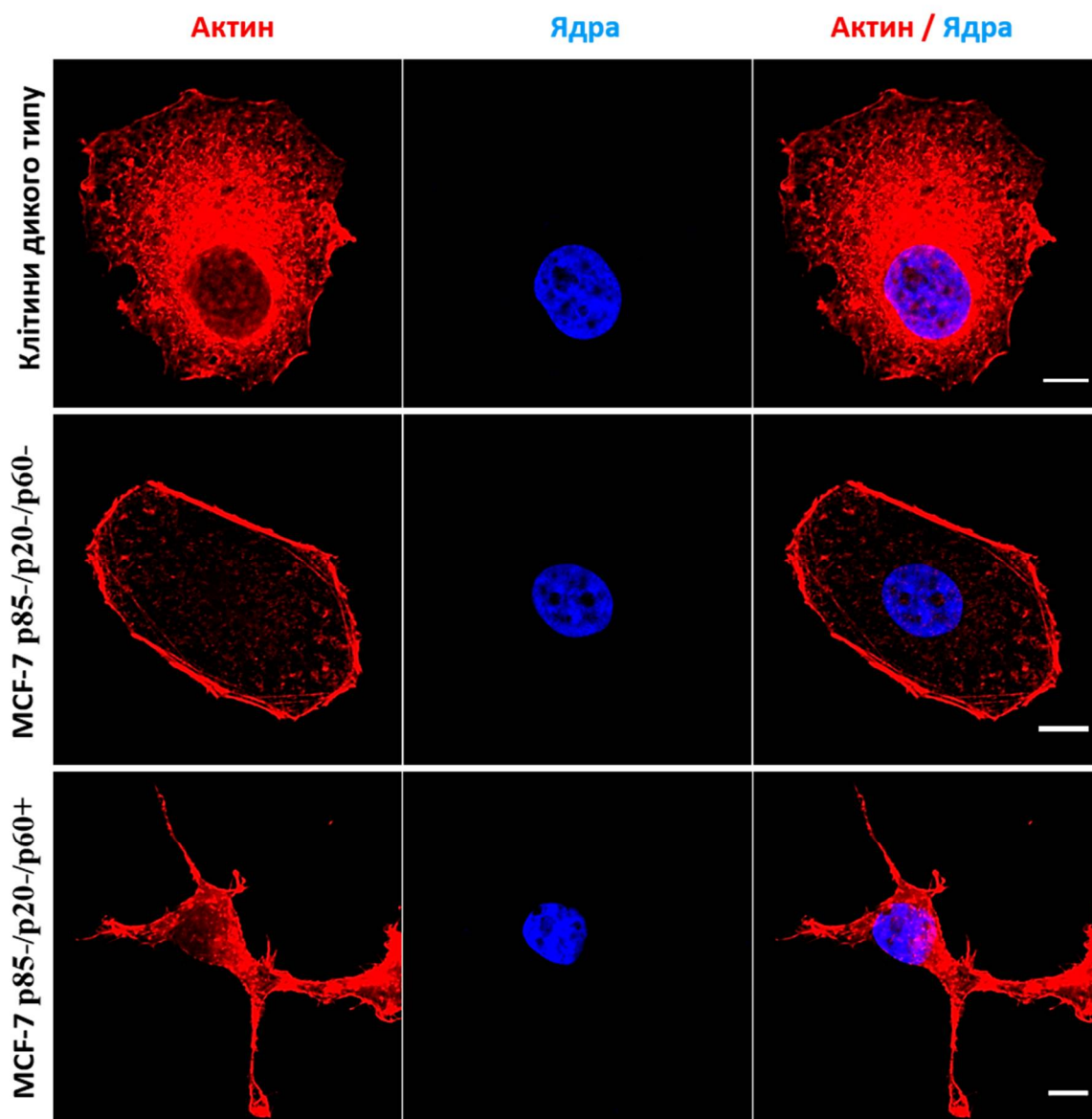
Подібні зміни морфологічних рис безпосередньо зумовлені, або близько пов'язані із суттєвими перебудовами цитоскелету. З літературних даних відомо, що протеїнкіназа S6K1 залучена до регуляції архітектури актинового цитоскелету (124). Однак, роль p60S6K1 у цьому процесі залишається недослідженою. Тому на наступному етапі роботи ми візуалізували мікрофіламенти у клітинах отриманих стабільних ліній MCF-7 (рис. 3.26).



**Рис. 3.26.** Мікропрепарати клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>-</sup> та MCF-7p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>+</sup>. Актиновий цитоскелет (червоний) забарвлений за допомогою фалоїдину, міченого тетраметилродамином (TRITC). Ядра (блакитний) дофарбовували барвником Hoechst 33342. Масштаб становить 25 мкм. Стрілки вказують на клітини зі зміненою морфологією

Клітини дикого типу мали характерну, полігональну, епітеліоподібну форму. Вони переважно росли у щільних групах клітин, що є типовим для даної клітинної лінії. MCF-7 p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>-</sup> не мали суттєвих відмінностей у морфології порівняно з клітинами дикого типу. Вперше показано, що клітини лінії MCF-7 p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>+</sup>, які експресують лише ізоформу p60S6K1, втрачали морфологію, властиву для епітеліальних клітин. Натомість, вони набували витягнутої форми та характеризувались фібробластоподібним ростом без утворення кластерів клітин (рис. 3.25 та рис. 3.26).

Слід зазначити, що характер забарвлення актинових філаментів у контрольних та досліджуваних клітинних лініях суттєво відрізнявся. Мікрофіламенти клітин дикого типу демонстрували яскраве перинуклеарне забарвлення, крім філаментів чітко вирізнявся кортикальний актин, також мікрофіламенти виявлені у значній кількості у складі виростів цитоплазми лідируючого краю клітин (рис. 3.27).



**Рис. 3.27.** Мікропрепарати поодиноких клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>-</sup> та MCF-7 p85<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p60<sup>+</sup>. Актиновий цитоскелет (червоний) забарвлений за допомогою фалоїдину, міченого тетраметилпродаміном (TRITC). Ядра (блакитний) дофарбовували барвником Hoechst 33342. Масштаб 10 мкм



MCF-7 p85-/p70-/p60- характеризувались яскраво вираженими волокнами кортикального актину. Натомість, MCF-7 p85-/p70-/p60+ мали витягнуту форму та тонкі вирости цитоплазми, що ускладнювало аналіз архітектури актинового цитоскелету у цій клітинній лінії (рис. 3.27). Крім того, MCF-7 p85-/p70-/p60+ мали тенденцію до поодинокого дифузного росту клітин за умов моношарової культури.

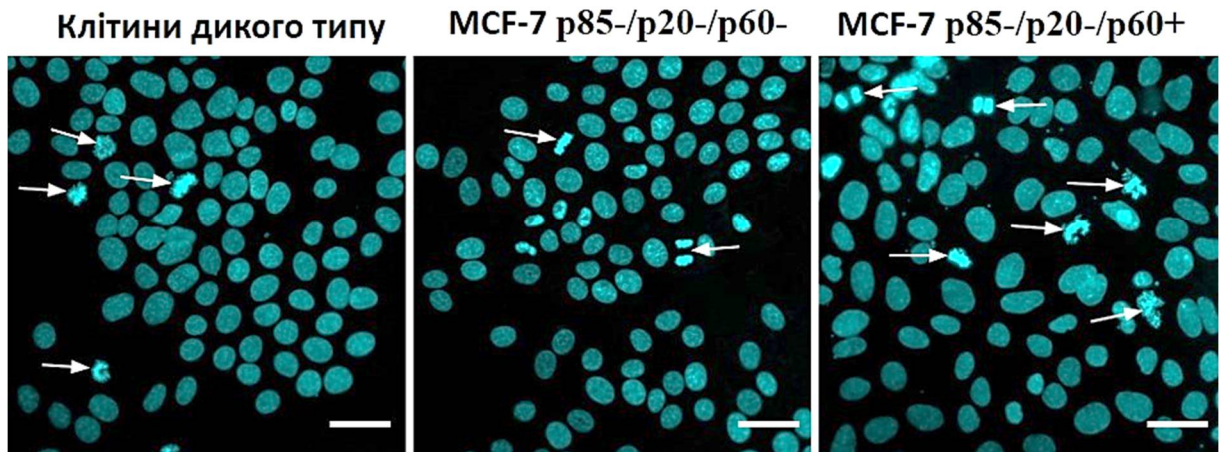
Зміна форми клітин на фібробластоподібну є однією із ознак епітеліально-мезенхімального переходу. При цьому пухлинні клітини часто набувають здатності до вищої швидкості міграції та інвазії.

Отримані результати вказують на актуальність дослідження ролі протеїнкінази S6K1 у формуванні таких структур актинового цитоскелету, як філоподії, ламелоподії та подосоми з урахуванням існування різних ізоформ S6K1.

Отже, імунофлуоресцентний аналіз підтвердив дані методу Вестерн-блоту та виявив майже повну відсутність експресії ізоформ протеїнкінази S6K1 у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60-. Більш того, він встановив, що p60S6K1 має ядерну локалізацію у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+. 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.

**3.3.3. Мітотичний індекс 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. З літературних даних відомо, що поширений МТТ тест для визначення проліферації і виживаності клітин значною мірою залежить від метаболічної активності мітохондрій. Оскільки стан та функціонування мітохондрій в отриманих клітинних лініях невивчені, що може вплинути на результати тесту, було вирішено замінити МТТ тест аналізом мітотичного індексу.

