

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЗАЄЦЬ ІГОР ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 577.217

577.218

**МЕХАНІЗМ ЕКСПРЕСІЇ, РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ТА
ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ В КЛІТИНІ НОВОЇ ІЗОФОРМИ
КІНАЗИ РИБОСОМНОГО БІЛКА S6 – p60-S6K1**

03.00.03 – молекулярна біологія

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
Філоненко Валерій Вікторович
доктор біологічних наук, професор

КИЇВ – 2019

АНОТАЦІЯ

Заєць І.В. **Механізм експресії, регуляція активності та функціональне значення в клітині нової ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1.**
– 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 і генетики Національної Академії Наук України, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, 2019.

Кіназа рибосомного білка S6 (S6K1) є одним із ключових компонентів PI3K/mTOR/S6K1-залежного сигнального каскаду. Даний сигнальний шлях контролює низку важливих клітинних процесів, зокрема синтез білків та ліпідів, клітинний ріст, виживання, проліферацію та міграцію. Порушення регуляції mTOR/S6K1 сигнального шляху призводить до таких патологічних станів, як онкологічні, серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання, метаболічні розлади, гіпертрофія органів та ін. Ген S6K1 кодує кілька ізоформ, серед яких найбільш вивченими є p85-S6K1 та p70-S6K1, які транскрибуються з єдиного транскрипту з використанням відповідно першого та другого стартових кодонів, а також гіпотетична ізоформа p60-S6K1, яка потенційно може транскрибуватися з третього стартового кодону транскрипта p70/p85-S6K1. Механізми регуляції активності та функціональне значення в клітині ізоформи p60-S6K1 залишаються незрозумілими. Також невідомо чи є дана ізоформа продуктом обмеженого протеолізу домінантних ізоформ p70/p85-S6K1, чи вона виникає внаслідок трансляції мРНК з третього стартового кодону.

Для того, щоб перевірити гіпотезу альтернативної трансляції ізоформи p60-S6K1 з третього стартового кодону була застосована система редагування геному CRISPR/Cas9. Отримані результати показали, що редагування нуклеотидної послідовності гена S6K1 в клітинах HEK-293 між другим та третім стартами трансляції призводило до блокування експресії p70/p85-S6K1

ізоформ, однак не впливало на експресію p60-S6K1. Так само, редагування нуклеотидної послідовності після третього старту трансляції призводило до блокування експресії всіх трьох ізоформ. Отже, було встановлено, що ізоформа p60-S6K1 може транслюватися з третього стартового кодону мРНК S6K1 і не є продуктом протеолітичного розщеплення ізоформ p85- та p70-S6K1.

З використанням методів ПЛР аналізу та ДНК секвенування було ідентифіковано в клітинній лінії MCF-7 новий сплайсовий варіант S6K1, який відповідає за експресію p60-S6K1. Використання shRNA, специфічної до транскрипта p60-S6K1, призводило до значного пригнічення експресії ізоформи p60-S6K1 в клітинах MCF-7.

За допомогою *in vitro* кіназної реакції було виявлено, що ізоформа p60-S6K1 має кіназну активність і здатна фосфорилувати rpS6 *in vitro*. Було встановлено, що ізоформа p60-S6K1 в клітинах HEK-293 не підлягає фосфорилуванню за ключовими для кіназної активності PDK1- та mTORC1-регульованими сайтами у порівнянні з p70/p85-S6K1. В клітинах MCF-7, навпаки, як показують результати p60-S6K1 фосфорилується за досліджуваними критичними для активності сайтами за різних умов росту клітин. Було виявлено, що активність p60-S6K1 в клітинах HEK-293 є нечутливою до стимуляції сироваткою та обробки клітин інгібітором mTOR рапаміцином, що передбачає наявність PI3K/mTORC1-назалежного механізму регуляції активності ізоформи p60-S6K1 в клітинній лінії HEK-293.

Для з'ясування ролі p60-S6K1 у функціонуванні клітин HEK-293 у контексті PI3K/mTORC1-регульованих клітинних процесів було проаналізовано вплив селективної експресії ізоформи p60-S6K1 на процеси клітинної проліферації та міграції, які є mTORC1/S6K1-залежними. Результати дослідження продемонстрували, що блокування експресії всіх трьох ізоформ у клітинах HEK-293 призводить до зниження рівня проліферації та швидкості міграції. У той самий час, вибіркова експресія p60-S6K1 в HEK-293 має компенсаторний ефект на дані процеси, значно відновлюючи швидкість проліферації та міграції.

Було виявлено, що вибіркова експресія p60-S6K1 за умови пригніченої експресії ізоформ p70/p85-S6K1 у клітинній лінії MCF-7 здатна ініціювати програму епітеліально-мезенхімального переходу. Кількісний ПЛР аналіз рівнів експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу, зокрема *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *TWIST1*, *SNAIL1* та *ZEB2*, підтвердив, що клітини MCF-7 із селективною експресією p60-S6K1 виявляють мезенхімальний фенотип. Оскільки в клітинах MCF-7, які вибірково експресують p60-S6K1, відсутня експресія обох p70- та p85-S6K1 ізоформ, то залишалося незрозумілим яка з двох ізоформ здійснює негативний вплив на здатність p60-S6K1 ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід. Для вирішення поставленого запитання за допомогою системи CRISPR/Cas9 була отримана клітинна лінія MCF-7 з вимкненою експресією лише ізоформи p85-S6K1. Результати кількісного ПЛР аналізу маркерів епітеліально-мезенхімального переходу підтвердили, що клітини MCF-7, в яких вимкнена експресія p85-S6K1, мають епітеліальний фенотип, так як і клітини MCF-7 дикого типу.

Таким чином, у представленій дисертаційній роботі показано, що існує щонайменше два механізми експресії ізоформи p60-S6K1: шляхом альтернативної трансляції з третього стартового кодону в межах домінантного S6K1 транскрипта, і за допомогою трансляції з використанням специфічного p60-S6K1 транскрипта, який виникає шляхом альтернативного сплайсингу. Ізоформа p60-S6K1 має кіназну активність, яка регулюється незалежно від PI3K/mTORC1 сигнального каскаду в клітинах HEK-293. Функціональне значення ізоформи p60-S6K1 в клітині полягає як у позитивній регуляції S6K1-залежних процесів проліферації та міграції клітин, так і в здійсненні специфічної функції ініціації епітеліально-мезенхімального переходу за умови пригнічення експресії ізоформи p70-S6K1. Співвідношення експресії p60- та p70-S6K1 потенційно може бути використано в якості діагностичного маркера інвазивного раку молочної залози.

Ключові слова: кіназа 1 рибосомного білка S6, mTORC1-залежний сигнальний шлях, ізоформа p60-S6K1, експресія ізоформ S6K1, епітеліально-мезенхімальний перехід.

Список публікацій здобувача:

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.
2. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V. (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
3. Kravchenko, A. O., Kosach, V. R., Shkarina, K. A., **Zaiets, I. V.**, I.O. Tykhonkova, I. O., Khoruzhenko, A. I. (2018). Optimization of in vitro model for analysis of tumor cell migration dynamics. *Biopolymers and Cell*, 34(6), pp. 477-486.
4. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Filonenko V. V. (2019). Identification of a novel S6K1 splice variant coding for the p60-S6K1 isoform. *Biopolymers and Cell*, 35(2), pp. 99-106.
5. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., Smialkovska, V. V., Filonenko, V. V. (2019). p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms. *Ukr Biochem J*, 91(4), pp. 17-25.
6. Holiar, V. V., Gotsulyak, N. Ya., Khoruzhenko, A. I., **Zaiets, I. V.** (2019). Generation and characterization of the MCF-7 cell line with a knockout of a p85-S6K1 isoform of the ribosomal protein S6 kinase 1. *Biopolymers and Cell*, 35(4), pp. 303-312.
7. Tereshchenko, Y. S., Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.** Generation of MCF-7 cell lines with downregulated expression of different S6K1 isoforms. Abstracts of

- the XII International Young Scientists' Conference, V. N. Karazin Kharkiv National University, November 29 – December 1, 2017, Kharkiv, Ukraine, pp. 38-39.
8. Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., **Zaiets, I. V.** p60-S6K1 mRNA transcript expression profile in a panel of cell lines and breast cancer tissue samples. Young scientists conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018”, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, May 23-25, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90(3), p. 115.
 9. Sivchenko, A. S., Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Phosphorylation state of mitogen-regulated sites in the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p60-S6K1, at different cell growth conditions. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. Biopolymers and Cell, 34(2), p. 152.
 10. 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. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. Biopolymers and Cell, 34(2), p. 164.
 11. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90 (Special Issue), p. 73.
 12. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90 (Special Issue), p. 23.
 13. Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Knockout of the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p85, in the MCF-7 cell line leads to decreased cell growth, survival

and migration. 15th Horizons In Molecular Biology, 10th – 13th September, 2018, Gottingen, Germany, p. 84.

14. **Zaiets, I. V.**, Kosach, V. R., Filonenko, V. V. Selective expression of the p60 ribosomal protein S6 kinase 1 isoform induces an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells MCF-7. XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 22-25 травня 2019.

SUMMARY

Zaiets I.V. **The mechanism of expression, activity regulation and functional significance in a cell of the novel ribosomal protein S6 kinase isoform – p60-S6K1.** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD), specialty 03.00.03 - Molecular Biology. - Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, ESC “Institute of Biology and Medicine” of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2019.

Ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) represents one of the key components of the PI3K/mTOR/S6K1-dependent signaling pathway. This signaling cascade controls a plenty of essential cellular processes, including protein and lipid biosynthesis, cell growth, survival, proliferation and migration. Abnormal regulation of the mTOR/S6K1 signaling pathway leads to a number of disease states, such as cancer, cardiovascular disease, metabolic and neurological disorders, organ hypertrophy, etc. S6K1 gene encodes several protein isoforms, where p85-S6K1 and p70-S6K1 are the most studied ones. These two isoforms are translated from the common transcript using the first and the second start codon, respectively. There is also the hypothetical p60-S6K1 isoform suggested to be translated from the third start codon of the p70/p85-S6K1 transcript. Mechanisms of activity regulation and functional significance in a cell of the p60-S6K1 isoform remain unknown. It also remains to be defined if p60-S6K1 is the product of proteolytic degradation of the predominant p70/p85-S6K1 isoforms, or this isoform arises via alternative translation from the third start codon.

To verify the hypothesis of p60-S6K1 alternative translation the genome editing CRISPR/Cas9 system was applied. Obtained results demonstrated that S6K1 gene editing between the second and the third start codons led to the disruption of p70/p85-S6K1 isoform expression in HEK-293 cells, however, had no effect on expression of the p60-S6K1 isoform. Accordingly, S6K1 gene editing downstream of the third start codon led to the knockout of all the three isoforms. Thus, it was

established that the p60-S6K1 isoform can be translated from the third in-frame start codon of S6K1 mRNA and does not represent a product of proteolytic cleavage of the p85- and p70-S6K1 isoforms.

A novel S6K1 splice variant responsible for p60-S6K1 expression was identified in the MCF-7 cell line using PCR analysis and DNA sequencing. The application of shRNA specific for the p60-S6K1 transcript led to a significant downregulation of p60-S6K1 isoform expression in MCF-7 cells.

The *in vitro* kinase assay revealed that the p60-S6K1 isoform has kinase activity and is able to phosphorylate rpS6 *in vitro*. It was established that the p60-S6K1 isoform does not undergo phosphorylation at the critical-for-kinase-activity PDK1- and mTORC1-regulated sites in comparison with p70/p85-S6K1. On the contrary, in the MCF-7 cells p60-S6K1 is phosphorylated at the critical-for-kinase-activity sites under different cell growth conditions. It was revealed that p60-S6K1 activity is insensitive to serum stimulation and cell treatment with mTOR inhibitor rapamycin in the HEK-293 cells, suggesting an existence of the PI3K/mTORC1-independent mechanism of p60-S6K1 activity regulation in the HEK-293 cell line.

To disclose a role for p60-S6K1 in HEK-293 functional activity in the context of PI3K/mTORC1-regulated cell processes it was examined whether selective expression of the p60-S6K1 isoform affects cell proliferation and migration. Results of the study demonstrated that knockout of all three isoforms led to a decrease in cell proliferation and migration rates. At the same time, selective expression of p60-S6K1 in HEK-293 had compensatory effect on these cell processes significantly renewing a rate of cell proliferation and migration.

It was found out that selective expression of p60-S6K1 is able to initiate the program of the epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 cell line under the condition of p70/p85-S6K1 expression knockdown. Quantitative PCR analysis of expression of epithelial-mesenchymal transition marker genes, including *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *TWIST1*, *SNAIL1*, and *ZEB2*, confirmed that the MCF-7 cells with selective p60-S6K1 expression display a mesenchymal phenotype. Since expression of both p70- and p85-S6K1 isoforms is absent in the MCF-7 cells with selective p60-

S6K1 expression, it remained unclear which isoform negatively affects the ability of p60-S6K1 to initiate the epithelial-mesenchymal transition. To solve this challenge the MCF-7 cell line with disrupted expression of only the p85-S6K1 isoform was created using the CRISPR/Cas9 system. Results of quantitative PCR analysis of the epithelial-mesenchymal transition markers confirmed that MCF-7 cells with disrupted expression of p85-S6K1 have an epithelial phenotype.

Thus, the given manuscript shows that at least two mechanisms of p60-S6K1 isoform expression exist: (i) expression via alternative translation from the third start codon using the dominant S6K1 transcript, and (ii) expression from the specific p60-S6K1 transcript that arises from alternative splicing event. The p60-S6K1 isoform reveals kinase activity that is regulated independently of the PI3K/mTORC1 signaling cascade in the HEK-293 cells. Functional significance of the p60-S6K1 isoform in a cell consists in both positive regulation of such S6K1-dependent processes as cell proliferation and migration, and in the realization of specific function inducing the epithelial-mesenchymal transition under the condition of p70/p85-S6K1 expression knockdown. The ratio between p60- and p70-S6K1 expression may potentially be used as a diagnostic marker of invasive breast cancer.

Key words: ribosomal protein S6 kinase 1, mTORC1-dependent signaling pathway, p60-S6K1 isoform, expression of S6K1 isoforms, epithelial-mesenchymal transition.

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

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.

2. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V. (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
3. Kravchenko, A. O., Kosach, V. R., Shkarina, K. A., **Zaiets, I. V.**, I.O. Tykhonkova, I. O., Khoruzhenko, A. I. (2018). Optimization of in vitro model for analysis of tumor cell migration dynamics. *Biopolymers and Cell*, 34(6), pp. 477-486.
4. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Filonenko V. V. (2019). Identification of a novel S6K1 splice variant coding for the p60-S6K1 isoform. *Biopolymers and Cell*, 35(2), pp. 99-106.
5. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., Smialkovska, V. V., Filonenko, V. V. (2019). p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms. *Ukr Biochem J*, 91(4), pp. 17-25.
6. Holiar, V. V., Gotsulyak, N. Ya., Khoruzhenko, A. I., **Zaiets, I. V.** (2019). Generation and characterization of the MCF-7 cell line with a knockout of a p85-S6K1 isoform of the ribosomal protein S6 kinase 1. *Biopolymers and Cell*, 35(4), pp. 303-312.
7. Tereshchenko, Y. S., Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.** Generation of MCF-7 cell lines with downregulated expression of different S6K1 isoforms. Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference, V. N. Karazin Kharkiv National University, November 29 – December 1, 2017, Kharkiv, Ukraine, pp. 38-39.
8. Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., **Zaiets, I. V.** p60-S6K1 mRNA transcript expression profile in a panel of cell lines and breast cancer tissue samples. Young scientists conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018”, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, May 23-25, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90(3), p. 115.
9. Sivchenko, A. S., Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Phosphorylation state of mitogen-regulated sites in the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p60-S6K1, at

- different cell growth conditions. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*, 34(2), p. 152.
10. 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. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*, 34(2), p. 164.
 11. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 73.
 12. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 23.
 13. Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Knockout of the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p85, in the MCF-7 cell line leads to decreased cell growth, survival and migration. 15th Horizons In Molecular Biology, 10th – 13th September, 2018, Gottingen, Germany, p. 84.
 14. **Zaiets, I. V.**, Kosach, V. R., Filonenko, V. V. Selective expression of the p60 ribosomal protein S6 kinase 1 isoform induces an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells MCF-7. XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 22-25 травня 2019.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Ізоформи S6 кінази 1 та їх будова	24
1.2. Регуляція активності S6 кінази 1	26
1.2.1. Механізми регуляції S6K1	26
1.2.2. Регуляція mTORC1/S6K1-залежного сигналювання	30
1.3. Клітинні субстрати і функції S6 кінази 1	35
1.4. Роль S6K1 у розвитку патологій людини	42
1.4.1. Участь S6K1 в ініціації та прогресії ракових захворювань	42
1.4.2. Роль S6K1 у розвитку метаболічних розладів, гіпертрофії органів та патологій, пов'язаних зі старінням	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	47
2.1. Матеріали та обладнання	47
2.2. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній ссавців	51
2.3. Синтез кДНК	51
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	52
2.5. Електрофорез ДНК в агарозному гелі	53
2.6. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція	54
2.7. Дизайн gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування S6K1 гена	54
2.8. Клонування gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування S6K1 гена	55
2.9. Клонування shRNA у ДНК векторі	57
2.10. Трансформація клітин <i>E.coli</i> плазмідною ДНК	57
2.11. Культивування клітин ссавців	58
2.12. Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК	59
2.13. Дослідження функціонального стану PI3K/mTOR	

	14
сигнального каскаду за умов стимуляції ростовими факторами та дії специфічних інгібіторів у культивованих клітинах	60
2.14. Приготування лізатів клітин ссавців	60
2.15. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах	61
2.16. Вестерн-блот аналіз	62
2.17. Імунопреципітація	63
2.18. <i>In vitro</i> кіназна реакція	63
2.19. Імунофлюоресцентний аналіз	63
2.20. Аналіз швидкості міграції клітин за допомогою методу раневої поверхні	64
2.21. Аналіз рівнів проліферації клітин із використанням МТТ-тесту	65
2.22. Статистичний аналіз	66
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	67
3.1. Визначення механізму експресії ізоформи p60-S6K1 у клітині	67
3.1.1. Перевірка наявної гіпотези альтернативної трансляції ізоформи p60-S6K1 з використанням клітинної лінії НЕК-293	67
3.1.2. Ідентифікація сплайсового варіанту S6 кінази 1, який кодує ізоформу p60-S6K1 у клітинах раку молочної залози MCF-7	71
3.2. Активність ізоформи p60-S6K1 та її регуляція в клітинах НЕК-293, які вибірково експресують p60-S6K1	79
3.2.1. Встановлення кіназної активності ізоформи p60-S6K1 у клітинах лінії p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293	79
3.2.2. Стан фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами в клітинній лінії p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293 за різних умов росту клітин	79
3.2.3. Стан фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами в клітинній лінії MCF-7 за різних умов росту клітин	82
3.2.4. Особливості регуляції активності ізоформи p60-S6K1	

	15
через PI3K/mTORC1-залежний сигнальний каскад у клітинах p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293	83
3.3. Функціональні особливості ізоформи p60-S6K1 у клітинах ліній НЕК-293 та MCF-7	87
3.3.1. Роль ізоформи p60-S6K1 у функціонуванні клітин лінії НЕК-293 у контексті PI3K/mTOR-регульованих клітинних процесів	87
3.3.1.1. Аналіз рівнів фосфорилування факторів трансляції в клітинах p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293 та p60 ⁻ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293	87
3.3.1.2. Дослідження рівнів проліферації клітинних ліній p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293 та p60 ⁻ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293	88
3.3.1.3. Визначення здатності клітин p60 ⁺ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293 та p60 ⁻ /p70 ⁻ /p85 ⁻ НЕК-293 до міграції	90
3.3.2. Вплив селективної експресії p60-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах НЕК-293 та MCF-7	92
3.3.2.1. Аналіз експресії маркерних генів епітеліально- мезенхімального переходу в отриманих клітинах НЕК-293 та MCF-7, які селективно експресують p60-S6K1	92
3.3.2.2. Вплив селективного вимкнення ізоформи p85-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинній лінії MCF-7	98
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	104
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122
ДОДАТОК А	149
ДОДАТОК Б	152
ДОДАТОК В	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

а.з. – амінокислотних залишків

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГТФаза – гуанозинтрифосфат-гідролаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСН – додецилсульфат натрію

ДТТ – дитіотреїтол

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕР – ендоплазматичний ретикулум

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція з використанням зворотної транскрипції

кДа – кілодальтон

Мет – метіонін

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

п.о. – пар основ

РМЗ – рак молочної залози

РНК – рибонуклеїнова кислота

Тріс – тріс(гідроксиметил)амінометан

АМРК – AMP-activated kinase (кіназа, яка активується АМФ)

СВС – cap-binding complex (кеп-зв'язуючий комплекс)

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium (середовище Ігла, модифіковане Дульбекко)

4E-VP1 – eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (білок, який приєднується до еукаріотичного фактора ініціації трансляції 4E)

eEF2K – eukaryotic elongation factor 2 kinase (кіназа фактора елонгації eEF2 еукаріот)

- eIF – eukaryotic translation initiation factor (еукаріотичний фактор ініціації трансляції)
- ER α – estrogen receptor α (рецептор естрогена α)
- FBS – fetal bovine serum (ембріональна сироватка бика)
- gRNA – guide RNA (гідова РНК)
- HEK-293 – human embryonic kidney-293 (клітини ембріональної нирки людини-293)
- IRS-1 – insulin receptor substrate 1 (субстрат інсулінового рецептора 1)
- МАРК – mitogen-activated protein kinase (протеїнкіназа, що активується мітогенами)
- MCF-7 – Michigan cancer foundation-7
- mTOR – mammalian target of rapamycin (мішень рапаміцину у ссавців)
- mTORC1 – mTOR complex 1 (mTOR комплекс 1)
- mTORC2 – mTOR complex 2 (mTOR комплекс 2)
- МТТ – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід)
- NLS – nuclear localization signal (сигнал ядерної локалізації)
- PDK1 – phosphoinositide-dependent kinase 1 (фосфоінозитид-залежна кіназа 1)
- PI3K – phosphoinositide 3-kinase (фосфоінозитид-3-кіназа)
- PBS – phosphate buffered saline (буферний фосфатний розчин)
- Raptor – regulatory associated protein of mTOR (білок, регуляторно асоційований з mTOR)
- rpS6 – ribosomal protein S6 (рибосомний білок S6)
- RSK – ribosomal S6 kinase (кіназа рибосомного білка S6)
- shRNA – short hairpin RNA
- SREBP – sterol regulatory element-binding protein (білок, який приєднується до елемента регуляції стеролами)
- S6K1 – ribosomal protein S6 kinase 1 (кіназа рибосомного білка S6)
- TSC1/2 – tuberous sclerosis complex proteins 1 and 2 (білки туберозо-склерозного комплексу 1 і 2)

ВСТУП

Актуальність теми. Кіназа 1 рибосомного білка S6 – S6K1 – функціонує як один із ключових компонентів PI3K/mTOR/S6K1-залежного сигнального шляху, залученого до регуляції трансляції, клітинного росту, виживання, проліферації та міграції (11, 81). S6K1 є серин/треоніною кіназою, яка активується білковим комплексом mTORC1 у відповідь на дію ростових факторів, мітогенів та поживних речовин. Порушення у функціонуванні PI3K/mTOR/S6K1 сигнального каскаду супроводжують важкі патологічні стани людини, зокрема онкологічні, нейродегенеративні та серцево-судинні захворювання, метаболічні розлади, а також патології, що пов'язані зі старінням (13, 194-195).

Найбільш дослідженими є дві ізоформи S6K1 – p85-S6K1 та p70-S6K1, що синтезуються в результаті трансляції спільної мРНК з використанням альтернативних стартів трансляції (перший та другий стартові кодони), і завдяки чому p85-S6K1 має додаткові, порівняно з p70 ізоформою, 23 а.з. з N-кінця молекули. Крім того, існують онкогенна p31 та гіпотетична p60 ізоформи S6K1 (61). Було виявлено, що експресія мінорної ізоформи p31-S6K1 здатна ініціювати злоякісну трансформацію епітеліальних клітин молочної залози людини (6), однак механізм, який лежить в основі онкогенних властивостей p31-S6K1, наразі залишається невідомим. Дані щодо експресії гіпотетичної ізоформи p60-S6K1 є дуже обмеженими (7), адже невідомо чи вона є продуктом протеолітичної деградації p70/85-S6K1, чи то незалежної мРНК трансляції. Отже, залишаються незрозумілими і механізми регуляції активності і взагалі функціональні особливості p60-S6K1. Слід зазначити, що регуляція mTORC1-залежних клітинних процесів відбувається багато в чому завдяки активності S6K1 кінази і фосфорилуванню її чисельних субстратів залучених до регуляції біосинтезу білка, експресії генів, сплайсингу, апоптозу, перебудов цитоскелету та ін. (61). Проте, в наявних літературних джерелах відсутні дані щодо

субстратної специфічності окремих ізоформ S6K1 і, відповідно, їх внеску в регуляцію зазначених клітинних процесів.

Ампліфікацію гена S6K1 та надекспресію кінази на білковому рівні виявлено в різних типах пухлин, зокрема карциномі молочної залози, де це було вперше детектовано (205-206, 218), раку легень, ендометрія, яєчника, щитоподібної та передміхурової залоз (216, 220-222), що згідно даних літератури корелює з поганим клінічним прогнозом для пацієнтів. З огляду на зазначене, S6K1 розглядається як перспективна мішень в протипухлинній терапії і наразі інгібітори S6K1 вже проходять клінічні випробовування як протипухлинні засоби (216).

Незважаючи на наявність у літературі чисельних даних щодо залучення S6K1 до онкогенезу, окремий внесок кожної з ізоформ S6K1 у процеси злоякісної трансформації клітин та пухлинної прогресії залишається недостатньо зрозумілим. Отже, надзвичайно актуальним є визначення як функціональних, так і онкогенних особливостей кожної з ізоформ S6K1, що в свою чергу дасть змогу більш глибокого розуміння основ функціонування PI3K/mTOR/S6K1 сигнального каскаду, а крім того сприятиме розробці та застосуванню в протипухлинній терапії інгібіторів S6K1 специфічних саме до онкогенних форм кінази.

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 бюджетної теми №2.2.4.10 – «Особливості структурно-функціональної 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 визначити механізми експресії, регуляції активності та функціональні особливості в клітині нової ізоформи кінази рибосомного білка S6 – p60-S6K1.

Відповідно до мети роботи було поставлено наступні завдання:

1. Перевірити можливість експресії ізоформи p60-S6K1 в клітинах HEK-293 внаслідок трансляції мРНК S6K1 з альтернативного третього старту трансляції в разі блокування за допомогою технології геномного редагування CRISPR/Cas9 перших двох стартів трансляції, специфічних для p70 та p85 ізоформ S6K1.
2. Із застосуванням біоінформатичного аналізу дослідити можливість існування сплайсових варіантів мРНК, відповідальних за трансляцію виключно p60-S6K1 ізоформи кінази, та експериментально перевірити таку можливість методом РНК-інтерференції.
3. З'ясувати чи виявляє ізоформа p60-S6K1 кіназну активність подібно до p70/p85-S6K1 ізоформ.
4. Оцінити статус фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за сайтами ключовими для активації p70/p85-S6K1 в клітинах різних ліній та за різних умов росту.
5. Визначити особливості модуляції активності ізоформи p60-S6K1 через PI3K/mTORC1-залежний сигнальний каскад у клітинах лінії HEK-293, які селективно експресують p60-S6K1.
6. Дослідити роль p60-S6K1 у функціонуванні клітин у контексті PI3K/mTOR-регульованих клітинних процесів, для чого проаналізувати вплив диференційної експресії різних ізоформ S6K1 в модельних клітинах HEK-293 на їхню проліферацію та міграцію.
7. Дослідити вплив селективної експресії p60-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах HEK-293 та MCF-7.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми функціонування PI3K/mTOR/S6K1-залежного сигнального шляху в нормі та патології.

Предмет дослідження – особливості експресії, регуляції активності та функціональна роль ізоформи p60-S6K1 в клітині в нормі та патології.

Методи дослідження – культивування клітинних ліній ссавців, виділення тотальної РНК з клітинних ліній, синтез кДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), кількісна ПЛР, електрофорез ДНК в агарозному гелі, клонування gRNA

та shRNA олігонуклеотидів, трансформація бактеріальних клітин, трансфекція клітин ссавців, електрофорез білків у поліакриламідному гелі, вестерн-блот, імунопреципітація, *in vitro* кіназна реакція, імуофлюоресцентний аналіз та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. У ході роботи вперше встановлено існування щонайменше двох механізмів експресії ізоформи p60-S6K1, яка може експресуватися в результаті трансляції двох окремих транскриптів – специфічного для p60-S6K1 сплайсового варіанту мРНК та спільного з p70/p85-S6K1 домінантного S6K1 транскрипту за рахунок альтернативної трансляції з використанням третього стартового кодону. Вперше показано, що p60-S6K1 має кіназну активність, яка, на відміну від домінантних ізоформ p70- та p85-S6K1, не регулюється через PI3K/mTORC1 сигнальний каскад і, відповідно, незалежна від мітогенної стимуляції щонайменше в клітинах лінії НЕК-293. Крім того, показано, що p60-S6K1 може виконувати у клітині функції відмінні від p70/p85-S6K1 ізоформ, а саме бути складовою системи ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу за умови пригнічення експресії ізоформи p70-S6K1. Таким чином, вперше показано зв'язок між експресією різних ізоформ кінази S6K1 та процесом епітеліально-мезенхімального переходу, внаслідок якого трансформовані клітини набувають інвазивного фенотипу.

Практичне значення одержаних результатів. Представлені результати дають підставу вважати, що ізоформа p60-S6K1 за умови пригнічення експресії p70-S6K1 може відігравати важливу роль в індукції епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах MCF-7, які мають епітеліальноподібний фенотип і виявляють низький рівень інвазивності. Таким чином, співвідношення експресії ізоформ p60- та p70-S6K1 може потенційно слугувати молекулярним маркером інвазивного раку молочної залози та використовуватись для ідентифікації пухлин, які мають високу здатність до метастазування. Крім того, ізоформа p60-S6K1 також може бути перспективною мішенню для створення специфічних інгібіторів з метою цільової терапії інвазивних типів карциноми молочної залози.

Особистий внесок здобувача. Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто здобувачем. Отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях. Імунофлюоресцентний аналіз проводили спільно з к.б.н., с.н.с. А.І. Хоруженко. Вестерн-блот аналіз експресії віментину в створеній клітинній лінії MCF-7 виконували спільно з к.б.н. В.Р. Косач. Отримання та аналіз клітин MCF-7 з вимкненою експресією ізоформи p85-S6K1 проводили у співпраці з В.В. Голяром. Динаміку міграції MCF-7 клітин з 3D сфероїдів на ростову поверхню проводили спільно з А.О. Кравченко та к.б.н. В.Р. Косач. Автор висловлює подяку д.б.н., проф. В.В. Філоненку за керівництво, допомогу в плануванні експериментів та обговорення отриманих результатів. Автор щиро вдячний співробітникам відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за корисні поради під час планування досліджень та обговорення результатів.