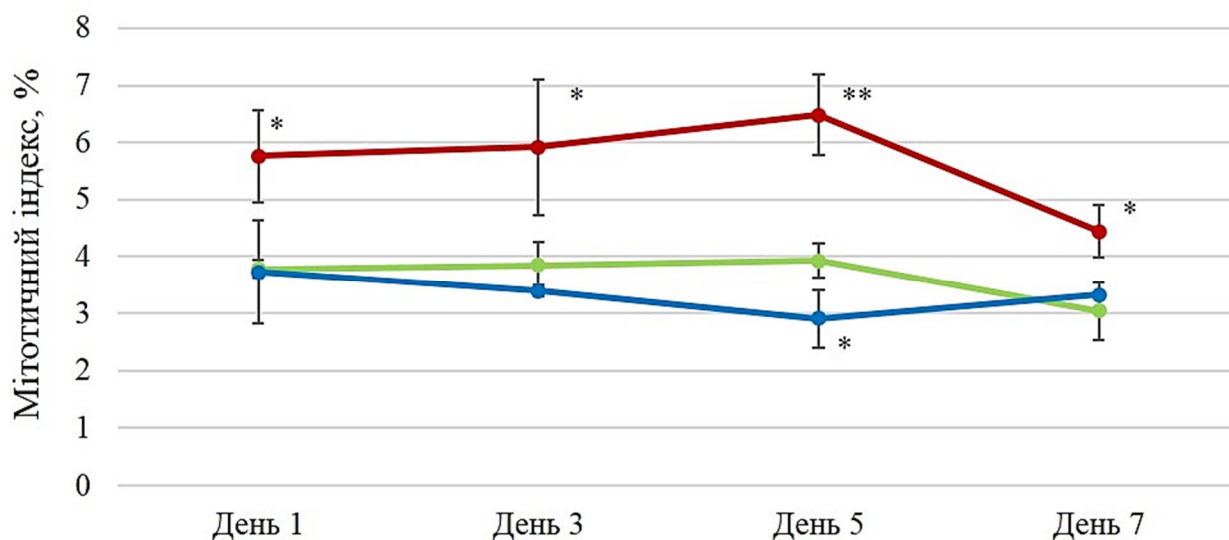
Відмінності у здатності до поділу клітин було проаналізовано якісно (рис. 3.28) і кількісно (рис. 3.29). Визначення мітотичного індексу виявило зниження швидкості проліферації клітини MCF-7 p85-/p70-/p60- у порівнянні із клітинами дикого типу, що узгоджується із даними літератури.



**Рис. 3.28.** Мікропрепарати клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7p85-/p70-/p60+. Ядра (блакитний) дофарбовували барвником Hoechst 33342. Конденсовані хромосоми клітин у фазі мітозу вказані стрілками. Масштаб 25 мкм

Вперше показано, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ із збереженою експресією p60S6K1 характеризувались підвищеним рівнем мітотичної активності у порівнянні із клітинами дикого типу (рис. 3.29). Разом із попередніми результатами це дозволяє припустити потенційні онкогенні властивості даної ізоформи.

Так, на 5-ий день культивування мітотичний рівень MCF-7 p85-/p70-/p60+ був приблизно в 1,6 разів вищий за мітотичний рівень MCF-7 дикого типу. Отримані результати ставлять питання, чи збільшений мітотичний індекс викликаний підвищенням біосинтезу білка, чи виконанням p60S6K1 неканонічних функцій mTOR/S6K1 сигналіngu в процесі мітозу клітин.

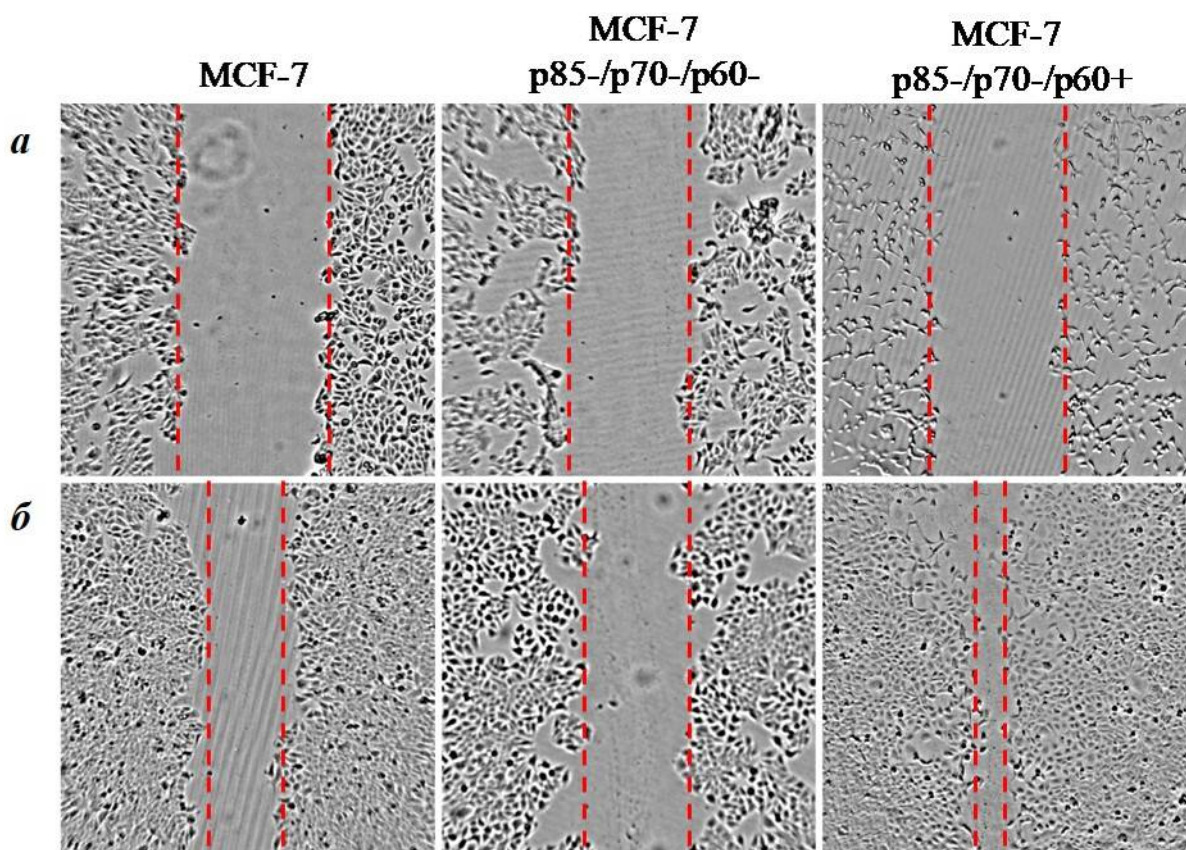


**Рис. 3.29.** Діаграма мітотичного індексу клітин MCF-7 дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7p85-/p70-/p60+ на 1, 3, 5 та 7 дні культивування. Експеримент повторювали 4 рази. \* -  $p \leq 0,05$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ . —●— Клітини дикого типу; —●— MCF-7 p85-/p70-/p60-; —●— MCF-7p85-/p70-/p60+

**3.3.4. Вивчення потенціалу отриманих клітинних ліній до міграції за методом раневої поверхні.** У попередніх розділах рукопису було встановлено, що пригнічення mTOR/S6K1 сигналіngu за допомогою антибіотика рапаміцину призводить до зниження швидкості міграції клітин MCF-7 за умов *in vitro*. Більш того, був виявлений зв'язок між внутрішньоклітинною локалізацією кінази S6K1 та міграцією клітин. Однак, роль різних ізоформ S6K1 у регуляції рухливості клітин наразі невідома.

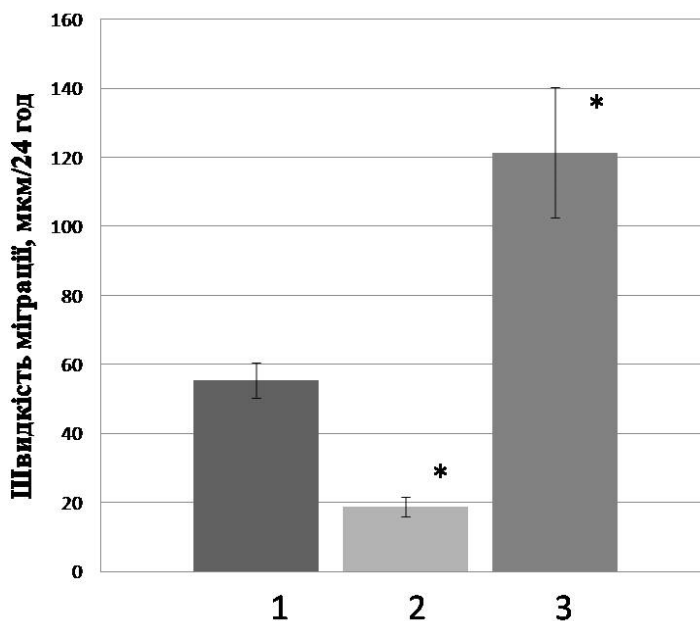
Для вивчення участі ізоформ S6K1 у процесах міграції клітин отримані клітинні лінії MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ були використані для аналізу швидкості міграції за допомогою методу раневої поверхні (рис. 3.30).

Відстань, яку клітини промігрували, вимірювали через 24 год. після проведення подряпини, щоб зменшити вплив проліферації клітин.



**Рис. 3.30.** Дослідження швидкості міграції клітин MCF-7, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ за допомогою метода раневої поверхні: *а* – мікрофотографії раневої поверхні одразу після проведення подряпини; *б* – мікрофотографії раневої поверхні через 24 год. Об. 25х, ок.10х

Подальший 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. 3.31).



**Рис. 3.31.** Діаграма швидкості міграції клітин. 1 –MCF-7; 2 –MCF-7 p85-/p70-/p60- та 3 –MCF-7 p85-/p70-/p60+. \* -  $p \leq 0,01$

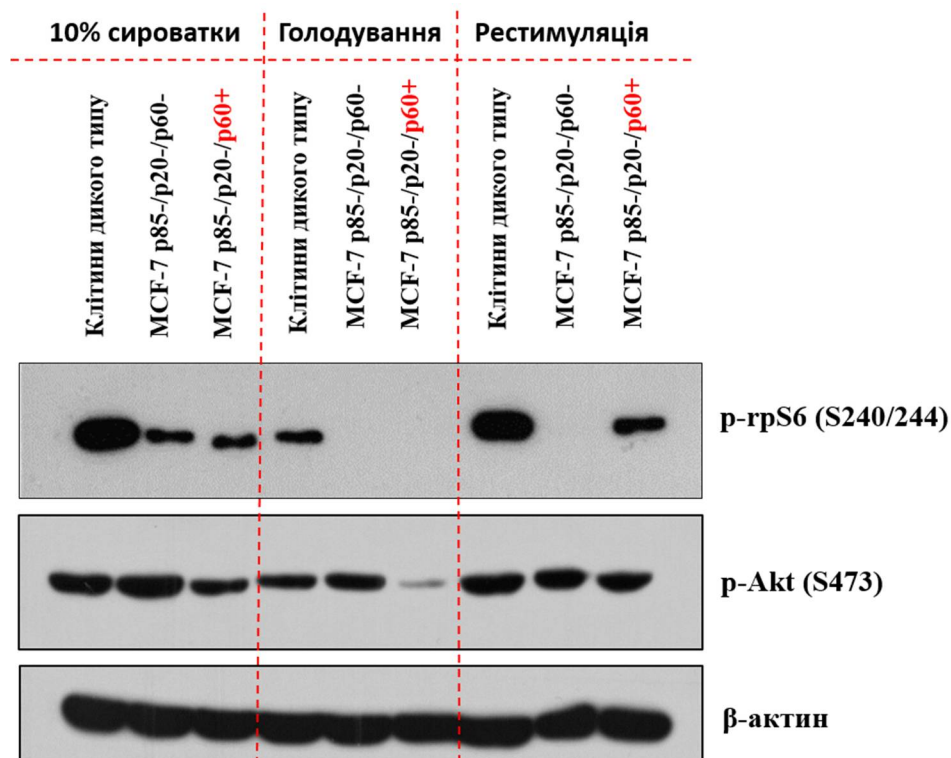
Отже, отримані результати підтвердили залучення протеїнкінази S6K1 до регуляції міграції клітин. А також дозволяють припустити, що зміщення експресії ізоформ S6K1 у бік p60S6K1 може призводити до онкогенної трансформації епітеліальних клітин.

### 3.3.5. 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. Вивчення цього питання дозволило б як більш повно охарактеризувати дані клітини, так і зрозуміти, чи онкогенна дія ізоформи p60S6K1 спричинена порушенням функціонування mTOR/S6K1 сигнального каскаду.

Основним маркером кіназної активності протеїнкінази S6K1 є фосфорилування рибосомального білка S6 (rpS6). На рис. 3.32 представлено Вестерн-блот аналіз рівня фосфорилування rpS6.





**Рис. 3.32.** Вестерн-блот аналіз вмісту фосфорильованих форм деяких мішеней mTOR/S6K1 сигнального каскаду. Аналізували клітини, що культивувалися за стандартних умов і наявності 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Для експериментального моделювання умов голодування клітини культивували у поживному середовищі без сироватки протягом 24-х годин. Після чого збіднене середовище змінювали на повне поживне середовище на 1 годину для рестимуляції активності mTOR/S6K1 сигнального шляху. У якості контролю нанесення використовували β-актин

За стандартних умов культивування при додаванні 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби фосфорилування рpS6 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. Такий ефект можна пояснити тим, що фосфорилування рибосомального білка рpS6 у клітинах регулюється в меншій мірі такими кіназами, як RSK та S6K2. Вони можуть частково компенсувати відсутність S6K1 в отриманих клітинних лініях. Фосфорилування рpS6 зникало

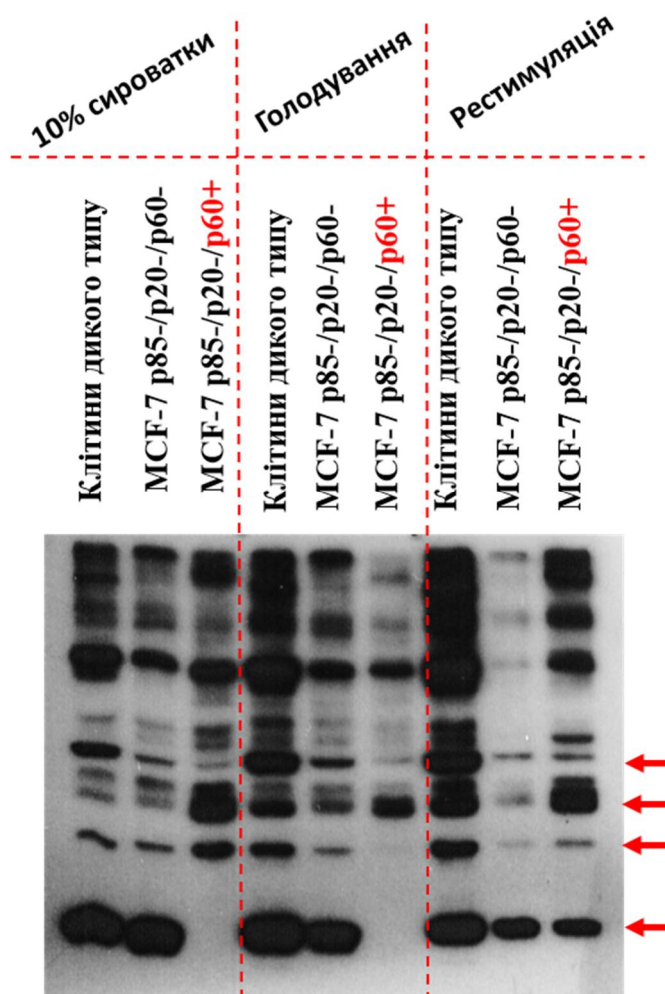
повністю в клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+ при культивуванні за умов голодування – відсутності сироватки в поживному середовищі протягом 24-х годин, тоді як в клітинах дикого типу воно значно зменшувалось порівняно із стандартними умовами (рис. 3.32).

При додаванні сироватки після голодування на 1 години початковий рівень фосфорилування відновлювався в MCF-7 p85-/p70-/p60+ та в клітинах дикого типу. MCF-7 p85-/p70-/p60- не відновлювали попередній рівень фосфорилування рибосомального білка, що може вказувати на те, що 1 години рестимуляції недостатньо за повної відсутності експресії кінази S6K1.

Ще одним маркером активності mTOR/S6K1 сигнального шляху є фосфорильована форма протеїнкінази Akt (p-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 p-Akt S473 за стандартних умов та під час голодування порівняно із клітинами дикого типу (рис. 3.32).

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. 3.33).

За допомогою Вестерн-блот аналізу із застосуванням комерційної суміші антитіл проти фосфорильованих субстратів Akt вдалося встановити, що MCF-7 p85-/p70-/p60+ мають значні відмінності у рівні фосфорилування низки білків (Рис.3.33, 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.



**Рис. 3.33.** Вестерн-блот аналіз рівня фосфорилування мішеней протеїнкінази Akt у клітинах дикого типу, MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 p85-/p70-/p60+. Аналізували клітини, що культивувалися за стандартних умов і наявності 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Для експериментального моделювання умов голодування клітини культивували у поживному середовищі без сироватки протягом 24-х годин. Після чого збіднене середовище змінювали на повне поживне середовище на 1 годину для рестимуляції активності mTOR/S6K1 сигнального шляху. Стрілками відмічено різницю у фосфорилуванні мішеней Akt між MCF-7 p85-/p70-/p60+ та клітинами дикого типу