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 7-ми конференціях: XII International Young Scientists' Conference «Biology: from a molecule up to the biosphere» (Kharkiv, Ukraine, November 29th – December 1st, 2017), XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 15-16 травня 2018), Young scientists conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018” (Kyiv, Ukraine, May 23-25, 2018), XI Parnas Conference – Young scientists forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine” (Kyiv, Ukraine, September 3-5, 2018), XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 22-25 травня, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 8 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 247 найменувань. Дисертацію викладено на 154 сторінках стандартного машинопису, вона містить 26 рисунків, 3 таблиці та 3 додатки.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ізоформи S6 кінази 1 та їх будова

У 1990 році був клонований людський ген кінази 1 рибосомного білка S6 (S6K1) (1-2), *RPS6KB1*, який, як було далі показано (3), кодує дві ізоформи, трансляція яких відбувається шляхом використання альтернативних стартових кодонів. Такий транскрипт, довжиною 1578 нуклеотидів, складається з 15 екзонів (позначення цифрами у порядку зростання, наприклад, екзон 1, екзон 2, і т. д.) і трансляція обох ізоформ здійснюється з першого екзону. Переважаюча р70 кДа S6K1 ізоформа (р70-S6K1) транслюється з другого стартового кодону, який знаходиться в межах відкритої рамки зчитування, і містить 502 а.з. В той самий час, більш довга р85 кДа ізоформа (р85-S6K1), довжиною 525 а.з., містить додаткові 23 а.з. з N-кінця і її трансляція відбувається з першого стартового кодону.

S6K1 належить до родини AGC кіназ, назва якої відображає останні літери трьох головних представників: PKA, PKG та PKC (8-9). Кінази родини AGC мають низку спільних структурних особливостей, що зумовлює схожі механізми регуляції. S6K1 (р70-S6K1 або р85-S6K1) поділяють на декілька важливих регуляторних доменів: кислий N-кінець, який містить TOS (TOR signaling) мотив (сайт зв'язування комплексу mTORC1); кіназний домен, який містить T-петлю (сайт фосфорилування кіназою PDK1); лінкерна ділянка, яка містить TM (turn motif) та HM (hydrophobic motif, сайт фосфорилування кіназою mTOR) сайти; а також лужний C-кінець, який містить аутоінгібіторний псевдосубстратний домен. C-кінцевий домен є унікальним для S6K1 серед інших представників родини AGC кіназ і підлягає фосфорилуванню по багатьом сайтам. Більш того, в межах C-кінця наявний PDZ-зв'язуючий сегмент, який дозволяє S6K1 опосередковано зв'язуватись з актином через PDZ

домен білка нейрабіна та прямувати таким чином до нервових закінчень (4). Загалом, в основі регуляції S6K1 лежать дії цих модульних доменів, скоординовані за допомогою ієрархічного мультисайтового фосфорилування.

Згодом було з'ясовано, що в результаті альтернативного сплайсингу можуть утворюватись й інші S6K1 транскрипти, які кодують ізоформи, що є відмінними від доміантних p70- та p85-S6K1 (5-6). Такі сплайсові варіанти є мінорними і є менш представленими порівняно з доміантними S6K1 ізоформами. Спочатку, на додаток до повнорозмірних ізоформ, у 2007 році було показано наявність нової короткої ізоформи S6K1, p31-S6K1, або S6K1-isoform 2 (Iso-2) в клітинних лініях ссавців (5), довжина якої становить 316 а.з. Назва цієї ізоформи дана для мишиного сплайсового варіанту, в той час як у людини альтернативний сплайсинг продукує два коротких транскрипти, h6A та h6C, із трансляцією відповідних ізоформ (6). Транскрипт, який кодує мишину p31-S6K1 ізоформу, містить у порівнянні з доміантним транскриптом p70/p85-S6K1 додаткові екзони, а саме ба, бb та бс, які знаходяться в межах 6-го інтрона гена *RPS6KB1*. Альтернативний полі-А сайт для цього сплайсового варіанту розташований в межах 7-го інтрона. Короткі S6K1 ізоформи людини, як уже було сказано вище, представлені двома варіантами, h6A та h6C, у кожного з яких відсутній альтернативний екзон бВ і які мають один із двох екзонів: бА або бС. Таким чином, короткі S6K1 ізоформи людини містять різні С-кінці. У порівнянні з p70-S6K1 трансльовані короткі ізоформи містять такий самий N-кінець та N-кінцеву частину кіназного домену, в той час як С-кінець не має гомології з p70-S6K1 і не містить mTORC1-опосередкованого сайту фосфорилування. Таким чином, p31-S6K1, як і відповідні ізоформи у людини, містить ідентичний до p70-S6K1 АТФ-зв'язуючий сайт, але не містить консервативного аспартату в межах презумптивного активного сайту у порівнянні з доміантними ізоформами. Як наслідок, функціональні особливості короткої ізоформи, яка скоріше за все не має кіназної активності (6), ймовірно відрізняються від таких, які притаманні повнорозмірним ізоформам p70- та p85-S6K1. Було показано, що всі три короткі ізоформи

виявляють трансформуючу активність. Механізм, який лежить в основі онкогенних властивостей p31-S6K1 та відповідних людських ізоформ, залишається невідомим, але функція цих ізоформ ймовірно не залежить від кіназної активності.

Нарешті, в клітинних лініях раку молочної залози було ідентифіковано сплайсову ізоформу p60-S6K1 (7). При цьому було зроблено припущення, що дана ізоформа транслюється з домінантного p70/p85-S6K1 транскрипту шляхом альтернативної трансляції. Стартовий кодон для p60-S6K1 розташований через 87 нуклеотидів у напрямку 3'-кінця після другого старту трансляції. Внаслідок трансляції з третього стартового кодону продукується ізоформа, яка містить 472 а.з. і є вкороченою з N-кінця на 53 а.з. порівняно з p85-S6K1. У цієї ізоформи із-за вкороченого N-кінця відсутній TOS мотив, який є сайтом зв'язування білкового комплексу mTORC1, проте зберігаються інтактні кіназний та C-кінцевий домени.

1.2. Регуляція активності S6 кінази 1

1.2.1. Механізми регуляції S6K1. Кіназа S6K1 активується різноманітними ростовими факторами та мітогенами (наприклад, сироваткою, інсуліном або IGF (insulin-like growth factor), EGF (epidermal growth factor), форболовими ефірами) (10-11). Найкраще вивченим активатором S6K1 є інсуліновий шлях, який проводить сигнал через PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt для активації mTORC1 та S6K1 (12-13). Подібно до PI3K-залежного шляху, Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальний шлях також активує mTORC1. Проте, для максимальної активації кінази S6K1 обидва сигнальні шляхи кооперують з іншими сигнальними каскадами. Наприклад, G-білки Cdc42 та Ras, а також атипові ізоформи протеїнкінази C, PKC ζ та PKC λ , сприяють активації S6K1 (14-15).

У відповідь на сироватку та інсулін S6K1 підлягає фосфорилуванню за вісьмома добре визначеними сайтами (11). Активність S6K1 потребує

обов'язкового фосфорилування за трьома критичними сайтами: Т-петлевым сайтом у межах активаційної петлі (Thr229 у p70-S6K1; Thr252 у p85-S6K1), ТМ сайтом у межах лінкерного домену (Ser371 у p70-S6K1; Ser394 у p85-S6K1), а також НМ сайтом у межах того ж самого лінкерного домену (Thr389 у p70-S6K1; Thr412 у p85-S6K1), оскільки заміни амінокислот в кожному із цих сайтів на аланін дезактивують кіназу (16-17). Інгібітор комплексу mTORC1, рапаміцин, потужно блокує активацію S6K1 (18-20), що корелює із дефосфорилуванням НМ сайту, Т-петлевого сайту та Ser404, який розташований у межах лінкерної ділянки (21-22). Такі сайти фосфорилування вважаються рапаміцин-чутливими.

Існує дві моделі покрокової активації S6K1 шляхом комплексного мультисайтового фосфорилування (16,23-26). В цих моделях, фосфорилування S6K1 за множинними С-кінцевими сайтами є ранньою подією, яка прискорює mTORC1-опосередковане фосфорилування НМ сайту та PDK1-опосередковане фосфорилування Т-петлевого сайту. Етап, на якому відбувається фосфорилування ТМ сайту, залишається погано зрозумілим. Однак, нещодавнє дослідження показує, що фосфорилування ТМ сайту конститутивною кіназою є однією з найперших подій, яка може відбуватися котрансляційно (26), подібно до фосфорилування Thr450 у межах ТМ сайту кінази Akt (27).

Слід зауважити, що всі вищезгадані акти фосфорилування стосуються p70- та p85-S6K1 ізоформ. Щодо ізоформи p60-S6K1, то було показано, що вона також підлягає фосфорилуванню за НМ сайтом (Thr359), ТМ сайтом (Ser341) та С-кінцевими залишками треоніну (Thr391) та серину (Ser394) в клітинних лініях раку молочної залози (7). Проте, чи відбувається фосфорилування p60-S6K1 за PDK1-регульованим сайтом (Thr199) залишається незрозумілим.

Ранній етап активації S6K1 у відповідь на ростові фактори та мітогени полягає у фосфорилуванні S6K1 за чотирма пролін-спрямованими сайтами, які знаходяться в межах С-кінцевого аутоінгібіторного псевдосубстратного домену (Ser411, Ser418, Ser421 та Ser424) (24-25). На початку 1990-х дослідниками була висунута гіпотеза, що лужний С-кінцевий псевдосубстратний домен взаємодіє з

кислим N-кінцем, закриваючи таким чином кіназний домен, що призводить до неактивної конформації S6K1 кінази (1, 28). Мітоген-індуковане фосфорилування С-кінця знімає таке інгібування шляхом руйнування зв'язку між С- і N-кінцями. Це призводить до зміни конформації, що надає доступ до НМ та Т-петлевому сайтам. Хоча фосфорилування за чотирма С-кінцевими сайтами і сприяє активації S6K1, воно все ж таки не є ключовим (22, 29-30). Незважаючи на те, що пролін-спрямовані та мітоген-регульовані MAP кінази (ERK1/2, JNK1/2 та CDK1) фосфорилують вищезгадані С-кінцеві сайти *in vitro* (24), фізіологічні кінази для цих сайтів в інтактних клітинах залишаються невідомими.

У низці досліджень було показано, що mTORC1 напряду фосфорилує S6K1 за Thr389 в межах НМ мотиву з метою активації S6K1 (16, 30-33). У 2002 році була ідентифікована коротка N-кінцева послідовність ізоформи p70-S6K1 (FDIDL, а.з. 5-9), яка є ключовою для мітоген-стимульованої активації S6K1 та фосфорилування рапаміцин-чутливих сайтів, і була названа TOS (TOR signaling) мотивом (30, 34-37). Потім, у 2003 році, кілька дослідницьких груп показали, що з TOS мотивом напряду зв'язується білок *gaptor*, ключовий білок скафолду, який взаємодіє з кіназою mTOR для формування комплексу mTORC1. Далі було ідентифіковано мотив RSPRR у межах С-кінця p70-S6K1 (а.з. 410-414), з яким зв'язується N-кінець та нівелює інгібуючу дію С-кінця (38). Механізм, за допомогою якого TOS мотив здійснює супресію інгібуючої дії RSPRR мотиву, залишається невідомим.

Для максимальної активації S6K1 у відповідь на ростові фактори є необхідним скоординоване фосфорилування обох Thr229 та Thr389 сайтів (16, 23, 39). Використовуючи *in vitro* та *in vivo* підходи, було показано, що конститутивна кіназа PDK1 напряду фосфорилує Thr229 у межах Т-петлевої ділянки для активації S6K1 (16, 23, 39, 41-45), подібно до раніше ідентифікованої ролі кінази PDK1 у фосфорилуванні Thr308 у межах Т петлі Akt кінази (40).

Хоча активація S6K1 і потребує обов'язкового фосфорилування ТМ сайту за Ser371, проте регуляція і функція цієї події, а також ідентичність Ser371 кінази, залишаються невідомими (17, 30, 42). Нещодавні дослідження показали, що фосфорилування за Ser371 відбувається одночасно з трансляцією S6K1 (26). Тому, на даний момент припускають, що фосфорилування ТМ сайту відображає ранню подію, яка відбувається під час трансляції і передуює фосфорилуванню Т-петлевого та НМ сайтів.

Фосфорилування є найбільш зрозумілим механізмом, що лежить в основі регуляції S6K1, проте існують й інші механізми, зокрема дефосфорилування, ацетилювання, убіквітинування та контрольована субклітинна локалізація.

Вважається, що S6K1 є мішенню фосфатаз подібних до PP2A (protein phosphatase 2A). У дріжджів *S.cerevisiae*, регуляція TOR кіназою кількох субстратів відбувається шляхом супресії PP2A-подібних фосфатаз (50). Згідно даних літератури, у ссавців PP2A ко-імунопреципітується з S6K1 (51), але не із мутантним варіантом $\Delta NT/\Delta CT$ S6K1 (52), а генетична інактивація регуляторної субодиниці В' фосфатази PP2A (PP2A-B') призводить до порушеної регуляції dS6K (*Drosophila* S6K) та різних метаболічних дефектів (53).

Як було показано в багатьох дослідженнях, зміни у загальній кількості S6K1 можуть мати важливі наслідки щодо функціонування клітин (54-55). Наприклад, у клітинних лініях раку молочної залози, які мають підвищену експресію S6K1 внаслідок ампліфікації гена *RPS6KB1*, спостерігається підвищений рівень клітинної проліферації порівняно з клітинами, які мають нормальний рівень експресії S6K1 (54).

Ацетилювання та убіквітинування є посттрансляційними модифікаціями, які регулюють стабільність S6K1. Дві ацетилтрансферази, p300/CBP (cAMP-response-element-binding protein-binding protein) та PCAF (p300/CBP-associated factor), взаємодіють з S6K1 та ацетилюють її як *in vitro*, так і *in vivo* (56). Ацетилювання S6K1 відбувається в межах С-кінця (Lys493 для p70-S6K1

ізоформи) у відповідь на мітогени, і така модифікація шляхом ацетилювання відбувається незалежно від фосфорилування (57).

В літературі існують дані, які вказують на те, що S6K1 підлягає убіквітинуванню у відповідь на стимуляцію клітин мітогенами (58-59). З використанням дріжджової системи двогібридного скринінгу було показано, що убіквітинлігаза ROC1 взаємодіє з S6K1 кіназою та убіквітинує її (60).

На сьогоднішній день, питання щодо залучення субклітинної локалізації у регуляцію функціональної активності S6K1 залишається не повністю вирішеним. Хоча p70-S6K1 переважно локалізується у цитозолі, було ідентифіковано також і ядерний пул цієї ізоформи (62). Наявність сигналу ядерної локалізації (NLS – Nuclear Localization Signal) в межах N-кінцевого подовження ізоформи p85-S6K1 припускає, що остання може пересуватись у ядро, хоча ця думка має слабку експериментальну підтримку. Крім того, фосфорилування p70-S6K1 за Ser17 кіназою СК2 значно посилює ядерний експорт цієї ізоформи, таким чином утримуючи цитоплазматичний пул ізоформи в межах цитозолу після її активації (63).

1.2.2. Регуляція mTORC1/S6K1-залежного сигналювання. mTOR-залежне сигналювання виступає головним механізмом регуляції активності S6K1. mTOR належить до суперродини PI3K (PI3K-related kinase) і є серин-треоніною протеїнкіназою (12-13, 61). mTOR функціонує як сенсор середовища, оскільки відповідає на та інтегрує різні клітинні сигнали (наприклад, ростові фактори та мітогени, поживні речовини, енергія, стрес) для модуляції відповідним чином клітинної фізіології. mTOR формує каталітичний кор двох мультисубодиничних комплексів, mTORC1 та mTORC2. Ці комплекси містять як спільні, так і унікальні партнери, які надають цим двом комплексам різну чутливість до рапаміцину, регуляцію та вибір субстратів. Обробка клітин рапаміцином інгібує mTORC1, але не mTORC2 (66), проте у випадку довготривалої обробки клітин відбувається також інгібування mTORC2 (67).

У ссавців, як mTORC1 так і mTORC2 містять mTOR, mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein)/GβL (G-protein β-protein subunit-like) і dector (DEP

domain-containing mTOR-interacting protein) (68-69). Присутність білків raptor і PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) визначає mTORC1, в той час як присутність білків rictor, mSin1 (mammalian stress-activated MAPK-interacting protein 1) і pitor 1/2 (protein observed with rictor 1/2) визначає mTORC2. Raptor та rictor слугують у якості скафолду, який контролює збірку комплексу, регуляцію клітинними сигналами та вибір субстратів. На сьогоднішній день регуляція mTORC1 є набагато зрозумілішою за регуляцію mTORC2.