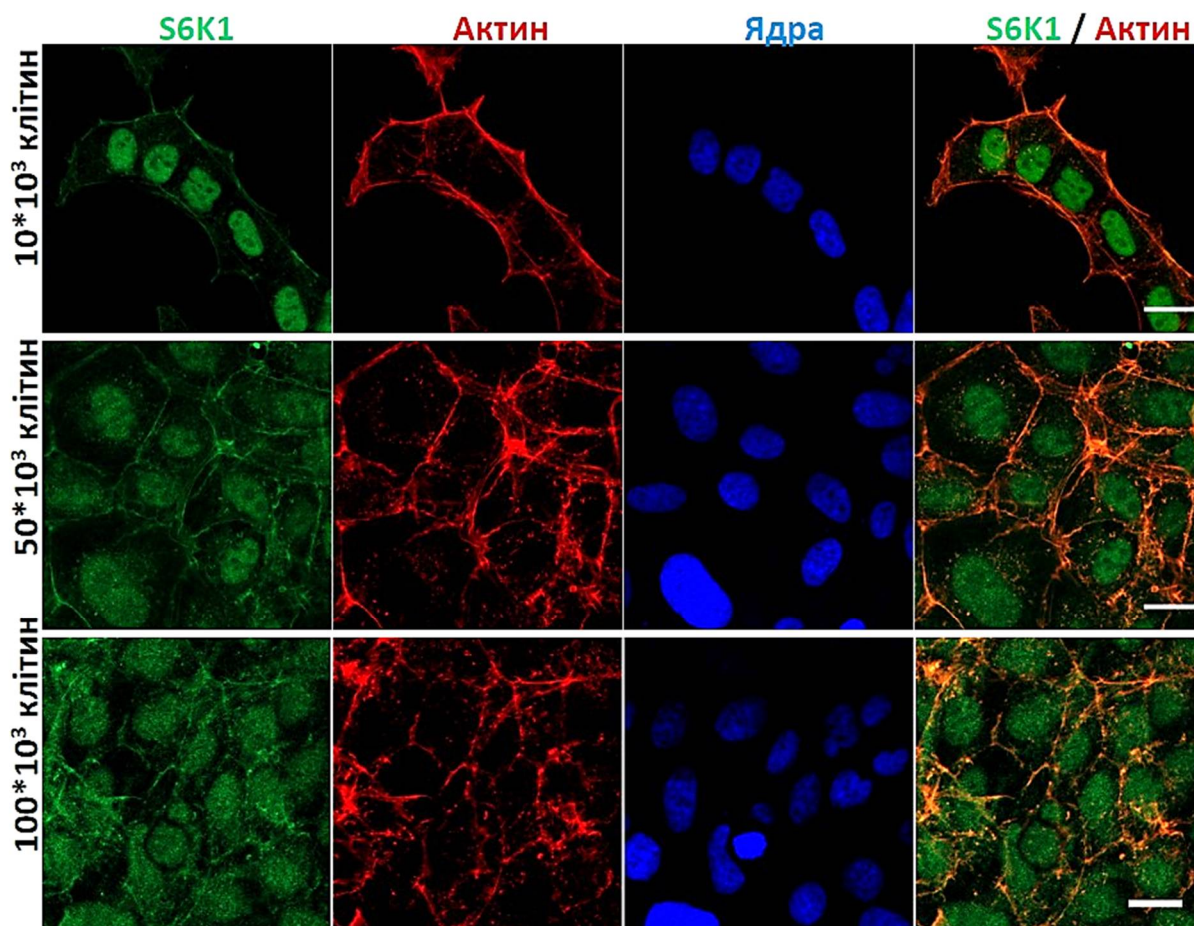


**3.3.6. Внутрішньоклітинна локалізація ізоформи p60S6K1 за різної щільності моношару клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+.** Вперше у дисертаційній роботі за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки протеїнкінази S6K1, які розпізнають три ізоформи даної кінази, було показано, що внутрішньоклітинна локалізація S6K1 залежить від щільності моношару клітин. Так, при концентрації  $10 \cdot 10^3$  клітин на лунку 24-х лункової плати (TPP, Швейцарія) спостерігалась ядерна локалізація кінази, тоді як при концентрації  $100 \cdot 10^3$  клітин на лунку, що відповідало конфлюентному моношару, S6K1 переміщувалась до цитоплазми.

Щоб вивчити, чи властиве таке явище для ізоформи p60S6K1 клітини лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ були культивовані за різної щільності та проаналізовані за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1 (рис. 3.34).

Вперше показано, що внутрішньоклітинна локалізація ізоформи p60S6K1 не залежить від щільності моношару клітин. На відміну від основного пулу кінази, p60S6K1 була виявлена у ядрі клітин як при низькій концентрації клітин, так і при конфлюентному моношарі.

Таким чином, за допомогою CRISPR/cas9 системи редагування геному було отримано 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+). Отримані клітинні лінії було охарактеризовано та верифіковано за допомогою Вестерн-блот та імунофлуоресцентного аналізів. Вони можуть бути використані у якості моделей для дослідження функцій окремих ізоформ кінази S6K1 у клітинах раку молочної залози. Вперше було показано, що самостійна експресія ізоформи p60S6K1 призводила до зміни морфології клітин із епітеліальної на фібробластоподібну, викликала підвищення мітотичного індексу та значне зростання швидкості міграції. Це дозволяє припустити наявність потенційних онкогенних властивостей p60S6K1.



**Рис. 3.34.** Мікропрепарати клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+, що були культивовані за різної щільності. Детекцію білка S6K1 проводили з використанням антитіл проти С-кінцевої ділянки молекули S6K1 (зелений). Цитоплазматичний компартмент (червоний) візуалізували шляхом зв'язування актину фалоїдином, міченим тетраметилродаміном (TRITC). ДНК клітин дофарбовували барвником Hoechst 33342 (синій). Масштаб 10 мкм

Результати досліджень, представлені у цьому підрозділі, опубліковані у наступних роботах:

1. Tereschenko 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.

2. Tereshchenko Y.S., **Kosach V.R.**, Zaiets I.V., Khorushenko 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.
3. **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.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

mTOR/S6K1 сигнальний шлях бере участь у регуляції цілої низки процесів у клітинах людини, таких як біосинтез білка, транскрипція генів, біогенез рибосом, білковий фолдинг та ін. Ампліфікація гена, який кодує S6K1, та зростання експресії даної кінази спостерігається у клітинах новоутворень молочної залози людини. Більш того, зміни ядерно-цитоплазматичного розподілу протеїнкінази S6K1 в бік накопичення у ядрах, потенційно можуть вказувати на резистентність до терапії протипухлинними препаратами та гірший прогноз для пацієнтів (125–127). Тому вивчення закономірностей внутрішньоклітинної локалізації S6K1 та причин її зміни є актуальним завданням для дослідників.

Однак, це завдання ускладнюється тим, що S6K1 має низку ізоформ, які утворюються внаслідок альтернативної трансляції іРНК та альтернативного сплайсингу. Найбільш відомими є форми p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 та p31S6K1. На сьогоднішній день, відомостей про роль та регуляцію p60S6K1 майже немає. Тому існує потреба у створенні клітинних і молекулярних систем із вибірковою експресією окремих ізоформ S6K1, що дозволить диференційно вивчити їх функції та ядерно-цитоплазматичний розподіл (12).

Метою представленої роботи було вивчення ролі субклітинної локалізації кіназ mTOR і S6K1 у процесах поділу та міграції клітин аденокарциноми молочної залози людини *in vitro*, та дослідження участі гіпотетичної ізоформи p60S6K1 у регуляції цих процесів.

У попередніх дослідженнях нашого відділу було показано, що ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 відрізняється у нормальній та злоякіснотрансформованій тканинах молочної залози людини. Імуногістологічний аналіз виявив, що у 25% досліджених випадків клітини аденокарциноми молочної залози характеризувались виключно ядерним

розміщенням S6K1, тоді як умовно нормальній оточуючій тканині та клітинам доброякісних пухлин була притаманна цитоплазматична локалізація S6K1. Однак, можливі причини такого явища залишаються невідомими (128,129).

На першому етапі дисертаційної роботи було вивчено ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 у клітинах інвазивної аденокарциноми та оточуючої умовно нормальної тканини молочної залози людини. Було виявлено яскраву реакцію проти S6K1 у ядрах злоякіснотрансформованих клітин, крім того зразки аденокарциноми характеризувались наявністю витягнутих тяжів із пухлинних клітин, які мігрували за межі базальної мембрани. У клітинах оточуючої умовно нормальної тканини S6K1 розташовувалась у цитоплазмі. Ми припустили, що накопичення кінази S6K1 у ядрах може бути пов'язаним із набуттям пухлинними клітинами здатності до міграції та метастазування. Для подальшого дослідження цього питання в умовах 2D та 3D культури клітин ми обрали лінію аденокарциноми молочної залози людини MCF-7. Дана клітинна лінія є добре охарактеризованою та має збільшену експресію кінази S6K1, що робить її зручним інструментом для вивчення mTOR/S6K1 сигналіngu.

Імунофлуоресцентний та імуногістохімічний аналіз трьохвимірних культур клітин MCF-7, а саме сфероїдів, дозволив встановити, що кіназа S6K1 локалізується у цитоплазмі клітин сфероїдів. Однак, у моношаровій культурі із низькою щільністю клітин спостерігалася яскрава ядерна реакція проти досліджуваної протеїнкінази. Отримані розбіжності дозволили нам припустити, що ядерно-цитоплазматичне розташування S6K1 може залежати від щільності клітин у культурі.

Щоб перевірити дану гіпотезу ми провели імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації S6K1 у зразках, які культивувалися за різної концентрації клітин MCF-7: 10 тис.кл/лунку, 50 тис.кл/лунку та 100 тис.кл/лунку. Було виявлено, що за умов 10 тис.кл/лунку ядерна реакція проти S6K1 була яскраво виражена в усіх клітинах. При концентрації 50 тис.кл/лунку з'являлось забарвлення у цитоплазмі клітин, яке детектувалось разом із ядерною реакцією.

Дуже цікаво, що при культивуванні 100 тис.кл/лунку, яке відповідало 100% конфлюентності моношару, ядерне забарвлення майже повністю зникало. Таким чином, ми вперше показали, що ядерно-цитоплазматичний розподіл кінази S6K1 залежить від щільності моношару клітин лінії MCF-7.

Цікаво, що подібне явище було описане у клітинах шкіри людини для ланки сигнального каскаду Hippo, а саме для білка-регулятора транскрипції генів YAP1. Активованій YAP1 розташовується у ядрі клітин, де він запускає транскрипцію генів, які беруть участь у проліферації клітин, і пригнічує зчитування генів, відповідальних за апоптоз. У дорослому організмі в нормі активація і переміщення YAP1 до ядра відбувається на місці пошкоджень шкіри та у деяких проліферуючих клітинах у базальному шарі епідермісу. Однак, у клітинах здорового суцільного шару епідермісу формування міжклітинних контактів веде до інактивації YAP1 та його переміщення до цитоплазми клітин (116,130–132).

На основі цих літературних даних можна припустити, що переміщення кінази S6K1 до ядра у клітинах інвазивної аденокарциноми молочної залози також може бути пов'язаним із регуляцією даною кіназою активності транскрипційних факторів. Так, відомими ядерними мішенями S6K1 є білки CREMt та ER $\alpha$ , які регулюють транскрипцію генів, що відповідають за проліферацію клітин та їх метаболізм. Однак, клітини інвазивної аденокарциноми молочної залози набувають здатності до міграції та формування віддалених метастазів. Тому актуальним є пошук та ідентифікація нових білків-мішеней кінази S6K1, залучених до регуляції локомоторних властивостей клітин.

Для початку ми перевірили, чи зміна ядерно-цитоплазматичного розташування S6K1 буде відбуватись під час міграції клітин лінії MCF-7. Для вивчення міграції за умов *in vitro* було обрано сучасну модель культивування тривимірних сфероїдів на адгезивній поверхні. Клітини MCF-7 мігрували із оформленого сфероїда на адгезивний пластик протягом 24-х та 72-х годин. При цьому у клітинах лідируючого краю з'являлось яскраве ядерне забарвлення проти S6K1 та її активної форми фосфо-S6K1 T389. Таким чином, вперше було

показано, що S6K1 змінює внутрішньоклітинну локалізацію при міграції клітин із тривимірної культури на адгезивний пластик.

На наступному етапі було обрано низку транскрипційних факторів, які беруть участь у регуляції локомоторних властивостей клітин та потенційно залучені до mTOR/S6K1 сигналіngu. Це ERG, CDX2 та TBR2, який також відомий як еомезодермін.

Злиття генів ERG та білка TMPRSS2 часто зустрічається при раку простати. Наразі існує припущення, що надекспресія продукту такого злиття веде до розвитку андроген-нечутливого типу раку шляхом порушення сигналіngu андрогенового рецептора. Більш того, експресія ERG-TMPRSS2 корелює із підвищеною активністю PI3K/mTOR/S6K сигнального каскаду (133,134). Транскрипційний фактор CDX2 залучений до розвитку і диференціації тонкого кишківника. Знижена експресія CDX2 корелює із розвитком раку кишечника пов'язаним із mTOR-залежною хромосомною нестабільністю (135). Фактор TBR2 – основний регулятор диференціації та міграції гліальних клітин у процесі нейрогенезу, диференціації кардіоміоцитів, а також залучений до регуляції рухливості CD8<sup>+</sup> Т клітин імунної системи. Раніше зазначалося, що mTOR сигналінг може моделювати рівень експресії TBR2 у CD8<sup>+</sup> Т клітинах, однак прямої взаємодії TBR2 та ланок mTOR/S6K1 сигнального каскаду виявлено не було (136,137).

Подвійний імунофлуоресцентного аналізу виявив співлокалізацію протеїнкінази S6K1 та транскрипційного фактора TBR2 у клітинах лінії MCF-7. Колокалізація цих двох білків спостерігалася як при низькій щільності, так і при високій щільності моношару клітин. Однак, вищий рівень співлокалізації був встановлений при низькій конфлюентності, коли S6K1 і TBR2 знаходились у ядрі клітини. Отримані результати також були підтверджені за допомогою методу ко-імунопреципітації. Наявність білок-білкових комплексів між ендogenous білками S6K1 і TBR2 було ідентифіковано у лізатах клітин лінії MCF-7, а подальший біоінформатичний аналіз дозволяє припустити можливе фосфорилування TBR2 кіназою S6K1.

Для перевірки припущення щодо здатності S6K1 фосфорилувати TBR2 було проведено біоінформатичний аналіз амінокислотної послідовності TBR2 на присутність потенційних сайтів фосфорилування S6K1 за допомогою програм GPS 2.1 (<http://gps.biocuckoo.org>) та PSP ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)). На основі аналізу отриманих результатів, було передбачено три найбільш ймовірних сайтів фосфорилування для S6K1. А саме: треонін 421, треонін 423, серин 646. Сайти треонін 421 та 423 розташовані у ділянці молекули TBR2, яка відповідає за зв'язування з ДНК. Сайт серин 646 розміщується у домені, який залучений до активації транскрипції. Однак для остаточного підтвердження сайтів фосфорилування та визначення функціональної значимості цього необхідно провести подальші дослідження, а особливо – реакцію *in vitro* фосфорилування пептиду TBR2 та залучити до аналізу пептиди, що містять мутації за зазначеними сайтами фосфорилування.

Отже, нами було показано, що ядерно-цитоплазматичний розподіл протеїнкінази S6K1 зміщується в бік ядерної локалізації під час міграції клітин лінії MCF-7 із 3D культури на адгезивну поверхню. Більш того, вперше було виявлено співлокалізацію та існування білок-білкового комплексу між S6K1 та транскрипційним фактором TBR2, який регулює транскрипцію генів, що відповідають за локомоторні властивості клітин.

Ще однією із ознак злоякісної трансформації клітин є їх необмежений реплікативний потенціал. Неконтрольована проліферація клітин часто є можливою внаслідок порушень у роботі сигнальних каскадів, у тому числі PI3K/mTOR/S6K1 сигналіngu (117,138). Тому одним із завдань дисертаційної роботи було вивчити внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкіназ mTOR та S6K1 на різних стадіях поділу клітин лінії MCF-7.

Для виконання поставленої задачі було охарактеризовано антитіла проти білка Ki-67, отримані раніше у нашій лабораторії. Ki-67 – це ядерний ДНК-зв'язувальний білок, який експресується лише у проліферуючих клітинах. Під час мітозу Ki-67 локалізується на поверхні конденсованих хромосом, що дозволяє специфічно ідентифікувати фазу клітинного циклу, тому антитіла



проти Ki-67 є зручним маркером проліферації та застосовуються в клінічних дослідженнях для визначення мітотичного індексу (139,140). Нами було оптимізовано умови для детекції антигена як у парафінових зрізах, так і в моношаровій культурі клітин. Отримані антитіла при використанні в імуногістохімічній та імунофлуоресцентній реакціях дозволили визначити кожен зі стадій мітозу у клітинах лінії MCF-7 та у клітинах меланоми людини.

Використовуючи антитіла проти Ki-67 як маркер проліферації, нами було досліджено внутрішньоклітинну локалізацію протеїнкіназ mTOR та S6K1 на різних етапах поділу пухлинних клітин лінії MCF-7. Подвійний імунофлуоресцентний аналіз дозволив встановити зростання внутрішньоклітинного вмісту S6K1 у метафазі, анафазі та телофазі мітозу. При цьому спостерігалася дифузна локалізація досліджуваної кінази у клітині. За допомогою імунофлуоресцентного аналізу було встановлено, що протеїнкіназа mTOR розташовується дифузно у цитоплазмі мітотичних клітин.

Крім того, значного збільшення внутрішньоклітинного вмісту mTOR під час поділу порівняно з інтерфазними клітинами виявлено не було. Однак, подальші дослідження активованих форм протеїнкінази показало, що реакція на mTOR, фосфорильований за залишком Серин 2481 була дуже слабкою або відсутньою у клітинах на стадії інтерфази, тоді як у мітотичних клітинах було виявлене яскраве забарвлення, що значно змінювало своє внутрішньоклітинне розташування залежно від фази мітозу. Так, нами вперше було задетектовано наявність яскравої гранулоподібної реакції, яка співлокалізувалася з плечами конденсованих хромосом на стадії метафазі. Також була виявлена співлокалізація mTOR (Ser 2481) з тубуліном у серединній перетяжці клітин, які знаходились на стадіях анафазі і телофазі мітозу. Раніше у літературі вже припускали можливе залучення активованих форм протеїнкінази mTOR до регуляції мітозу (119,141,142). Таким чином отримані результати вказують на важливу роль mTOR/S6K1 сигналіngu у регуляції проліферації пухлинних клітин.

Дослідження протеїнкінази S6K1 ускладнюється тим, що у клітинах ссавців експресується низка високогомологічних ізоформ даного білка. Наразі специфічних антитіл проти p70S6K1 або проти p60S6K1 немає, а їх створення є малоімовірним. Тому актуальним завданням є отримання клітинних ліній із диференційною експресією різних ізоформ.

Використання CRISPR/cas9 системи редагування геному дозволило нам отримати клітинні лінії MCF-7 із вибірковою експресією ізоформ S6K1, а саме: із пригніченою експресією усіх ізоформ кінази (MCF-7 p85-/p70-/p60-) та з експресією лише p60S6K1 (MCF-7 p85-/p70-/p60+). Вестерн-блот аналіз та імуофлуоресцентна мікроскопія підтвердили очікуваний рівень експресії S6K1 у отриманих лініях клітин.

Клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ є дуже цікавою модельною системою, так як ізоформа p60S6K1 наразі майже не досліджена. Попередні роботи нашого відділу показали, що p60S6K1 скоріш за все утворюється внаслідок використання альтернативного старту трансляції іРНК S6K1 (92,143). Однак, участь p60S6K1 у регуляції життєдіяльності клітини є маловідомою.