Інсуліновий сигнальний шлях є найбільш охарактеризованим серед усіх інших шляхів, які активують mTORC1 (12, 69). Зв'язування інсуліну чи IGF (insulin-like growth factor) з відповідним рецептором на поверхні клітини приводить до тирозинового фосфорилування білків IRS (insulin receptor substrate) з наступним рекрутуванням та активацією PI3K кінази. Генерування фосфатидилінозитол-3-фосфатів на плазматичній мембрані за участю PI3K кінази призводить до PDK1-опосередкованого фосфорилування Akt кінази в межах Т-петлі за Thr308 та mTORC2-опосередкованого фосфорилування за ТМ-сайтом (Ser473) (40, 67). Далі активована Akt кіназа фосфорилує білок Tsc2 (tuberous sclerosis complex 2) за кількома сайтами (Ser939 та Thr1462), а також білок PRAS40 за Ser246 (71-72), з метою супресії інгібіторного ефекту комплексу Tsc1-Tsc2 та білка PRAS40 на mTORC1, приносячи таким чином до посиленого mTORC1 сигналіngu (70). Білки Tsc1 та Tsc2 функціонують як супресори пухлин (73). Tsc2 (туберин) відносять до ГТФаза-активуючих білків і в якості його мішені виступає ГТФ-зв'язуючий білок Rheb (ras homolog enriched in brain), в той час як Tsc1 (гамартин) слугує для підтримки стабільності Tsc1-Tsc2 комплексу (74-75). Білок Rheb є найбільш проксимальним позитивним регулятором комплексу mTORC1. Цей білок взаємодіє з кіназним доменом білка mTOR для посилення рекрутування субстратів у ГТФ-залежний спосіб (76-77). До того ж, при активації інсуліном відбувається аутофосфорилування mTOR (Ser2481) у межах комплексів mTORC1 та mTORC2 (78), яке відображає внутрішню активність mTOR комплексів.

Літературні дані також вказують на те, що фосфорилювання білка mTOR та його партнерів по взаємодії (rapTOR, rictor, PRAS40 та deptor) сприяє регуляції комплексів mTORC1 та mTORC2. Наприклад, фосфорилювання mTOR за кількома сайтами (Ser1261, Ser2159 та Thr2164) посилює mTORC1 сигналювання і сприяє клітинному росту та прогресії через клітинний цикл (79-80). Внаслідок дії відповідних сигналів, mTOR, RSK та ERK (extracellular-signal-regulated kinase) фосфорилюють білок rapTOR, в той час як Akt та mTOR фосфорилюють PRAS40, що в кінці кінців посилює mTORC1 сигналювання (71-72, 81-87).

Незалежно від інсулінового сигнального шляху, мітоген-активованій Ras/MEK/MAPK сигнальний каскад активує mTORC1 через негативну регуляцію комплексу Tsc1/Tsc2. Подібно до Akt, кінза ERK та її субстрат RSK (Ribosomal S6 Kinase) фосфорилюють Tsc2 за Ser540, Ser644 та Ser1798, що, у свою чергу, інгібує функцію комплексу Tsc1/Tsc2 (88-89), а також позитивно регулюють білок rapTOR, фосфорилюючи останній за Ser8/ Ser696/ Ser863 та Ser719/Ser721/Ser722 відповідно (83-84).

Фосфатидна кислота (ФК), ліпідний вторинний месенджер, продукція якої відбувається шляхом PLD-залежного гідролізу фосфатидилхоліну, зв'язує FRB домен кінзи mTOR і сприяє таким чином mTORC1 сигналінгу у рапаміцин-чутливий спосіб (90-91). Було показано, що ФК сприяє збірці обох mTORC1 та mTORC2 комплексів, що посилює mTOR сигналювання (92).

Після ініціації TNF α (tumor necrosis factor α) сигналювання, активована кінза ІКК β (inhibitor of NF- κ B (nuclear factor- κ B) kinase- β) зв'язується з та фосфорилює Tsc1 (Ser487 та Ser511), що призводить до дисоціації комплексу Tsc1/Tsc2, mTORC1 активації і підвищенням пухлинному ангиогенезу та інсуліновій резистентності (93-94). Додатково, інсулін та TNF α сприяють mTORC1 сигналюванню через механізм, який включає пряму взаємодію ІКК α з mTORC1 у Akt-незалежний спосіб (95-96), що сприяє NF- κ B-залежній транскрипційній активності (97). Також було показано, що ІКК-споріднена

кіназа TBK1 (TNF-receptor-associated factor-associated NF- κ B activator-binding kinase 1) фосфорилує Akt за Thr308 та Ser473 (98-100).

Для активації mTORC1 обов'язковими є амінокислоти. Таким чином, навіть за присутності надлишку ростових факторів, вилучення амінокислот, особливо амінокислот із розгалуженими боковими ланцюгами лейцину та ізолейцину, швидко інгібує mTORC1 сигналювання (101). Двонаправлена пермеаза амінокислот SLC7A5-SLC3A2, яка імпортує в клітину лейцин через плазматичну мембрану й одночасно експортує глутамін, є важливою для активації mTORC1 (102). Хоча механізм, за допомогою якого клітини відчують рівні амінокислот, залишається невідомим, були знайдені кілька біохімічних медіаторів, які пов'язують відчуження амінокислот та mTORC1, а саме hVPS34 (кіназа ліпідів класу III, яка функціонує у вакуолярному сортингі та аутофагії у дріжджів), ГТФаза RalA та ГТФази Rag (13, 69, 81).

Родина ГТФаз Rag є найбільш охарактеризованою ланкою між відчуженням рівнів амінокислот та mTORC1 (103-104). При стимуляції амінокислотами активні гетеродимери Rag (наприклад, RagB^{ГТФ}- RagD^{ГДФ}) зв'язуються з mTORC1 шляхом взаємодії з білком raptor, що дозволяє комплексу mTORC1 локалізуватися у Rab7-позитивному мембранному компартменті пізніх ендосом/лізосом, який також, як було показано, містить екзогенний Rheb (103). Таким чином, mTORC1 повинен знаходитись у правильному субклітинному компартменті для того, щоб бути активованим білком Rheb. У наступних дослідженнях було відкрито білковий комплекс, який містить три білки (MP1, p14 та p18) і було названо "Ragulator" (106), і показано, що цей комплекс розташовується на мембранах лізосом і рекрутує гетеродимери Rag (105). Таким чином, при стимуляції амінокислотами активні гетеродимери Rag, які зв'язані з комплексом Ragulator, рекрутують mTORC1 до лізосом для активації у Rheb-залежний спосіб (105). Було також показано участь ГТФаз родини Rab, які функціонують в ендцитозному трафікінгу (наприклад, Rab5 та Rab7), а також Rac1, ГТФази родини Rho, у модуляції mTORC1 сигналювання (107-108).

Різні форми клітинного стресу негативно регулюють mTORC1 сигналінг, зокрема вилучення глюкози (енергетичний стрес), гіпоксія, пошкодження ДНК та стрес ER (ендоплазматичний ретикулум) (69). Енергетичний стрес, спричинений вилученням глюкози або хімічним інгібуванням гліколізу чи мітохондріального дихання, веде до швидкого зниження рівнів клітинного АТФ (аденозинтрифосфат), підвищення співвідношення АМФ/АТФ у клітині та активації кінази АМПК (AMP-activated kinase) (109). Активована АМПК фосфорилує Tsc2 (Ser1227 та Ser1345) (110) та білок raptor (Ser792 та Ser722) (111) для посилення інгібування комплексу mTORC1 (112).

Гіпоксія також знижує рівні АТФ, призводячи таким чином до АМПК-опосередкованої негативної регуляції mTORC1 через механізми, що описані вище. Використовуючи механізм, який є незалежним від рівнів АТФ, гіпоксія стабілізує транскрипційний фактор HIF1 (hypoxia-inducible factor 1), який індукує експресію низки генів, що залучені до процесу виживання клітини, зокрема REDD1 (regulated in development and dna damage responses 1) (113-114), який приводить до активації Tsc1-Tsc2 з наступним інгібуванням mTORC1 (115). У відповідь на пошкодження ДНК, стабілізація та активація транскрипційного фактора p53 веде до індукції експресії сестринів 1 і 2, які зв'язуються з та активують АМПК через невідомий механізм для негативної регуляції mTORC1 (116). Стрес ER викликається акумуляцією неправильно згорнутих білків, що активує каскад сигнальної трансдукції, відомий як відповідь на незгорнуті білки, який уповільнює глобальний білковий синтез. Стрес ER веде до позитивної регуляції REDD1 на транскрипційному рівні, призводячи до негативної регуляції mTORC1 сигналювання (117).

На відміну від mTORC1, регуляція і функції mTORC2 комплексу залишаються погано зрозумілими і потребують подальших досліджень. mTORC2 фосфорилує Akt, SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1) і PKC α за сайтами у межах гідрофобного мотиву (Ser473, Ser422 та Ser657, відповідно) (118-121, 128). На основі регуляції цих субстратів, mTORC2 ймовірно контролює клітинну проліферацію, клітинне виживання та клітинний

метаболізм. Додатково, в дріжджах і ссавцях mTORC2 модулює актиновий цитоскелет (123-126). Звідси випливає, що обидва комплекси mTORC1 та mTORC2 залучені до регуляції представників родини AGC кіназ, оскільки субстратом mTORC1 є S6K1, а субстратами mTORC2 є Akt, SGK1 та PKC α , і всі ці субстрати належать до родини AGC кіназ. Важливо зазначити, що є дані щодо залучення додаткових кіназ до фосфорилування Akt за HM сайтом (Ser473), зокрема DNA-ПК (DNA-dependent protein kinase) (127) та ІКК-пов'язані кінази TBK1 та IKK ϵ (98-100). Цікаво, що Tsc1-Tsc2 комплекс не інгібує, а навпаки сприяє активності mTORC2, на відміну від mTORC1. Дане спостереження вказує на те, що регуляція mTORC2 може значно відрізнятися від регуляції mTORC1 (128-129).

1.5. Клітинні субстрати і функції S6 кінази 1

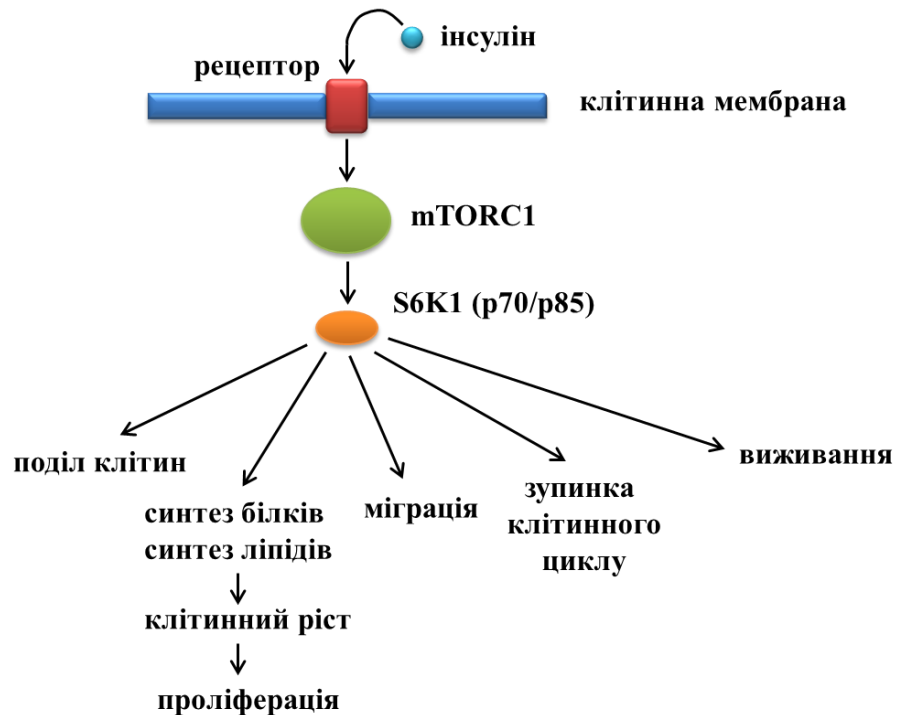
На клітинному рівні mTORC1 функціонує як основний регулятор ініціації трансляції, етапу, який лімітує швидкість синтезу білка. Вважається, що підвищені рівні білкового синтезу сприяють клітинному росту (збільшення клітин у розмірах та зростання їхньої маси), що є обов'язковою умовою для прогресії клітинного циклу та проліферації (збільшення клітин у кількості). mTORC1 сприяє клітинному росту та клітинній проліферації шляхом фосфорилування S6K1 та 4EBP1 (130-131) у відповідь на анаболічні сигнали з навколишнього середовища.

З часів відкриття S6 кінази 1 було ідентифіковано велику кількість субстратів даної кінази. Окрім субстратів, які залучені до контролю білкового синтезу, було знайдено додаткові субстрати, які приймають участь у регуляції біогенезу рибосом на транскрипційному рівні, метаболізмі, синтезі ліпідів та диференціації адипоцитів, а також виживанні клітин, клітинній міграції, детекції пошкодження ДНК та синаптичній пластичності (рис. 1.1). S6K1 також регулює кілька компонентів mTOR сигнального каскаду через петлі зворотнього зв'язку, у деяких випадках негативно регулюючи інсулінове

сигналювання, що робить певний внесок у розвиток резистентності до інсуліну, викликаючи стани діабету та ожиріння. Важливо зазначити, що багато субстратів S6K1 (наприклад, rpS6, eIF4B, eEF2K, CCT β , BAD, GSK3) також слугують субстратами для RSK, ілюструючи наявність конвергенції між mTORC1 та MAPK сигнальними шляхами при регуляції клітинної фізіології.

Біосинтез білка належить до ключових клітинних процесів, які контролюються через mTORC1-залежне сигналювання. За відсутності сигналів, які активують mTORC1, гіпофосфорильований білок 4EBP1 зв'язується з фактором трансляції eIF4E та здійснює репресію функції останнього. Білок eIF4E напряму взаємодіє з 5'-кепом (132). Що стосується S6K1 кінрази, то за відсутності мітогенних сигналів пул неактивної S6K1 є асоційованим з мультисубодиничним білком скафолду eIF3 (133). У відповідь на mTORC1-активуючі сигнали, mTORC1 зв'язується з eIF3, займаючи таким чином зручну позицію для фосфорилування S6K1 (за Thr389) та 4EBP1 за кількома сайтами (Thr37, Thr46, Thr70 та Ser65). mTORC1-опосередковане фосфорилування білків 4EBP1 та S6K1 викликає відповідно дисоціацію 4EBP1 та eIF4E і також дисоціацію S6K1 та eIF3. Дисоціація 4EBP1 дає змогу білку eIF4G зв'язатися з eIF4E, оскільки зв'язування 4EBP1 та eIF4G (модулярний скафолд) з eIF4E є взаємовиключною подією. Після цього eIF4G рекрутує хеліказу eIF4A, яка є необхідною для руйнування інгібуючих вторинних структур у межах 5'-нетрансляючої ділянки мРНК. Дані події ведуть до формування на 5'-кепі білкового комплексу eIF4F, який складається з eIF4E, eIF4G та eIF4A. Зібраний комплекс eIF4F далі рекрутує маленьку субодиницю рибосоми 40S та потрійний комплекс (складається з eIF2, Met-тРНК та ГТФ) до 5'-кепу для формування преініціаторного комплексу трансляції 48S.

Спрощена схема
mTORC1-залежного
сигнального шляху



Ефекти S6K1 на
клітинному рівні

Рис. 1.1. Схематичне зображення функцій mTORC1/S6K1 сигнального каскаду.