Так як у дисертаційній роботі було показано, що експресія S6K1 зростає під час мітозу і досліджувана кіназа може бути залучена до регуляції поділу пухлинних клітин, ми перевірили рівень проліферації отриманих клітинних ліній порівняно із клітинами MCF-7 дикого типу. У якості методичного підходу ми обрали визначення мітотичного індексу клітин. МТТ тест, який найчастіше використовується для цих цілей сильно залежить від окисної активності мітохондрій та їх кількості у клітині, що може вносити значні похибки у вимірювання проліферації різних типів клітин. Так як ми не знаємо стан та динаміку мітохондрій у отриманих клітинних лініях, було вирішено не застосовувати МТТ тест.

Клітини MCF-7 p85-/p70-/p60- мали дещо нижчий мітотичний рівень порівняно із клітинами дикого типу. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями інших авторів, які використовували модельних тварин із вимкненим геном *RPS6K1*. Так, було показано, що у мишей S6K1<sup>-/-</sup> знижується

рівень проліферації гепатоцитів у первинній культурі за умов *in vitro*, а також значно знижується час переходу клітин до S-фази клітинного циклу після часткової гепатектомії *in vivo*. Крім того, у S6K1<sup>-/-</sup> мишей знижувався рівень проліферації мезенхімальних клітин у експериментальній моделі фіброзу легень. Незначна відмінність у рівні реплікації MCF-7 p85-/p70-/p60- та MCF-7 дикого типу у нашому дослідженні може бути пояснена тим, що роль S6K1 частково може компенсувати високогомологічна кіназа S6K2. Адже, на тваринних моделях було виявлено, що вимкнення гену *RPS6K1* призводило до зростання рівня експресії S6K2. Однак для підтвердження нашого припущення необхідно провести додаткові дослідження та вивчити рівень синтезу і активності кінази S6K2 у отриманих клітинних лініях.

Мітотичний індекс клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+ навпаки був приблизно у 1,5 рази вищий за мітотичний індекс клітин дикого типу. Відомостей про механізми або причину такого явища наразі не існує. Цікаво, що подібні властивості має нещодавно відкрита ізоформа p31S6K1. Надекспресія p31S6K1 призводить до злоякісної трансформації клітин *in vitro*, підвищений рівень експресії цієї форми був виявлений у низці клітинних ліній раку молочної залози, сечового міхура та у клітинах лінії HeLa. Тому наразі вважається, що ізоформа p31S6K1 має онкогенні властивості.

Подальше вивчення морфологічних особливостей отриманих клітинних ліній показало, що клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ втрачали морфологію, властиву для епітеліальних клітин. Натомість, вони набували витягнутої фібробластоподібної форми порівняно із клітинами дикого типу та із MCF-7 p85-/p70-/p60-, які мали характерну полігональну форму та росли у вигляді багатоклітинних груп. MCF-7 p85-/p70-/p60+ мали тенденцію до поодинокого дифузного росту клітин за умов моношарової культури.

Зміна форми клітин на фібробластоподібну є однією із ознак епітеліально-мезенхімального переходу. При цьому пухлинні клітини часто набувають здатності до вищої швидкості міграції та інвазії. Тому на наступному етапі роботи ми дослідили міграційну активність отриманих клітинних ліній за

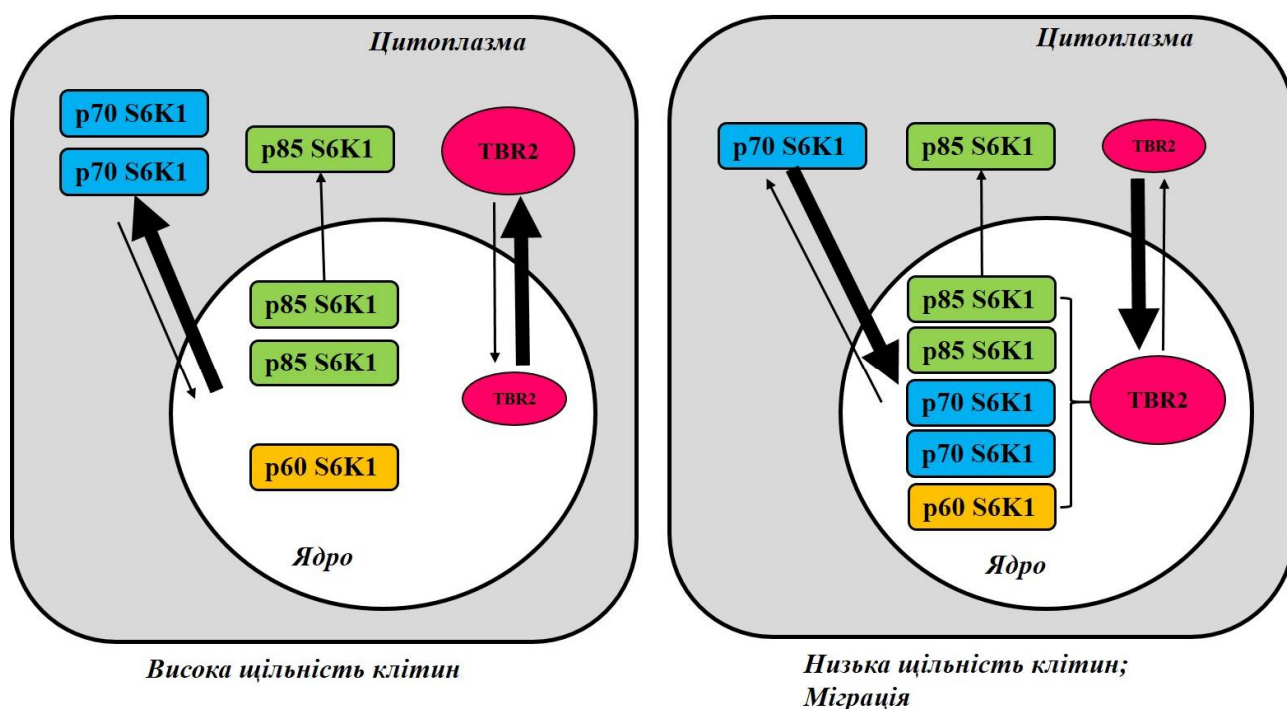
допомогою моделі «раневої поверхні». Було виявлено, що швидкість міграції клітинної лінії MCF-7 p85-/p70-/p60+ зі збереженою експресією ізоформи p60S6K1 зростала більш ніж вдвічі порівняно з клітинами дикого типу. Тоді як MCF-7 p85-/p70-/p60- мігрували значно повільніше за контрольну лінію клітин MCF-7.

На першому етапі дисертаційної роботи було встановлено, що ядерно-цитоплазматичний розподіл кінази S6K1 залежить від щільності моношару клітин лінії MCF-7. Отримавши клітинну лінію MCF-7 p85-/p70-/p60+, ми вирішили перевірити чи властиве таке внутрішньоклітинне переміщення ізоформи p60S6K1. Імунофлуоресцентний аналіз показав, що p60S6K1 детектується у ядрах клітин як при низькій щільності моношару, так і за 100% рівня конфлюентності. Попередні дослідження відділу сигнальних систем клітини встановили, що фосфорилування серину 17 S6K1 протеїнкіназою 2 (CK2) може регулювати експорт S6K1 із ядра до цитоплазми при відсутності ростових факторів. Однак ізоформа p60S6K1 має вкорочений N-кінець молекули і не містить серину 17. Ми припускаємо, що саме це може бути причиною локалізації p60S6K1 у ядрі незалежно від щільності клітин. Більш того, взаємодія p60S6K1 із ядерними субстратами частково може пояснювати зміни у проліферації, морфології та міграції клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+.

Отримані результати дозволяють припускати, що ізоформа p60S6K1 може потенційно мати онкогенні властивості та можливо є залученою до епітеліально-мезенхімального переходу клітин. Виявлені ефекти також можуть бути пов'язані з тим, що S6K1 взаємодіє із актиновими арками та опосередковано залучена до регуляції реорганізації цитоскелету (144,145). Вперше, показана важлива роль p60S6K1 у підтриманні морфології та здатності до міграції клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7.

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. 4.1). Згідно цієї моделі S6K1 знаходиться в цитоплазмі клітин

при високій щільності моношару. 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. 4.1.** 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 розвитку деяких ознак епітеліально-мезенхімального переходу – одного з головних показників злоякісної трансформації.

## 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 призводять 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan 4;68(1):7–30.
2. Takahashi, Isogawa H, Mizuho. Management of breast cancer brain metastases. *Chinese Clinical Oncology*. 2018;7(3):30.
3. Katzenellenbogen JA, Mayne CG, Katzenellenbogen BS, Greene GL, Chandarlapaty S. Structural underpinnings of oestrogen receptor mutations in endocrine therapy resistance. *Nat Rev Cancer*. 2018 Jun;18(6):377–388.
4. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep 1;4(9):a011189.
5. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell*. 2017 Aug 10;170(4):605–635.
6. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014 Apr 14;4:64.
7. Bärlund M, Monni O, Kononen J, Cornelison R, Torhorst J, Sauter G, et al. Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res*. 2000 Oct 1;60(19):5340–5344.
8. Bostner J, Karlsson E, Eding CB, Perez-Tenorio G, Franzén H, Konstantinell A, et al. S6 kinase signaling: tamoxifen response and prognostic indication in two breast cancer cohorts. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jun;22(3):331–343.
9. Berstein LM, Yue W, Wang J-P, Santen RJ. Isolated and combined action of tamoxifen and metformin in wild-type, tamoxifen-resistant, and estrogen-deprived MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul;128(1):109–117.
10. Tavares MR, Pavan ICB, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD, Simabuco FM. The S6K protein family in health and disease. *Life Sci*. 2015 Jun 15;131:1–10.