При mTORC1-опосередкованій дисоціації S6K1 та eIF3, активна S6K1 фосфорилує кілька субстратів, які функціонують в ініціації трансляції, а також інших етапах білкового синтезу. До таких субстратів належать eIF4B (eukaryotic initiation factor 4B) (134-135), PDCD4 (programmed cell death 4) (136), SKAR (S6K1 Aly/REF-like substrate) (137-138), eEF2K (139), CCT β (140), CBP80 (141) та rpS6 (ribosomal protein S6) (142). S6K1- та RSK-опосередковане фосфорилування білка eIF4B (Ser422) індукує рекрутування білка eIF4B до eIF4A та eIF3 (133-135), посилюючи хеліказну активність eIF4A. S6K1-опосередковане фосфорилування білка PDCD4 (Ser67), інгібітора eIF4A, додатково підсилює хеліказну активність eIF4A. Окрім ініціації трансляції, S6K1 також залучена до регуляції етапу елонгації трансляції. S6K1 фосфорилує та інактивує кіназу eEF2K (Ser366), підвищуючи таким чином активність eEF2, білка, який каталізує транслокацію рибосоми під час елонгації трансляції.

Іншою ланкою біосинтезу білка, що регулюється за допомогою S6K1, є сплайсинг первинних транскриптів. Позитивна регуляція сплайсингу опосередковується через Cdc42/S6K1 сигнальний шлях, ймовірно шляхом прямого фосфорилування комплексу CBC (Cap-Binding Complex) кіназою S6K1 (143, 188). За даними літератури, S6K1 також здатна фосфорилувати білок CBP80, який разом із CBP20 формує гетеродимерний комплекс, що ко-транскрипційно зв'язується із 5'-кеп структурою та підсилює мРНК сплайсинг (141).

Контроль білкового синтезу mTORC-S6K1 сигнальною гілкою також здійснюється і на транскрипційному рівні шляхом фосфорилування транскрипційного фактора UBF-1 кіназою S6K1 (144-145), що приводить до активації транскрипції генів, які кодують рРНК. Було показано, що S6K1 також приймає участь у фолдингу синтезованих білків, фосфорилуючи білок ССТβ (Ser260), який взаємодіє з рибосомами та зростаючими поліпептидами (140). Нарешті, S6K1 фосфорилує рS6 за кількома сайтами (Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 та Ser247) (142), у той час як RSK фосфорилує тільки деякі з цих сайтів (Ser235 та Ser236) (138, 146). Слід зауважити, що функціональне значення фосфорилування рS6 залишається погано зрозумілим (10, 47, 55, 147-150).

Для підвищення рівнів біосинтезу ліпідів у клітинах mTORC1-залежний сигнальний каскад використовує як транскрипційні, так і посттранскрипційні механізми. На транскрипційному рівні одним із регуляторів синтезу ліпідів є родина транскрипційних факторів SREBP (sterol regulatory element binding protein), до складу якої входять SREBP1 та SREBP2. Комплекс mTORC1 підвищує рівні експресії ліпогенних ферментів через активацію SREBP1/2 двома шляхами: (i) інактивує негативні регулятори цих транскрипційних факторів, або (ii) підвищує рівні експресії цих факторів (151-155, 232).

Нещодавно було відкрито ще один шлях регуляції біосинтезу ліпідів через mTORC1/S6K1 сигналювання. Виявилось, що mTORC1 сприяє біогенезу ліпідів через регуляцію SRPK2 (SR protein kinase 2), кінази, яка модулює функцію

РНК-зв'язуючих білків SR (serine/arginine-rich) і, таким чином, є залученою до метаболізму мРНК (156).

Ряд досліджень, де використовувалися культури клітин, генетично модифіковані дрозофіли та миші, показали, що клітинний ріст є головною функцією mTORC-S6K1 сигнального шляху (46-47, 55, 137, 150, 157-159). Було також показано, що на контроль клітинного росту впливає здатність mTORC1/S6K1 сигнального шляху посилювати біосинтез ліпідів та білків, оскільки нокдаун ліпогенного транскрипційного фактору SREBP (sterol-regulatory-binding element) у *D.Melanogaster* та клітинах ссавців блокує збільшення клітинного розміру, яке зумовлене PI3K/Akt сигналюванням (150).

Вважається, що mTORC1 сигналювання сприяє прогресії клітинного циклу через G1 фазу та проліферації (47, 160-161), хоча молекулярний механізм, який лежить в основі mTORC1-регульованої проліферації, залишається погано зрозумілим. Варто зазначити, що S6K1, як було засвідчено у (54), здатна модулювати проліферацію клітин ліній раку молочної залози шляхом стимуляції транскрипційної активності рецептора естрогену (ER α), фосфорилуючи цей рецептор за Ser167, що приводить до підвищених рівнів проліферації.

mTORC1/S6K1 сигнальний шлях приймає участь у кількох петлях зворотнього зв'язку. У низці робіт було виявлено S6K1-опосередковане фосфорилування IRS-1 за залишками серину у положеннях 302, 307 та 1101 (162-165). На додаток, mTORC1 також фосфорилує IRS-1 (Ser636/Ser639) (162). За даними проведених досліджень, S6K1 та mTORC1 здійснюють репресію IRS-1 як на транскрипційному рівні (164), так і на посттрансляційному, де фосфорилування залишків серину білка IRS-1 індукує деградацію IRS-1 через протеасомний шлях (166) і, таким чином, викликає дисоціацію PI3K та інсулінового рецептора. Отже, хронічна mTORC1-опосередкована активація S6K1 індукує стан клітинної резистентності до інсуліну за допомогою механізму, який називається "петля негативного зворотнього зв'язку" (163-164, 166-167). Інактивація цієї петлі зворотнього зв'язку при інгібуванні mTORC1

також може частково пояснити чому використання рапалогів (наприклад, CCI-779 та RAD001) зазнало невдачі при анти-ракових клінічних випробуваннях (66, 168).

При активації mTORC1, S6K1 приймає участь і в інших петлях зворотнього зв'язку, функціональне значення яких поки залишається незрозумілим. S6K1 фосфорилує mTOR (Ser2448) (169-170) та rictor (Thr1135) (171-174). Разом з пригніченням функції IRS1 за допомогою S6K1, було визначено, що mTORC1 також опосередковує негативний зворотній зв'язок у напрямку інсулінового сигналіngu шляхом інгібуючого фосфорилування білка Grb10 (175-176).

Транскрипційне профілювання з використанням мікроареїв встановило як позитивну, так і негативну роль mTORC1 сигналювання в контролі експресії генів (177-179). Дані досліджень виявили, що mTORC1 сигналювання позитивно регулює експресію генів, які залучені до синтезу ліпідів, стеролів, нуклеотидів та білків, а також генів, які залучені до оксидативної функції мітохондрій, гліколізу та пентозо-фосфатного шляху. В той самий час, mTORC1 сигналювання негативно регулює експресію генів, які залучені до розпаду поживних речовин та продукції енергії (177, 179). На молекулярному рівні, питання про те, як mTORC1 сигналювання контролює експресію генів, залишається погано зрозумілим. Останнім часом було показано, що mTORC1 сигналювання модулює експресію генів через транскрипційні фактори HIF1 α , SREBP1 та SREBP2 (150, 179). HIF1 α сприяє експресії генів гліколізу, у той час як SREBP1 та SREBP2 активують експресію генів, які залучені у пентозо-фосфатний шлях та біосинтез стеролів і ліпідів. Окрім фосфорилування транскрипційного фактора UBF-1, було показано, що у відповідь на стимуляцію сироваткою кіназа S6K1 фосфорилує і трансактивує CREM τ (cAMP-response-element modulator τ) (Ser117) (180). На додаток, S6K1 фосфорилує естрогеновий рецептор α (Ser167), приводячи до його активації і сприяючи, таким чином, розвитку раку молочної залози (54).

За відсутності функціонування Tsc1/Tsc2, що приводить до високої активності S6K1 і низької активності Akt із-за інгібування PI3K/Akt за

зворотнім зв'язком, кіназа S6K1 фосфорилує та інактивує мультифункціональну кіназу GSK3 (181). S6K1 також є залученою в окремі етапи диференціації адипоцитів, а саме у перетворення стовбурових клітин на ранні попередники адипоцитів (182-184), але не є критичною для термінальної диференціації попередників адипоцитів у власне адипоцити (182). Також S6K1 залучена у процес клітинного виживання, інгібуючи шляхом фосфорилування білок BAD (Ser136), який є проапоптичним білком родини BCL-2 (185). У кількох роботах було показано залучення S6K1 у регуляцію клітинного руху (187-190). Однак механізм, за яким S6K1 модулює клітинний рух, залишається на даний момент погано зрозумілим. У середині 1990-х років було виявлено роль інтегринових рецепторів (187) та G білків Rho сімейства (188), Cdc42 та Ras1, в активації S6K1. В іншому дослідженні було виявлено роль S6K1 у регуляції актинового цитоскелету (189), особливо у регуляції арг структур, формування яких вважається функціональним індикатором мігруючих клітин (191). Сигналювання через mTORC/S6K1 також приймає участь у відповіді на пошкодження ДНК. За генотоксичного стресу p38α MAPK сигнальний шлях активує mTORC1/S6K1, де S6K1 зв'язується з Mdm2 (murine double minute 2) і фосфорилує цей білок за Ser163, блокуючи його ядерний імпорт і, таким чином, здатність убіквітинувати білок p53, який індукує зупинку клітинного циклу та апоптозу (192). Додатково було показано локалізацію ізоформи p70-S6K1 у нейронах та нервових закінченнях, яка здійснюється шляхом зв'язування p70-S6K1 з білком нейрабіном (31). Нарешті, mTORC1/S6K1 сигнальний шлях приймає участь у процесі синаптичної пластичності, який залежить від білкового синтезу. У відповідь на стимуляцію рецептора mGluR (metabotropic glutamate receptor) першого типу, який локалізований в межах гіпокампу, S6K1 фосфорилує білок FMRP (fragile X mental retardation protein). FMRP являє собою РНК-зв'язуючий білок і приймає участь у репресії транскрипції та синаптичній пластичності (193-194). Таким чином, S6K1-опосередковане фосфорилування білка FMRP може модулювати навчання та пам'ять.

1.6. Роль S6K1 у розвитку патологій людини

Безліч даних вказує на важливу роль S6K1 у розвитку багатьох патологічних станів, зокрема діабету, ожиріння, раку та доброякісних пухлин, гіпертрофії органів, неврологічних розладів (наприклад, аутизму та Альцгеймеру) і патологій, що пов'язані зі старінням (13, 194-195). Вважається, що усі ці фізіологічні відповіді виникають за впливу mTORC1/S6K1 на синтез білків та ліпідів, клітинний ріст, проліферацію та метаболізм.

1.6.1. Участь S6K1 в ініціації та прогресії ракових захворювань. mTORC1/S6K1 сигнальний шлях часто виявляє посилену активацію при раку, особливо за умов підвищеного (внаслідок онкогенної активації PI3K чи мутагенної інактивації фосфатази PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)) PI3K сигналювання (13, 66, 168). В результаті, mTOR сигналювання виявилось привабливою мішенню для розробки нових терапевтичних підходів при лікуванні раку та різних пухлинних синдромів.

Гіперактивація PI3K/mTORC1/S6K1 сигнального шляху є залученою до канцерогенезу раку молочної залози (PMЗ), особливо ER⁺ молекулярного підтипу (позитивний за естрогеновим рецептором) (207), а також до розвитку резистентності до ендокринної терапії (208). Наприклад, часто спостерігається надекспресія гена S6K1 у клінічних зразках PMЗ, внаслідок ампліфікації хромосомного локуса 17q23, який містить ген кінази S6K1 (*RPS6KB1*), і такий фенотип корелює з поганим прогнозом у пацієнтів (203-206). Було показано, що S6K1 стимулює проліферацію клітин PMЗ через позитивну регуляцію естрогенового рецептора ER α шляхом фосфорилування (54). Таким чином, S6K1 разом з ER α може бути потенційно використана як мішень для терапії PMЗ.

У нещодавній роботі було показано, що інгібування S6K1 у клітинах тричі негативного PMЗ призводить до суттєвого зниження рівнів міграції та інвазії цих клітин, вказуючи, таким чином, на важливу роль S6K1 у функціонуванні клітин метастатичного PMЗ (209). На додаток, було виявлено, що активація

S6K1 індукує трансформацію епітеліальних клітин молочної залози негативних за естрогеновим рецептором (ER⁻) (210).

Декілька літературних джерел вказує на існування коротких S6K1 ізоформ, p31-S6K1, h6A та h6C, які мають онкогенну активність і здатні трансформувати ембріональні фібробласти миші та епітеліальні клітини молочної залози людини (5-6).

Підвищені експресія та активність S6K1 також залучені до ініціації та прогресії інших типів раку, зокрема раку простати, легень, шлунку, стравоходу та пухлин головного мозку. S6K1 може відігравати важливу роль у прогресії раку простати, посилюючи здатність клітин до міграції, їхнє виживання, а також резистентність до хіміотерапії, зокрема доцетакселю (211). Є кілька досліджень, які припускають, що важливу роль як маркер прогресії пухлин відіграє експресія саме фосфорильованої S6K1, тобто активованої форми, у зразках карциноми легень (212), астроцитоми (213), карцином шлунку (214) та стравоходу (215), а також раку яєчника та передміхурової залози (216). Було також показано, що S6K1 залучена до патогенезу пухлин головного мозку, а саме гліоми та менінгіоми, а також раку ендометрія та щитоподібної залози (216-222).

У 2007 та 2009 роках були схвалені агентством FDA (Food and Drug Administration) рапалоги CCI-779 (темсіролімус) і RAD0001 (еверолімус). Дані засоби є аналогами рапаміцину і направлені на лікування раку нирки. Проте, загалом рапалоги показали доволі низьку ефективність у протиракових клінічних випробуваннях, ймовірно із-за пригнічення mTORC1-опосередкованої петлі зворотнього зв'язку, що викликає небажаний ефект посилення РІЗК сигналювання (223-227).

На додаток, нещодавно стало зрозумілим, що рапаміцин і рапалоги інгібують фосфорилування не всіх субстратів mTORC1 (228). Отже, існують рапаміцин-чутливі (наприклад, S6K1) та рапаміцин-нечутливі mTORC1 субстрати (наприклад, 4EBP1), що може частково пояснювати низьку клінічну ефективність рапалогів як протипухлинних засобів. Для покращення дії

інгібіторів mTORC1 були нещодавно розроблені АТФ-конкурентні каталітичні інгібітори mTOR (наприклад, Torin1, PP242, Ku-0063794 та WAY600), які здатні інгібувати як mTORC1, так і mTORC2 (168, 229-230). Крім цього, були також розроблені інгібітори подвійної специфічності, які здійснюють інгібування як mTOR, так і PI3K (231).

Слід зауважити, що розробленню S6K-специфічних інгібіторів (направлених проти S6K1, або S6K2) було приділено значно менше уваги у порівнянні з іншими представниками AGC родини протеїнкіназ. Дослідники зосередилися в основному на використанні інгібіторів головних шляхів сигнальної трансдукції, які регулюють активність S6 кіназ, таких як mTOR-залежний (рапаміцин і рапалоги) та PI3K-залежний шляхи (вортманін і LY-294002). Між тим, S6K1 та S6K2 є привабливими мішенями для розробки ліків, направлених на рак, метаболічні розлади та старіння. У 2007 році, було ініційовано клінічні випробування XL418, першого інгібітора з подвійною специфічністю до S6K та Akt. Цей інгібітор був розроблений компанією Elexixis і його тестування на доклінічних моделях тварин та клітинних ліній виявило значний рівень інгібування Akt та S6K, а також зменшений ріст пухлин. Однак, клінічні випробування були призупинені внаслідок низької ефективності доставки препарату в цільові сайти.

1.6.1. Роль S6K1 у розвитку метаболічних розладів, гіпертрофії органів та патологій, пов'язаних зі старінням. Делеція S6K1 у мишей призводить до низки фізіологічних змін. На додаток до зменшених розмірів тіла та органів, у S6K1^{-/-} мишей виявлені гіпоінсулінемія та відсутність толерантності до глюкози із-за недостатньої продукції інсуліну β-клітинами підшлункової залози, яка частково виникає внаслідок зменшення розмірів β-клітин (159). Печінки мишей дикого типу та хворих на ожиріння, але не нокаутних за S6K1 мишей, які ростуть на дієті з високим вмістом жирів, виявляють підвищені рівні фосфорилування IRS-1 та послаблене PI3K/Akt сигналювання (165).

mTORC1/S6K1 сигналювання також контролює метаболізм адипоцитів. Миші, нокаутні за S6K1, містять меншу кількість адипоцитів із-за зменшеного

рівня диференціації стовбурових клітин в адипогенні попередники (182). На додаток, миші здатні зберігати менше жиру порівняно з мишами дикого типу внаслідок посиленого ліполізу триацилгліцеролів, посилених біогенезу мітохондрій та β -окислення жирних кислот, які виникають із-за підвищеної активності AMPK (148, 196). Так само, інгібування mTORC1 у культивованих адипоцитах шляхом додавання рапаміцину чи нокдаун білка rapTOR посилює ліполіз, пригнічує ліпогенез і, таким чином, зменшує зберігання жиру (197-198).

Результати досліджень, які були направлені на визначення ролі S6K1 у контролі маси тіла та енергетичного балансу, є досить суперечливими (162,199-202). З одного боку, миші, нокаутні за S6K1, виявляють резистентність до ожиріння, яке індуковане віком та дієтою, виявляючи позитивну роль mTORC1/S6K1 сигнального шляху у збільшенні маси тіла (162). З іншого боку, модуляція активності S6K1, особливо у медіобазальному гіпоталамусі мозку щурів, показує протилежну роль S6K1 у контролі харчування та підтримці енергетичного балансу (199).

На додаток до позитивної регуляції росту клітин та органів, mTORC1 сигналювання є залученим до патологічної відповіді, яка індукує гіпертрофію органів, що пояснюється збільшенням маси та розмірів органу в першу чергу за рахунок клітинної гіпертрофії, а не гіперплазії. Інгібування mTORC1 за допомогою рапаміцину в мишах зменшує сердечну гіпертрофію, викликану навантаженням, та компенсаторну гіпертрофію нирки, яка відбувається за видалення останньої (233-234). Миші, нокаутні за S6K1, виявляють резистентність до ниркової нефропатії, яка викликана діабетом та нефректомією (235). Проте, нокаут гена S6K1, а також одиночний S6K2 чи подвійний S6K1/S6K2 нокаутні є недостатніми для обумовлення резистентності до серцевої гіпертрофії, яка індукується через PI3K сигналювання (145). Проте, S6K1 може бути достатньою для розвитку серцевої гіпертрофії, оскільки надекспресія S6K1 в серці індукує помірну гіпертрофію (145). Крім того, S6K1 сприяє гіпертрофії гладкої мускулатури дихальних шляхів, структурній зміні,

яка асоціюється з астмою та гіперчутливістю дихальних шляхів (158) і сприяє м'язевій гіпертрофії, оскільки S6K1 нокаутні миші виявляють атрофію скелетних м'язів (47).

Низькокалорійна дієта та генетична інактивація компонентів інсулінового шляху сигнальної трансдукції підвищує тривалість життя і знижує ризик розвитку патологій, пов'язаних зі старінням, в таких модельних організмах, як *C.cerevisiae*, *C.elegans* та *D.melanogaster* (236). Поточна думка полягає в тому, що TOR сигналювання сприяє старінню через механізми, які можуть включати підвищену продукцію побічних продуктів метаболізму, порушену здатність підтримувати функцію стовбурових клітин, а також супресію автофагії (236-239). Роль білкового комплексу mTORC1 у старінні ссавців була показана з відкриттям того, що миші, яким додають в дієту рапаміцин, живуть довше за контрольних мишей (240). Більш того, нокаут гена S6K1 в мишах чи в *C.elegans* (*rsk-1*) подовжують тривалість життя (241). Варто відмітити, що S6K1 нокаутні миші виявляють знижену схильність до розвитку патологій, пов'язаних зі старінням, зокрема кісткової, імунної та моторної дисфункцій.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

В роботі були використані хімічні реактиви компаній “ThermoFisher Scientific” (США), “Merck” (США), “Sigma-Aldrich” (США), “NEB” (Великобританія), “Fluka” (США), “Bio-Rad” (США), “Serva” (Німеччина), “Difco” (США), або вітчизняні реактиви кваліфікації “хч” і “осч”. Для стерилізації розчинів використовували вертикальний паровий стерилізатор DGM-200S (Швейцарія). У роботі були використані ферменти виробництва компаній “ThermoFisher Scientific” (США) та “Applied Biosystems” (США). Суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз було придбано у компанії “Roche” (Німеччина). Набори для виділення РНК, плазмідної ДНК, а також екстракції ДНК з агарозного гелю були придбані у “ThermoFisher Scientific” (США). Протеїн G агароза була виробництва компанії “Generon Ltd.” (США).

Матеріали для культивування клітинних ліній ссавців були придбані у компаній “Invitrogen” (США), “HyClone” (США) та “Lonza Xpress™” (США). Для роботи з клітинними лініями ссавців і для їх культивування використовували відповідно ламінарний бокс II класу захисту і CO₂-інкубатор виробництва “Nuairе” (США). Імунофлюоресцентний аналіз проводили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss LSM510 (Німеччина).

Праймери, що використовувалися для дослідження рівнів експресії генів за допомогою ПЛР та кількісного ПЛР аналізу, наведені в табл. 2.1. та 2.2. відповідно.

Антитіла, які використовувалися в роботі при застосуванні методів імунопреципітації та вестерн-блот аналізу, представлені в табл. 2.3.

Таблиця 2.1.

Праймери, що використовувалися для дослідження рівнів експресії генів за допомогою ПЛР

Назва гена (білка)		Праймер	Послідовність	Розмір фрагменту (пн.)
<i>RPS6KB1</i> (S6K1 – 5'-кінець)		Прямий	5'-CTTCCGAGACAGGGAAGCTG-3'	555
		Зворотній	5'-GCCAAGTAAAAGCAGGCAGTG-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1 – 3'-кінець)		Прямий	5'-CACCTCGAAGATTTATTGGCA-3'	260
		Зворотній	5'-GTGCTCTGGCCGTTTGG-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1)	Інсерція	Прямий	5'-TTCTGTCGGGAGTAGCACTG-3'	787
	Екзон 9	Зворотній	5'-GTGCTGTGGATTGGTGGAGT-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1)	Інсерція	Прямий	5'-TTCTGTCGGGAGTAGCACTG-3'	257
	Екзон 3	Зворотній	5'-GTGCTGTGGATTGGTGGAGT-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1)	Екзон 2	Прямий	5'-GACCATATGAACTTGGCATGG-3'	174
	Екзон 4	Зворотній	5'-TCCCAGTATTTGCTCCTGTTAC-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1)	Екзон 14	Прямий	5'-CACCTCGAAGATTTATTGGCA-3'	260
	Екзон 15	Зворотній	5'-GTGCTCTGGCCGTTTGG-3'	
<i>RPS6KB1</i> (S6K1)	Екзон 1	Прямий	5'-AGACAGGGAAGCTGAGGACA-3'	1510
	Екзон 15	Зворотній	5'-GTGCTCTGGCCGTTTGG-3'	
<i>ACTB</i> (β-актин)		Прямий	5'-GGACTTCGAGCAAGAGAT-3'	234
		Зворотній	5'-AGCACTGTGTTGGCGTAC-3'	

Таблиця 2.2.

Праймери, що використовувалися для дослідження рівнів експресії генів за допомогою кількісного ПЛР-аналізу

Назва гена (білка)	Праймер	Послідовність	Розмір фрагмен ту (пн.)
<i>CDH1</i> (Е-кадгерин)	Прямий	5'-GCCGAGAGCTACACGTTTCAC-3'	117
	Зворотній	5'-GTCGAGGGAAAAATAGGCTG-3'	
<i>CDH2</i> (N-кадгерин)	Прямий	5'-GTGCATGAAGGACAGCCTCT-3'	133
	Зворотній	5'-AGCTTCTCACGGCATAACCC-3'	
<i>VIM</i> (Віментин)	Прямий	5'-GAAATTGCAGGAGGAGATGC-3'	122
	Зворотній	5'-GCAAAGATTCCACTTTGCGT-3'	
<i>SNAI1</i> (SNAI1)	Прямий	5'-ACCACTATGCCGCGCTCTT-3'	115
	Зворотній	5'-GGTCGTAGGGCTGCTGGAA-3'	
<i>TWIST1</i> (TWIST1)	Прямий	5'-TACGCCTTCTCGGTCTGGAG-3'	291
	Зворотній	5'-CGTCTGGGAATCACTGTCCA-3'	
<i>ZEB2</i> (ZEB2)	Прямий	5'-CCCAGGAGGAAAAACGTGGT-3'	274
	Зворотній	5'-CTGGACCATCTACAGAGGCTT-3'	
<i>TBP</i> (TBP)	Прямий	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	132
	Зворотній	5'-CACATCACAGTCCCCACCA-3'	

Таблиця 2.3.

Антитіла, які використовувалися у роботі при застосуванні методів імунопреципітації та вестерн-блот аналізу

Антитіла	Виробник	Розведення антитіл
Кролячі поліклональні анти-S6K1 (С-кінець)	(Savinska et al., 2001)	1 : 3000
Кролячі поліклональні анти-S6K1 (N-кінцевий сигнал ядерної локалізації)	(Savinska et al., 2015)	1 : 2000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-p70-S6K1(Thr389)	Cell Signaling Technology (108D2, Cat#9234)	1 : 2000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-p70-S6K1(Ser371)	Cell Signaling Technology (Cat#9208)	1 : 2000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-p70-S6K1(Thr421/Ser424)	Cell Signaling Technology (Cat#9204)	1 : 2000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-p70-S6K1(Thr229)	R&D Systems (1015B, Cat#MAB8964)	1 : 1500
Мишині моноклональні анти-6x-His Таг	Thermo Fisher Scientific (HIS.H8, Cat#MA1-21315)	1 : 1500
Кролячі поліклональні анти-фосфо-ppS6(Ser235/236)	Cell Signaling Technology (Cat#2211)	1 : 2000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-ppS6(Ser240/244)	Cell Signaling Technology (D68F8, Cat#5364)	1 : 2000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-Akt(Ser473)	Cell Signaling Technology (Cat#9271)	1 : 2000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-eIF4B(Ser422)	Cell Signaling Technology (Cat#3591)	1 : 2000

Кролячі поліклональні анти-фосфо- eEF2k(Ser366)	Cell Signaling Technology (Cat#3691)	1 : 2000
Мишині моноклональні анти- β -актин	Sigma-Aldrich (AC-15, Cat#A5441)	1 : 20000

2.2. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній ссавців

Тотальна РНК була екстрагована з клітинних ліній за допомогою набору реагентів “GeneJET RNA purification kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Клітини ($2-3 \times 10^6$) ресуспендували у 600 мкл лізуючого буфера, який містив 100 мМ ДТТ, після чого ретельно перемішували суміш. На наступному етапі до лізованих клітин додавали 360 мкл етанолу (96%) і перемішували зразок шляхом піпетування. Далі лізат переносили у колонку для очищення РНК і центрифугували протягом 1 хв при 12000 x g. Після видалення “проскоку” колонку зі зв’язаною РНК промивали 3 рази буфером для промивки і, нарешті, виконували етап елюції додаванням 100 мкл деіонізованої води, вільної від нуклеаз. Етапи промивки та елюції супроводжувалися центрифугуванням за умов, які були викладені вище. Концентрацію РНК вимірювали за допомогою приладу NanoDrop™ (“ThermoFisher Scientific, США”).

2.3. Синтез кДНК

Перед синтезом кДНК тотальну РНК обробляли ДНКазою I (“Thermo Fisher Scientific”, США). Склад реакційної суміші (загальний об’єм складав 10 мкл): тотальна РНК (1 мкг), реакційний буфер, ДНКазу I (1 U). Суміш інкубували протягом 30 хв при 37°C, додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та інкубували протягом 10 хв при 65°C для інактивації ДНКазу I. Приготовлені зразки РНК використовувалися для зворотної транскрипції.

Синтез першого кДНК ланцюгу проводили з використанням одного з двох наборів реагентів: “RevertAid Reverse Transcriptase” (“Thermo Fisher Scientific”, США) та “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (“Applied Biosystems”, США). У першому випадку, в реакційну суміш (загальний об’єм 20 мкл) додавали 11 мкл тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою I, 1 мкл Oligo(dT)18 праймерів (0,5 мкг), 4 мкл 5X реакційного буфера, 0,5 мкл інгібітора РНКаз “RiboLock”, 2 мкл 10 мМ дНТФ та 1 мкл зворотної транскриптази “RevertAid”. Перед додаванням зворотної транскриптази проводили денатурацію РНК протягом 10 хв при 65°C. Далі, для синтезу кДНК повну реакційну суміш інкубували протягом однієї години при 42°C із подальшою термінацією реакції шляхом інкубування суміші при 70°C протягом 10 хв. У другому випадку, реакційна суміш (загальним об’ємом 20 μ l) складалася з 11 мкл тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою I, 2 мкл 10X “Random” праймерів, 2 мкл 10X реакційного буфера, 1 мкл інгібітора РНКаз, 0,8 мкл 100 мМ дНТФ та 1 мкл зворотної транскриптази “MultiScribe”. Готову суміш по черзі інкубували 10 хв при 25°C, 2 год при 37°C та 5 хв при 85°C.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для оцінки рівнів експресії р60-S6K1 транскрипту в клітинних лініях за допомогою праймерів, специфічних до р60-S6K1 (екзон 1a-9) та S6K1 (екзон 2-4), S6K1 (екзон 14-15), β -актину в якості контролів, проводилась полімеразна ланцюгова реакція з використанням набору реагентів “DreamTaq DNA Polymerase” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакційну суміш (загальним об’ємом 25 мкл) готували наступним чином: додавали 2,5 мкл 10X “DreamTaq” буфера, 0,5 мкл 10 мМ дНТФ, 2 мкл 5 мкМ специфічних праймерів, 1 мкл синтезованої кДНК, “DreamTaq” полімерази та 19 мкл води, вільної від нуклеаз. Усі реакції ампліфікації ДНК методом ПЛР проводилися з використанням приладу “FlexCycler” (“Analytik Jena”, Німеччина). Умови реакції були задані

наступним чином: попередня денатурація – 2 хв, 95°C, з наступними 35 циклами денатурації (25 с, 95°C), відпалу праймерів (25 с, 55°C або 57°C в залежності від праймерів) та елонгації (1 хв, 72°C), а також етапом кінцевої елонгації (5 хв, 72°C). Для визначення рівнів експресії S6K1 транскрипту з використанням праймерів до екзонів 14 і 15, застосовували набір реагентів “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакційна суміш (загальним об’ємом 25 мкл) складалась із 5 мкл 5X “Phusion HF Buffer”, 0,5 мкл 10 мМ дНТФ, 2 мкл 5 мкМ специфічних праймерів, 1 мкл синтезованої кДНК, 0,2 мкл “Phusion DNA Polymerase” та 16,3 мкл води, вільної від нуклеаз.. Усі реакції проводили на приладі “FlexCycler” (“Analytik Jena”, Німеччина) при початковій денатурації протягом 1 хв при 98°C, 35 циклах денатурації (10 с, 98°C), відпалу (25 с, 62°C) та елонгації (1 хв, 72°C), а також кінцевій елонгації протягом 5 хв при 72°C. Утворення відповідних фрагментів ПЛР було в подальшому проаналізовано за допомогою електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

2.5. Електрофорез ДНК в агарозному гелі

Для приготування агарозного гелю розчиняли агарозу у 1X ТАЕ буфері з наступним кип’ятінням для повного розчинення агарози. Після охолодження розчину агарози до 50°C додавали бромистий етидій в концентрації 0,5 мкг/мл. Концентрація агарозного гелю залежала від довжини утворених продуктів ПЛР. Для розділення фрагментів довжиною до 500 п.о. готували 2% агарозний гель (маса/об’єм). У випадку розділення фрагментів ПЛР, довжина яких становила більше 500 п.о., готували 1% агарозний гель (маса/об’єм). Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили при напрузі 5 В/см. В якості буфера для електрофорезу застосовували 1X ТАЕ. Візуалізацію розділених фрагментів ПЛР робили за допомогою опромінення гелю ультрафіолетом при використанні приладу “ChemiDoc” (“Bio-Rad”, США).