11. Pavan ICB, Yokoo S, Granato DC, Meneguello L, Carnielli CM, Tavares MR, et al. Different interactomes for p70-S6K1 and p54-S6K2 revealed by proteomic analysis. *Proteomics*. 2016 Sep 12;16(20):2650–2666.
12. Rosner M, Hengstschläger M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. *Oncogene*. 2011 Nov 3;30(44):4509–4522.
13. Kramer IJM. An introduction to signal transduction. *Signal Transduction*. Elsevier; 2016. p. 53–183.
14. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1710–1711.
15. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960–976.
16. Iffland PH, Baybis M, Barnes AE, Leventer RJ, Lockhart PJ, Crino PB. DEPDC5 and NPRL3 modulate cell size, filopodial outgrowth, and localization of mTOR in neural progenitor cells and neurons. *Neurobiol Dis*. 2018 Jun;114:184–193.
17. Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *J Immunol*. 2017 Feb 1;198(3):1006–1014.
18. Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L, Hemmings BA. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;346:31–56.
19. Kramer IJM. Protein Phosphatases. *Signal Transduction*. Elsevier; 2016. p. 935–995.
20. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127–150.

21. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov.* 2016 Feb;6(2):202–216.
22. Avgeris S, Fostira F, Vagena A, Ninios Y, Delimitsou A, Vodicka R, et al. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in Tuberous Sclerosis Complex patients from Greece. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):16697.
23. Huynh H, Hao H-X, Chan SL, Chen D, Ong R, Soo KC, et al. Loss of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) Is Frequent in Hepatocellular Carcinoma and Predicts Response to mTORC1 Inhibitor Everolimus. *Mol Cancer Ther.* 2015 May;14(5):1224–1235.
24. Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, et al. Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *Elife.* 2016 Jan 7;5.
25. Filonenko VV. PI3K/mTOR/S6K signaling pathway – new players and new functional links. *Biopolym Cell.* 2013 May 20;29(3):207–214.
26. Jhanwar-Uniyal M, Amin AG, Cooper JB, Das K, Schmidt MH, Murali R. Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects. *Adv Biol Regul.* 2017 Jan 4;64:39–48.
27. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):21–35.
28. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098–1101.
29. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* 2006 Dec;11(6):859–871.

30. Ebner M, Sinkovics B, Szczygieł M, Ribeiro DW, Yudushkin I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol.* 2017 Feb;216(2):343–353.
31. García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J.* 2008 Dec 15;416(3):375–385.
32. Stutfeld E, Aylett CH, Imseng S, Boehringer D, Scaiola A, Sauer E, et al. Architecture of the human mTORC2 core complex. *Elife.* 2018 Feb 9;7.
33. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüeegg MA. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1122-8.
34. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012 Jan 1;441(1):1–21.
35. Pardo OE, Seckl MJ. S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. *Front Oncol.* 2013 Jul 24;3:191.
36. Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, et al. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(23):8862–8877.
37. Guri Y, Hall MN. mTOR Signaling Confers Resistance to Targeted Cancer Drugs. *Trends Cancer.* 2016 Nov 4;2(11):688–697.
38. Liu J, Li H-Q, Zhou F-X, Yu J-W, Sun L, Han Z-H. Targeting the mTOR pathway in breast cancer. *Tumour Biol.* 2017 Jun;39(6):1010428317710825.
39. Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway. *Surg Oncol Clin N Am.* 2013 Oct;22(4):641–664.

40. Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, Pearson RB. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors*. 2007 Aug;25(4):209–226.
41. Gout I, Minami T, Hara K, Tsujishita Y, Filonenko V, Waterfield MD, et al. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13;273(46):30061–30064.
42. Lee-Fruman KK, Kuo CJ, Lippincott J, Terada N, Blenis J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene*. 1999 Sep 9;18(36):5108–5114.
43. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):1-21.
44. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and Activation of p70<sup>S6K</sup> by PDK1. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):707–710.
45. Fang Y, Park I-H, Wu A-L, Du G, Huang P, Frohman MA, et al. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol*. 2003 Dec 2;13(23):2037–2044.
46. Gulati P, Thomas G. Nutrient sensing in the mTOR/S6K1 signalling pathway. *Biochem Soc Trans*. 2007 Apr;35(Pt 2):236–238.
47. Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM, et al. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jul 7;95(14):8351–8356.
48. Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA. Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF)

- Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem.* 2003 May 23;278(21):18833–18841.
49. Berven LA, Crouch MF. Cellular function of p70S6K: a role in regulating cell motility. *Immunol Cell Biol.* 2000 Aug;78(4):447–451.
  50. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995 May;9(8):576–596.
  51. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Nov;87(21):8550–8554.
  52. Ben-Hur V, Denichenko P, Siegfried Z, Maimon A. S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. *Cell Rep.* 2013 Jan 31;3(1):103-15.
  53. Filonenko VV, Tytarenko R, Azatjan SK, Savinska LO. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 localization in human breast tumors. *Exp Oncol.* 2004 Dec;26(4):294-9.
  54. Khoruzhenko AI, Cherednyk OV, Filonenko VV. Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in primary monolayer culture of rat thyrocytes. *Biopolym Cell.* 2008 Jan 20;24(1):35–40.
  55. Khoruzhenko AI, Cherednyk OV, Filonenko VV. Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in rat thyrocytes under conditions of two- and three-dimensional culture. *Biopolym Cell.* 2008 Nov 20;24(6):470–475.
  56. Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, et al. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation

- domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.* 2003 Dec;23(23):8862–8877.
57. Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors.* 2007 Aug;25(4):209-26.
  58. Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Drazzen A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene.* 2014 Jan 23;33(4):474–483.
  59. Rossi R, Pester JM, McDowell M, Soza S, Montecucco A, Lee-Fruman KK. Identification of S6K2 as a centrosome-located kinase. *FEBS Lett.* 2007 Aug 21;581(21):4058–4064.
  60. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan K-L. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005 Mar;69(1):79–100.
  61. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jun;31(6):342–348.
  62. Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Drazzen A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene.* 2014 Jan 23;33(4):474–483.
  63. Biever A, Valjent E, Puighermanal E. Ribosomal protein S6 phosphorylation in the nervous system: from regulation to function. *Front Mol Neurosci.* 2015 Dec 16;8:75.
  64. Dennis MD, Jefferson LS, Kimball SR. Role of p70S6K1-mediated phosphorylation of eIF4B and PDCD4 proteins in the regulation of protein synthesis. *J Biol Chem.* 2012 Dec 14;287(51):42890–42899.
  65. Richardson CJ, Bröenstrup M, Fingar DC, Jülich K, Ballif BA, Gygi S, et al. SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol.* 2004 Sep 7;14(17):1540–1549.

66. Wilson KF, Wu WJ, Cerione RA. Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):37307-10.
67. Pavan I.C.B., Silva F.R., Morelli A.P., Simabuco F.M. (2016) S6K (S6 Kinase). In: Choi S. (eds) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, New York, NY. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9>.
68. de Groot RP, Ballou LM, Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell.* 1994 Oct 7;79(1):81–91.
69. Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene.* 2014 Jan 23;33(4):474–483.
70. Mahoney SJ, Dempsey JM, Blenis J. Chapter 2 Cell Signaling in Protein Synthesis. *Translational Control in Health and Disease*. Elsevier; 2009. p. 53–107.
71. Chaillou T, Kirby TJ, McCarthy JJ. Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass. *J Cell Physiol.* 2014 Nov;229(11):1584–1594.
72. Richardson CJ, Schalm SS, Blenis J. PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. *Semin Cell Dev Biol.* 2004 Apr;15(2):147–159.
73. McManus EJ, Alessi DR. TSC1-TSC2: a complex tale of PKB-mediated S6K regulation. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):E214–6.
74. Biondi RM, Kieloch A, Currie RA, Deak M, Alessi DR. The PIF-binding pocket in PDK1 is essential for activation of S6K and SGK, but not PKB. *EMBO J.* 2001 Aug 15;20(16):4380–4390.

75. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):707–710.
76. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):1-21.
77. Manning BD. Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J Cell Biol*. 2004 Nov 8;167(3):399–403.
78. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):707–710.
79. Hahn K, Miranda M, Francis VA, Vendrell J, Zorzano A, Telean AA. PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab*. 2010 May 5;11(5):438–444.
80. Bielinski VA, Mumby MC. Functional analysis of the PP2A subfamily of protein phosphatases in regulating *Drosophila* S6 kinase. *Exp Cell Res*. 2007 Aug 15;313(14):3117–3126.
81. Mandavia C, Sowers JR. Phosphoprotein phosphatase PP2A regulation of insulin receptor substrate 1 and insulin metabolic signaling. *Cardiorenal Med*. 2012 Dec;2(4):308–313.
82. Cai J, Fang L, Huang Y, Li R, Yuan J, Yang Y, et al. miR-205 targets PTEN and PHLPP2 to augment AKT signaling and drive malignant phenotypes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2013 Sep 1;73(17):5402–5415.
83. Sundaramoorthy S, Devanand P, Ryu MS, Song KY, Noh DY, Lim IK. TIS21/BTG2 inhibits breast cancer growth and progression by differential regulation of mTORc1 and mTORc2-AKT1-NFAT1-PHLPP2 signaling axis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Aug;144(8):1445–1462.