2.6. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція

Для вимірювання відносної експресії цільових генів у клітинних лініях використовували метод кількісної ПЛР. Реакції проводили із застосуванням набору реагентів “Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)” (“Thermo Fisher Scientific”, США). У реакційну суміш загальним об’ємом 25 мкл додавали 12,5 мкл “Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)”, 2 мкл 5 мкМ праймерів, 0,5 мкл синтезованої кДНК та 10 мкл води, вільної від нуклеаз. Умови ПЛР були задані згідно з рекомендаціями виробника (початкова денатурація – 10 хв, 95°C; 40 циклів: денатурація – 15 с, 95°C, відпал – 30 с, 60°C, елонгація – 30 с, 72°C) і реакції проводилися з використанням приладу “Thermal Cycler CFX96 Real-Time System” (“Bio-Rad”, Сінгапур). Для кожної реакції було зроблено три технічні повтори. Аналіз кривих плавлення показав, що присутні одиночні амплікони для кожної використаної пари праймерів, що означає відсутність неспецифічних продуктів реакції. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували ΔC^t метод розрахунку. В якості референційного гена використовували *TBP*, відносно якого і проводився розрахунок експресії цільових генів.

2.7. Дизайн gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування S6K1 гена

Для дизайну олігонуклеотидів, які відповідають послідовності гідової РНК (gRNA), комплементарної до послідовності цільового гена, був використаний веб-ресурс <http://crispr.mit.edu/>. Окрім відбору відповідних послідовностей gRNA, даний веб-інструмент виконує пошук неспецифічних мішеней gRNA у межах заданого геному і розраховує “параметр якості” для кожної вибраної послідовності gRNA. Чим вище значення параметру, тим більш специфічно вибрана послідовність gRNA зв’язується із цільовою послідовністю гена. У поточній роботі було вибрано 3 пари gRNA олігонуклеотидів, які націлені на

послідовності гена S6K1 для селективного вимкнення вказаних нижче ізоформ.

Послідовності gRNA олігонуклеотидів є наступними:

1) p60⁻/p70⁻/p85⁻

Верхній ланцюг: 5'-**CACCG**ACTTCGGGTACTTGGTAAAG-3'

Нижній ланцюг: 5'-**AAAC**CTTTACCAAGTACCCGAAGTC-3'

2) p60⁺/p70⁺/p85⁻

Верхній ланцюг: 5'-**CACCG**AGCCCCGGACTTCCGAGACA-3'

Нижній ланцюг: 5'-**AAAC**TGTCTCGGAAGTCCGGGGCTC-3'

3) p60⁺/p70⁻/p85⁻

Верхній ланцюг: 5'-**CACCG**TCCTCAGAGCCCGCGTCCTC-3'

Нижній ланцюг: 5'-**AAAC**GAGGACGCGGGCTCTGAGGAC-3'

Літери, які позначені червоним кольором відповідають послідовності рестриктного сайту рестриктази BbsI, яка була використана для клонування gRNA олігонуклеотидів у ДНК векторі. Нуклеотид G у межах верхнього ланцюга та комплементарний йому нуклеотид C, що позначені голубим кольором, були введені у послідовність для підвищення ефективності транскрипції gRNA з U6 промотора (Ran et al., 2013). Підкреслені послідовності олігонуклеотидів відповідають послідовностям gRNA.

2.8. Клонування gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування S6K1 гена

Для клонування gRNA олігонуклеотидів був використаний ДНК вектор pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Процедура клонування складалася з наступних етапів: фосфорилювання та відпал gRNA олігонуклеотидів, рестрикція ДНК вектору з наступним дефосфорилюванням, лігування олігонуклеотидів та вектору.

На першому етапі, gRNA олігонуклеотиди оброблялися T4 полінуклеотидкіназою (T4 Polynucleotide Kinase) ("Thermo Fisher Scientific", США). Реакцію (загальним об'ємом 25 мкл) замішували із додаванням 25

пмоль кожного з олігонуклеотидів (по 1 мкл), 2 мкл 10X буферу, 2 мкл 10 мМ АТФ, 1 мкл Т4 полінуклеотидкінази та 13 мкл води. Реакційну суміш старанно перемішували та інкубували протягом 20 хв при 37°C. Після реакції фосфорилування проводили відпал олігонуклеотидів за наступних умов: нагрівали реакцію до 95°C, інкубували протягом 2 хв за цієї ж температури та охолоджували до 25°C із кроком 1°C за 1 хв.

Рестрикцію ДНК вектору виконували з використанням рестрикційного ферменту BbsI (“Thermo Fisher Scientific”, США) у реакції загальним об’ємом 20 мкл із додаванням 2 мкг вектору, 2 мкл 10X буферу та 1 одиницю рестриктази. Далі реакційну суміш інкубували протягом 2 год при 37°C з наступним додаванням 1 одиниці лужної фосфатази (calf intestinal alkaline phosphatase) (“Thermo Fisher Scientific”, США) та інкубацією протягом 5 хв при 37°C.

Наступним кроком було лігування ДНК вектору та олігонуклеотидів у реакції з Т4 ДНК лігазою (T4 DNA ligase) (“Thermo Fisher Scientific”, США). До реакційної суміші (загальний об’єм становив 10 мкл) додавали ДНК вектор та олігонуклеотиди у молярному співвідношенні 1:2, реакційний буфер та Т4 ДНК лігазу. Суміш інкубували протягом 15 хв при 37°C та використовували для подальшої трансформації клітин *E.coli* штаму XL-GOLD. З метою перевірки наявності олігонуклеотидів у ДНК векторі після реакції лігування використовували ПЛР аналіз (опис даний у підрозділі 2.4) та секвенування ДНК із використанням приладу Applied Biosystems™ 3130 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США). У випадку ПЛР аналізу використовувався U6 праймер в якості прямого праймеру (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3') та олігонуклеотид, який відповідав нижньому ланцюгу gRNA олігонуклеотидів, застосовували в якості зворотнього праймеру.

2.9. Клонування shRNA у ДНК векторі

Олігонуклеотиди, які відповідають shRNA, що є специфічною до інсерції р60-S6K1 транскрипту, були клоновані у векторі pSUPER.retro.puro з використанням сайтів рестрикції BglIII та HindIII. Процедура клонування описана у підрозділі 2.8. Послідовності олігонуклеотидів були наступними:

Верхній ланцюг

GATCCCCGCTGCATCTTCCAATCTTCTTCAAGAGAGAAGATTGGAAGATG
CAGCTTTTТА

Нижній ланцюг

AGCTTAAAAAGCTGCATCTTCCAATCTTCTTCTTGAAGAAGATTGGAAG
ATGCAGCGGG

Підкреслені послідовності відповідають послідовностям, які є комплементарними інсерції транскрипту р60-S6K1.

2.9. Трансформація клітин *E.coli* плазмідною ДНК

Аліквоту суспензії об'ємом 100 мкл компетентних клітин *E.coli* штаму XL-GOLD розморозували у крижаній бані та додавали до цих клітин 5 мкл лігазної суміші. Суміш обережно перемішували та інкубували у крижаній бані протягом 20 хв. Далі проводили тепловий шок на водяній бані за температури 42°C протягом 1 хв з наступною інкубацією у крижаній бані протягом 2 хв. Потім додавали до клітин 1 мл середовища LB, яке не містило антибіотику, та інкубували протягом 1 год при 37°C. Після інкубації клітини осаджували за допомогою центрифугування при 3500 обертів за хвилину протягом 5 хв, видаляли з пробирки 3/4 об'єму супернатанту, ресуспендували осаджені клітини в об'ємі, який залишився, та висівали клітинну суспензію на стерильну чашку Петрі з твердим поживним середовищем за допомогою шпателя. Тверде середовище містило 1,5% бактоагару, розчиненого у середовищі LB, та

відповідний антибіотик. Чашки Петрі з висіяними клітинами інкубували протягом ночі при 37°C.

2.10. Культивування клітин ссавців

У роботі використовувалися клітинні лінії аденокарциноми молочної залози людини MCF-7, ембріональної нирки людини HEK-293, аденокарциноми шийки матки людини HeLa, гострої Т-клітинної лейкемії людини Jurkat, гістіоцитарної лімфоми людини U-937, гепатоцелюлярної карциноми людини HepG2, гліобластоми людини U-373 та гліоми людини U-87. Для культивування MCF-7, HEK-293 та HeLa клітин використовували середовище Ігла, модифіковане Дульбекко (DMEM) ("Gibco BRL", США), до якого додавали 10% ембріональної сироватки бика (FBS) ("Gibco BRL", США), 2 мМ L-глутаміну, 50 од/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину. Клітинні лінії Jurkat, U-937 та HepG2, U-373, U-87 росли відповідно у RPMI-1640 та мінімальному середовищі Ігла (EMEM) ("Gibco BRL", США) з додаванням реагентів, які описані вище.

Усі клітини культивували при 37°C у зволоженій атмосфері, яка містила 5% CO₂. До початку роботи клітинні лінії зберігалися у розчині для криоконсервації, який містив 10% диметилсульфоксиду (ДМСО), у рідкому азоті за температури -196°C. При розморожуванні клітин до них додавали 10 мл середовища без сироватки і проводили центрифугування при 1000 обертів за хвилину протягом 5 хв. Потім видаляли надосадову рідину, розчиняли осад із клітин у 8-10 мл середовища із сироваткою і висівали ресуспендовані клітини на чашку Петрі діаметром 10 см. Заміна середовища зростаючим клітинам здійснювалась раз на дві-чотири доби в залежності від клітинної лінії.

У випадку адгезивних клітинних ліній, при досягненні клітинами 90% конфлюентності їх пересівали у нову 10 см чашку Петрі у розведенні один до чотирьох. Для відкріплення клітин з поверхні чашки середовище відбирали, промивали клітини двічі розчином PBS та інкубували у розчині трипсину з

ЕДТА (10 мг/мл трипсину (“Gibco BRL”, США) та 1 mM ЕДТА) об’ємом 1 мл на 10 см чашку протягом 2-4 хв. Після обробки клітин розчином трипсину їх ресуспендували у культуральному середовищі із сироваткою та вносили у нові культуральні чашки. Що стосується суспензійних клітинних ліній (Jurkat та U-937), то пересівання проводили один раз на три-чотири доби при досягненні клітинами щільності $1,5 \times 10^6$ /мл у такому самому співвідношенні, як і для адгезивних клітинних ліній. Суспензійні клітини осаджували за допомогою центрифугування при 1000 обертів за хвилину протягом 5 хв, видаляли надосадове середовище, розчиняли у PBS і повторювали процедуру центрифугування. Промивку розчином PBS проводили двічі, після чого клітини розчиняли у 8-10 мл і переносили у культуральні флакони площею 25 см².

Після проведення необхідних експериментів клітини ($1,5 \times 10^6$ /мл) розчиняли в об’ємі 1 мл повного культурального середовища із додаванням 10% ДМСО та заморожували в кріопробірках, які поміщали спочатку на -70°C, а потім через добу в рідкий азот.

2.11. Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК

Клітини росли до конфлюентності 90% і переносили у кількості 50000 на лунку до 24-лункового планшету. Через 24 год клітинам замінювали культуральне середовище (700 мкл на лунку) і через 2 год додавали 100 мкл суміші для трансфекції, яка містила 150 mM розчин NaCl, 2 мкл реагенту для трансфекції jetPEI (“Polyplus-transfection”, США) та 1 мкг ДНК вектору. Далі клітини інкубували протягом 24 год при 37°C та переносили на 10 см чашку з використанням 100 мкл розчину трипсину з ЕДТА. Середовище на 10 см чашці містило селективний маркер – пуроміцин (2.5 мкг/мл). Селекцію клітин проводили протягом 24 год, після чого замінювали середовище на нове, але без пуроміцину, та інкубували клітини до тих пір, поки окремі клітини не утворили колонії достатнього розміру, щоб їх можна було відібрати для подальшого культивування. Після відбору колоній клітини переносили у лунки 24-

лункового планшету (кожна колонія в окрему лунку), які містили по 1 мл культурального середовища. При досягненні клітинами стану 90% конфлюентності їх переносили у 10 см чашки і росли до потрібної конфлюентності з подальшим використанням для аналізу отриманих клонів.

2.12. Дослідження функціонального стану PI3K/mTOR сигнального каскаду за умов стимуляції ростовими факторами та дії специфічних інгібіторів у культивованих клітинах

Клітини у кількості 2×10^5 висівали на 3.5 см чашки Петрі в 1,5 мл середовища, або у кількості 1×10^6 на 10 см чашку в залежності від умов експерименту, і росли до досягнення клітинами 70-80% конфлюентності. За зазначеного стану конфлюентності у клітин, які відповідали контрольним, відбирали середовище, промивали розчином PBS та заморожували (-20°C). Інші клітини, які підлягали голодуванню та подальшій обробці ростовими факторами та інгібіторами PI3K/mTOR сигнального шляху, промивали двічі розчином PBS та інкубували в 1,5 мл нового середовища, яке не містило сироватки, протягом 24 год. На наступному етапі, після голодування, одну чашку, яка відповідала в експерименті голодуючим клітинам, промивали розчином PBS та заморожували (-20°C). До інших клітин додавали 20% сироватки ("Gibco BRL", США), інкубували протягом 1 год при 37°C та заморожували, або додавали mTORC1-специфічний інгібітор рапаміцин ("Cell Signaling Technology", США) у концентрації 20 нМ. У присутності інгібіторів клітини культивували при 37°C протягом 30 хв, після чого додавали 20% сироватки та інкубували за умов, які описані вище.

2.13. Приготування лізатів клітин ссавців

Перед лізисом усі клітини промивали двічі холодним PBS і додавали в залежності від кількості культивованих клітин відповідний об'єм попередньо

охолодженого буферу для лізису клітин (100-400 мкл) прямо у чашку. Склад буферу для лізису був наступний: 25 мМ тріс, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЕДТА, 0,5% Triton X-100, 5% гліцерол, 1 мМ ортованадату натрію, 2,5 мМ пірофосфату натрію, 1 мМ β -гліцерофосфату, коктейлі інгібіторів протеаз ("Roche", Німеччина) та інгібіторів фосфатаз ("Sigma-Aldrich", США). Клітини у буфері на чашці розтирали шпателем і переносили у нові мікропробірки, які перемішували протягом 30 хв при 4°C. Після цього мікропробірки центрифугували при 13000 об/хв протягом 15 хв за 4°C для виокремлення розчинної фракції лізату клітин. Надосадову рідину відбирали, яка являла собою розчинну фракцію, і переносили у нові мікропробірки для використання у подальших дослідженнях. Концентрацію білка розраховували за методом Бредфорд, шляхом змішування 3 мкл клітинного лізату та 150 мкл реагенту Coomassie Protein Assay Reagent ("Thermo Fisher Scientific", США). Реакційну суміш інкубували у темряві за кімнатної температури протягом 10 хв. Потім розраховували поглинання суміші за довжини хвилі 570 нм за допомогою приладу BioTek ELx800 ("BioTek Instruments, Inc.", США). Концентрацію білків у пробах розраховували відносно поглинання розчину альбуміну сироватки бика ("Pierce", Франція).

2.14. Електрофорез білків у поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Електрофоретичне розділення білків у лізатах проводили у денатуруючих умовах у камерах для вертикального електрофорезу ("Clever Scientific", Велика Британія). Для розділення білків використовували 5% концентруючий та 8-12% розділяючий гелі за співвідношення акриламідну та біс-акриламідну 29:1. Вибір концентрації акриламідну/біс-акриламідну в розділяючому гелі залежав від молекулярної маси досліджуваних білків. Перед внесенням у поліакриламідний гель до білків додавали буфер Лемлі (200 мМ тріс, 5% ДСН, 50% гліцерол, 0.1% бромфеноловий синій, 250 мМ дитіотреїтол) та інкубували

суміш протягом 5 хв при 95°C. Білкові лізати вносили у гель в кількості 5-30 мкг на лунку. Електрофорез проводили у тріс-гліциновому буфері (25 мМ тріс, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН) за фіксованої напруги 170 В.