84. Savinska LO, Klipa OM, Khoruzenko AI, Shkarina KS, Garifulin OM, Filonenko VV. Generation and characterization of polyclonal antibodies specific to N-terminal extension of p85 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 (p85 S6K1). *Biopolym Cell*. 2015 Aug 20;31(4):294–300.
85. Zhang J, Guo J, Qin X, Wang B, Zhang L, Wang Y, et al. The p85 isoform of the kinase S6K1 functions as a secreted oncoprotein to facilitate cell migration and tumor growth. *Sci Signal*. 2018 Mar 27;11(523).
86. Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jan;43(1):47–59.
87. Panasyuk G, Nemazanyy I, Zhyvoloup A, Bretner M, Litchfield DW, Filonenko V, et al. Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31188–31201.
88. Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Thomas G, Ceman S, Bassell GJ, et al. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem*. 2008 Jul 4;283(27):18478–18482.
89. Ben-Hur V, Denichenko P, Siegfried Z, Maimon A, Krainer A, Davidson B, et al. S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. *Cell Rep*. 2013 Jan 31;3(1):103–115.
90. Song J, Richard S. Sam68 Regulates S6K1 Alternative Splicing during Adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2015 Jun 1;35(11):1926–1939.
91. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Mar;14(3):185–193.
92. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Zaiets IV, Sivchenko AS, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Khoruzhenko AI,

- Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, et al. The P60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *UkrBiochemJ*. 2018 Jul 10;90(4):25–35.
93. Zaiets IV, Sivchenko AS, Khoruzhenko AI, Filonenko VV. Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolym Cell*. 2017 Oct 31;33(5):356–366.
  94. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87–108.
  95. Федоренко ЗП, Михайлович ЮЙ, Гулак ЛО, Горох ЄЛ, Рижов АЮ, Сумкіна ОВ, et al. Захворюваність та смертність від злоякісних новоутворень. Стан онкологічної допомоги населенню України в 2015-2016 рр. *Бюлетень НКР "Рак в Україні*. 2017;18:3–6.
  96. Hesketh R. *Introduction to Cancer Biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2012.
  97. Weinberg RA *The biology of cancer*. Second edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2014.
  98. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
  99. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–674.
  100. Bi C, Zhang X, Lu T, Zhang X, Wang X, Meng B, et al. Inhibition of 4EBP phosphorylation mediates the cytotoxic effect of mechanistic target of rapamycin kinase inhibitors in aggressive B-cell lymphomas. *Haematologica*. 2017 Jan 19;102(4):755–764.

101. Surace EI, Lusic E, Haipek CA, Gutmann DH. Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression. *Ann Neurol*. 2004 Aug;56(2):295–298.
102. Bärlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML, et al. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 2;92(15):1252–1259.
103. Leroux AE, Schulze JO, Biondi RM. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:1–17.
104. Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol*. 2015 Apr;33:55–66.
105. Liu L, Liao J-Z, He X-X, Li P-Y. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. *Oncotarget*. 2017 Aug 22;8(34):57707–57722.
106. Cordani M, Butera G, Pacchiana R, Donadelli M. Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1867(1):19–28.
107. Pan S-J, Zhan S-K, Pan Y-X, Liu W, Bian L-G, Sun B, et al. Tetraspanin 8-riector-integrin  $\alpha 3$  complex is required for glioma cell migration. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 9;16(3):5363–5374.
108. Liko D, Hall MN. mTOR in health and in sickness. *J Mol Med*. 2015 Oct;93(10):1061–1073.
109. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):274–293.
110. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug 1;2:563–572.

111. Melzer C, von der Ohe J, Hass R. Breast carcinoma: from initial tumor cell detachment to settlement at secondary sites. *Biomed Res Int.* 2017 Jul 12;2017:8534371.
112. Чехун В. МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ — QUO VADIS? *Онкологія.* 2009;11(2):84–85.
113. Khoruzhenko A, Kukharchuk V, Cherednyk O, Tykhonkova I, Ovcharenko G, Malanchuk O, et al. Monoclonal antibodies to Ki-67 protein suitable for immunohistochemical analysis. *Hybridoma.* 2010 Aug;29(4):301–304.
114. Gotsulyak NY, Kosach VR, Cherednyk OV. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay. *Biopolymers and Cell.* 2014;30 (3):223–228.
115. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Dec 13; Available from: doi: 10.1038/s41580-018-0086-y.
116. Tumaneng KA. Elucidation of the mechanisms of the Hippo-YAP pathway in organ size control and cancer. 2016 Mar 23; UC San Diego. ProQuest ID: Tumaneng\_ucsd\_0033D\_13420. Merritt ID: ark:/20775/bb2663519c. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/613374dm>.
117. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017 May 1;7(5):1016–1036.
118. Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, Ebrahimi-Fakhari D, Kwiatkowski E, Nathan A, et al. The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation. *Cell.* 2015 May 21;161(5):1138–1151.
119. Vazquez-Martin A, Sauri-Nadal T, Menendez OJ, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Corominas-Faja B, et al. Ser2481-autophosphorylated mTOR colocalizes with chromosomal passenger proteins during mammalian cell cytokinesis. *Cell Cycle.* 2012 Nov 15;11(22):4211–4221.

120. Lee S-E, Sun S-C, Choi H-Y, Uhm S-J, Kim N-H. mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2012 May;79(5):356–366.
121. Hou WH, Duan XK, Wei P, Xie JL, Zheng YY, Zhang YL, et al. [Cut-off value of Ki-67 labeling index in the pathologic grading of follicular lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2018 Sep 8;47(9):696–699.
122. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005 Jul 8;280(27):25485–25490.
123. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Bernadó L, López-Bonet E, Menendez JA. The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Mar 13;380(3):638–643.
124. Berven LA, Willard FS, Crouch MF. Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res.* 2004 Jun 10;296(2):183–195.
125. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett.* 2010 Jan 4;584(1):124–128.
126. Xie X, Hu H, Tong X, Li L, Liu X, Chen M, et al. The mTOR-S6K pathway links growth signalling to DNA damage response by targeting RNF168. *Nat Cell Biol.* 2018 Mar;20(3):320–331.
127. Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci.* 2011 Feb;12(1):30–42.
128. Filonenko VV, Tytarenko R, Azatjan SK, Savinska LO, Gaydar YA, Gout IT, et al. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 localization in human breast tumors. *Exp Oncol.* 2004 Dec;26(4):294–299.

129. Khoruzhenko AI, Cherednyk OV, Filonenko VV. Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in primary monolayer culture of rat thyrocytes. *Biopolym Cell*. 2008 Jan 20;24(1):35–40.
130. Zhang H, Pasolli HA, Fuchs E. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Feb 8;108(6):2270–2275.
131. Lee M-J, Byun MR, Furutani-Seiki M, Hong J-H, Jung H-S. YAP and TAZ regulate skin wound healing. *J Invest Dermatol*. 2014 Feb;134(2):518–525.
132. Elbediwy A, Vincent-Mistiaen ZI, Spencer-Dene B, Stone RK, Boeing S, Wculek SK, et al. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development*. 2016 May 15;143(10):1674–1687.
133. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):644–648.
134. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):524-6.
135. Almeida R, Silva E, Santos-Silva F, Silberg DG, Wang J, De Bolós C, et al. Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol*. 2003 Jan;199(1):36–40.
136. Sessa A, Mao C-A, Colasante G, Nini A, Klein WH, Broccoli V. Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. *Genes Dev*. 2010 Aug 15;24(16):1816–1826.

137. Ka M, Condorelli G, Woodgett JR, Kim W-Y. mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. *Development*. 2014 Nov;141(21):4076–4086.
138. Panasyuk G, Nemazanyy I, Zhyvoloup A, Filonenko V, Davies D, Robson M, et al. mTORbeta splicing isoform promotes cell proliferation and tumorigenesis. *J Biol Chem*. 2009 Nov 6;284(45):30807–30814.
139. Milione M, Maisonneuve P, Pellegrinelli A, Grillo F, Albarello L, Spaggiari P, et al. Ki67 proliferative index of the neuroendocrine component drives MANEC prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2018 May;25(5):583–593.
140. Philips P, Kooby DA, Maithel S, Merchant NB, Weber SM, Winslow ER, et al. Grading Using Ki-67 Index and Mitotic Rate Increases the Prognostic Accuracy of Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2018;47(3):326–331.
141. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Bernadó L, López-Bonet E, Menendez JA. The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 13;380(3):638–643.
142. Watari K, Nishitani A, Shibata T, Noda M, Kawahara A, Akiba J, et al. Phosphorylation of mTOR Ser2481 is a key target limiting the efficacy of rapalogs for treating hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):47403–47417.
143. Zaiets IV, Sivchenko AS, Khoruzhenko AI, Filonenko VV. Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolym Cell*. 2017 Oct 31;33(5):356–366.
144. Ip CKM, Cheung ANY, Ngan HYS, Wong AST. p70 S6 kinase in the control of actin cytoskeleton dynamics and directed migration of ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2011 May 26;30(21):2420–2432.

145. Liu L, Chen L, Chung J, Huang S. Rapamycin inhibits F-actin reorganization and phosphorylation of focal adhesion proteins. *Oncogene*. 2008 Aug 28;27(37):4998–5010.



## ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ 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.
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.
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
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.
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.
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.
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.

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.

9. Tereshchenko Y.S., **Kosach V.R.**, Zaiets I.V., Khorushenko 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.

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.

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. – Ст. 38.

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". – Wroclaw, Poland. – 2016 – P. 68.

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.

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.

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.

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

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