2.15. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення білки переносили із гелю на попередньо активовану метанолом полівініліденфторидну (PVDF) мембрану Immobilon®-P (“Millipore”, США) в апараті для електропереносу “Hoefler” (США). Буфер для електропереносу білків містив 25 мМ трісу, рН 8,3, 192 мМ гліцину та 20% метанолу. Переніс білків здійснювали за фіксованої сили струму при 250 мА протягом 1 год. Після перенесення білків мембрану інкубували у 5% розчині знежиреного сухого молока, розчиненого у буфері TBS-T (20 мМ тріс, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20), протягом 30 хв для блокування сайтів неспецифічного зв’язування антитіл. Після блокування мембрану промивали буфером TBS-T та інкубували з первинними антитілами, розчиненими у TBS-T, протягом ночі при 4°C у розведенні характерному для кожного окремого виду антитіл (розведення первинних антитіл наведені у табл. 2.3). Далі мембрану відмивали принаймні три рази по 5-10 хв з використанням буферу TBS-T та інкубували з видоспецифічними, мишиними або кролячими, вторинними антитілами (“Jackson ImmunoResearch”, Велика Британія), які кон’юговані з пероксидазою хрому, у розведенні 1:10000 у буфері TBS-T (з 5% знежиреним молоком) протягом 1 год за кімнатної температури. Потім мембрану промивали принаймні 3 рази у буфері TBS-T протягом 5-10 хв. Детектування сигналів від вторинних антитіл на мембрані проводили використовуючи реакцію підвищеної хемілюмінесценції (ECL). Процедура детектування полягала в інкубуванні мембрани з розчином, який містив 100 мМ тріс, рН 8,8, 0,002% люмінолу (“Sigma”, США), 0,004% кумарової кислоти (“Sigma”, США) та 0,001% пероксиду водню (“Sigma”, США), та експонуванні з рентгенівською плівкою (“Afga”, США).

2.16. Імунопреципітація

Імунопреципітацію S6K1 ізоформ проводили з використанням кролячих поліклональних антитіл проти С-кінця S6K1, які на першому етапі інкубували із суспензією протеїн G агарози (“Generon Ltd.”, США) протягом 2 год за кімнатної температури (2,5 мкг антитіл та 10 мкл агарози, урівноваженої буфером для лізису клітин). Після цього протеїн G агарозу разом зі зв’язаними антитілами змішували з розчинними фракціями клітинних лізатів (300-400 мкг), які були приготовлені як описано вище, та інкубували з перемішуванням протягом ночі при 4°C. Як негативний контроль використовували протеїн G агарозу без зв’язаних антитіл та інкубували з клітинними лізатами за тих самих умов. Далі імунопреципітати та негативні контролю промивалися принаймні тричі буфером для лізису клітин і використовувалися для подальшої кіназної реакції.

2.17. *In vitro* кіназна реакція

Імунопреципітати та негативні контролю, промиті у буфері для лізису, надалі двічі промивали кіназним буфером, який містив 25 мМ тріс, рН 7,5, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 0,1 мМ ортованадат натрію та 5 мМ β-гліцерофосфат. Після етапу промивки зразки інкубували з рекомбінантним білком 6X-His-γS6 у присутності 1 мМ АТФ у кіназному буфері. Після 30 хв інкубації при 37°C реакції були зупинені шляхом додавання 2X буфера Лемлі та подальшої інкубації при 95°C протягом 5 хв. Усі зразки потім аналізували за допомогою вестерн-блот аналізу.

2.18. Імунофлуоресцентний аналіз

Досліджувані клітини висівали на стерильні покривні скельця (Menzel-Gläser, Німеччина), які були розташовані у лунках 24-лункового планшету у

кількості 40×10^3 на лунку. Клітини культивували до досягнення ними стану конфлюентності 70-80% і фіксували 10% формаліном протягом 15 хв з наступною трьохразовою промивкою буфером PBS. Після етапу фіксації клітинні мембрани пермеабілізували розчином 0,2% Triton X-100 (розчинений у PBS). Далі покривні скельця інкубували у розчині 10% ембріональної сироватки теляти (FCS) протягом 30 хв за 37°C у вологій камері для блокування неспецифічного зв'язування. Знову тричі промивали PBS та додавали первинні антитіла у відповідних розведеннях з подальшою інкубацією протягом ночі при 4°C . Первинні антитіла проти віментину (V9, Cat#V6389, "Sigma-Aldrich", США), С-кінця S6K1 (Savinska et al., 2001) та N-кінцевого сигналу ядерної локалізації (Savinska et al., 2015) розводили відповідно 1:100, 1:100 та 1:50. Наступного дня скельця з фіксованими клітинами промивали три рази розчином PBS та додавали видоспецифічні вторинні антитіла ("Jackson ImmunoResearch", Велика Британія), які були мічені флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ), у розведенні 1:400 у буфері PBS. Інкубація з вторинними антитілами проводилась протягом 1 год при 37°C у вологій камері. Скельця з обробленими клітинами закріплювали на мікропрепаратах за допомогою середовища Mowiol 4-88 ("Sigma-Aldrich", США), яке містило 2,5% DABCO ("Sigma-Aldrich", США) та 0,5 мг/мл DAPI ("Pierce", США). Флуоресцентний барвник DAPI використовувався для фарбування клітинних ядер. Мікропрепарати далі аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії з використанням приладу Zeiss LSM 510 META Confocal Microscope ("Zeiss AG", Німеччина).

2.19. Аналіз швидкості міграції клітин за допомогою методу раневої поверхні

Клітини висівали на 3,5 см чашки Петрі та росли до досягнення 100% конфлюентності для формування моношару. Після цього посередині чашки проводили стерильним носиком саплера "подряпину". Клітини промивали двічі розчином PBS від тих клітин, які від'єдналися, і додавали нове

середовище в об'ємі 1,5 мл на чашку. Одразу після проведення “подряпини” та через 24 год клітини аналізували з використанням мікроскопу Leica DM 1000 Microscope (“Leica Microsystems GmbH”, Німеччина) за збільшення 25х. Фотографували п'ять полів зору у межах “подряпини” для кожного зразка досліджуваних клітин. Фотографії робили за допомогою цифрової камери для мікроскопії eTREK DCM 320. Також окремо фотографували спеціальне скельце з нанесеною розміткою, де ціна поділки дорівнювала 1 мкм. Після цього фотографії були проаналізовані за допомогою програми ImageJ. Використовуючи фотографію скельця з розміткою у програмі були задані параметри визначення відстані у мкм. Ширину “раневої поверхні” визначали шляхом обчислення площі поверхні “рани” та її довжини і знаходили відношення площі до довжини, що і становило досліджувану ширину. Для розрахунку швидкості міграції клітин (мкм/год), від ширини “подряпини” на початку експерименту віднімали ширину “подряпини” через 24 год та отримане число ділили на 2. Експеримент з використанням методу “раневої поверхні” проводили у трьох незалежних повторах і значення швидкості міграції виражали як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення.

2.20. Аналіз рівнів проліферації клітин із використанням МТТ-тесту

Клітини були висіяні у лунки 96-лункового планшету щільністю 7500 клітин на лунку у 100 мкл культурального середовища. Кожна досліджена клітинна лінія була поділена на чотири групи по шість технічних повторів. Першу групу культивували протягом 5 год і визначали як точку 0 год. Клітини в інших трьох групах росли протягом 24, 48 та 72 год. Наприкінці зазначеного часу до кожної лунки у межах певної групи клітин додавали 10 мкл 5 мг/мл МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (“Sigma-Aldrich”, США), після чого проводили інкубацію протягом 3 год при 37°C. Після інкубування клітин з МТТ видаляли середовище з лунок і розчиняли кристали формазану, який утворився в результаті метаболічного

перетворення МТТ у мітохондріях клітин, за допомогою ДМСО (150 мкл на лунку). Поглинання розчиненого формазану вимірювали за довжини хвилі 570 нм використовуючи прилад BioTek ELx800 (“BioTek Instruments, Inc.”, США). Для визначення відносного рівня проліферації клітин в залежності від часу інкубації, отримане значення оптичної густини для точок 24, 48 та 72 год ділили на показник оптичної густини для точки 0, відносно значення якого приймали за одиницю. Експеримент проводили у трьох незалежних повторах для кожної клітинної лінії.

2.21. Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу експериментальних даних використовували програми OriginPro 8 (“StatSoft Inc.”, США) та Excel (MS Office 2010) (“Microsoft Corporation”, США). Результати експериментів були представлені у вигляді середнього арифметичного \pm стандартне відхилення. Різницю між двома незалежними вибірками даних оцінювали за допомогою двовибіркового *t*-критерію Стьюдента, і вважали статистично значущою при $p < 0.05$, $p < 0.01$, та $p < 0.005$. Усі дані, які підлягали статистичному аналізу, були отримані в результаті щонайменше трьох незалежних експериментів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Визначення механізму експресії ізоформи р60-S6K1 у клітинах

3.1.1. Перевірка наявної гіпотези альтернативної трансляції ізоформи р60-S6K1 з використанням клітинної лінії НЕК-293. Літературні дані свідчать про те, що ген S6K1 кодує дві білкові ізоформи (р85-S6K1 та р70-S6K1), які синтезуються зі спільного, домінантного транскрипту шляхом використання альтернативних стартових кодонів (3). Ізоформа р85-S6K1 транслюється з першого стартового кодону (нуклеотиди 1-3 кодуючої послідовності), у той час як синтез р70-S6K1 відбувається з другого стартового кодону, що відповідає 70-72 нуклеотидам кодуючої послідовності (рис. 3.1). Між тим, було висунуто припущення, що третій стартовий кодон (нуклеотиди 160-162 кодуючої послідовності) у домінантному транскрипті може гіпотетично ініціювати трансляцію іншої S6K1 ізоформи, р60-S6K1, яка є вкороченою з N-кінця на 53 а.з. порівняно з р85-S6K1 (7). Однак авторами також було відзначено, що гіпотетична ізоформа р60-S6K1 може бути продуктом обмеженого протеолізу домінантних ізоформ р70- та р85-S6K1.

Таким чином, наше перше завдання полягало в тому, щоб з'ясувати чи є ізоформа р60-S6K1 продуктом трансляції з третього альтернативного стартового кодону, чи вона виникає в результаті протеолітичного розщеплення домінантних ізоформ р85- та р70-S6K1. На основі гіпотези альтернативної трансляції р60-S6K1 ми припустили, що порушення нуклеотидної послідовності ДНК між другим і третім стартовими кодонами в межах кодуючої послідовності гена за допомогою CRISPR/Cas9 системи може призвести до пригнічення експресії ізоформ р85- та р70-S6K1, таким чином даючи змогу клітинам експресувати виключно р60-S6K1 (рис. 3.2). Так само, якщо порушити послідовність гена S6K1 після третього стартового кодону в

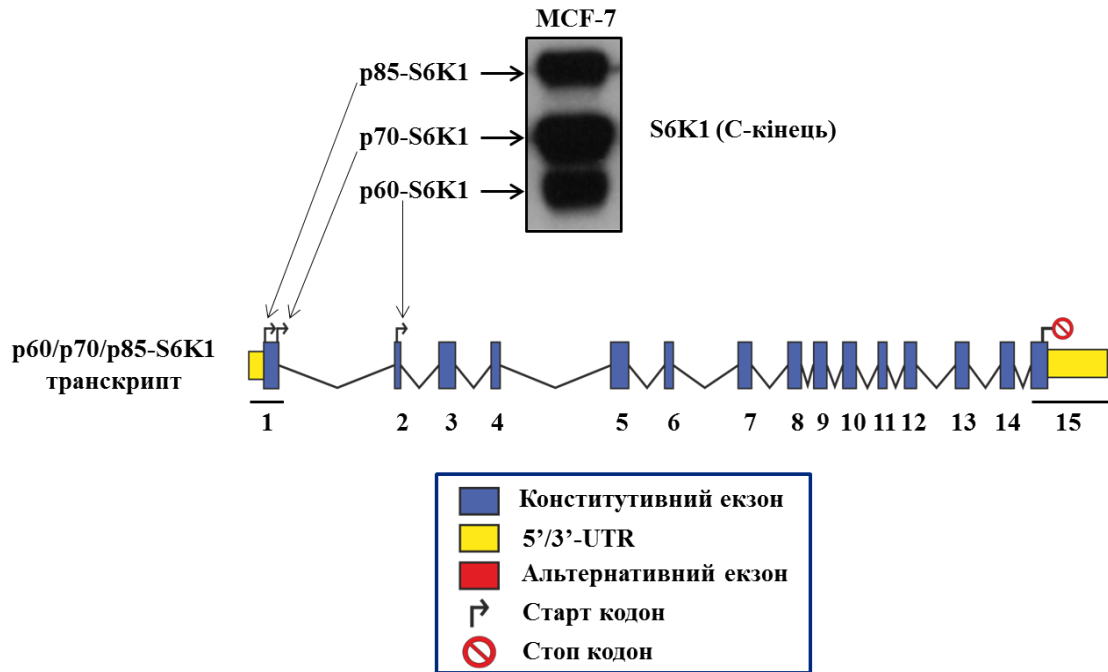


Рис. 3.1. Схема альтернативної трансляції ізоформ S6 кінрази 1, p60, p70 та p85, з домінантного транскрипту S6K1. Найдовша ізоформа p85-S6K1 (525 а.з.) транслюється з першого стартового кодону. Трансляція ізоформи p70-S6K1 (502 а.з.), яка є на 23 а.з. вкороченою з N-кінця у порівнянні з p85-S6K1, відбувається з другого послідовного стартового кодону. Перший та другий стартові кодони входять до складу екзону 1. З третього послідовного стартового кодону, який знаходиться у межах екзону 2, гіпотетично може відбуватися ініціація трансляції ізоформи p60-S6K1 (472 а.з.), яка буде вкорочена на 53 а.з. з N-кінця порівняно з p85-S6K1. За електрофоретичного розділення білків ізоформа p85-S6K1 мігрує на рівні 85 кДа, p70-S6K1 на рівні 70 кДа, p60-S6K1 – 60 кДа.

межах кодуючої послідовності, то можна отримати клітини з пригніченою експресією усіх трьох ізоформ (рис. 3.2). У якості модельної клітинної лінії були обрані клітини НЕК-293. Ці клітини є добре вивченими у контексті S6K1-залежного сигналювання і легко піддаються трансфекції екзогенною ДНК.

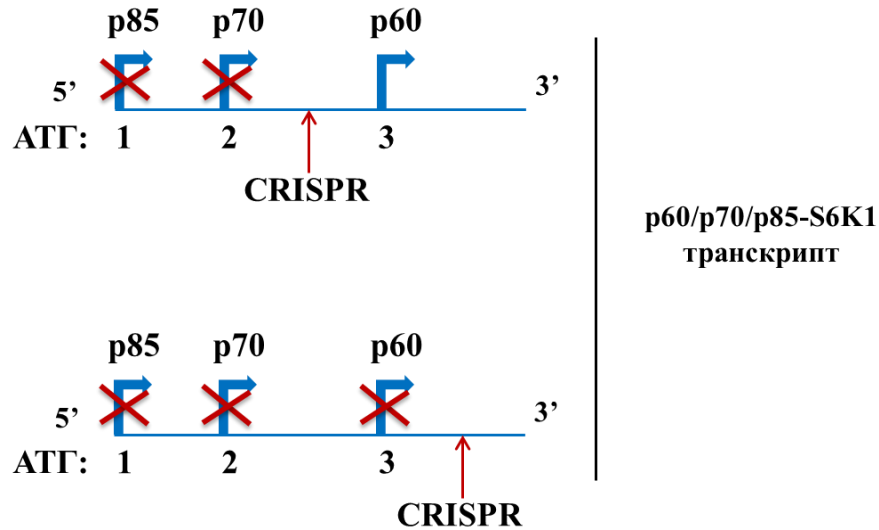


Рис. 3.2. Схематичне зображення 5'-кінця домінантного S6K1 транскрипту, який кодує ізоформи S6K1 – p70 та p85 і, можливо, p60, з позначенням альтернативних стартових кодонів і ділянок РНК, які були редаговані за допомогою технології CRISPR/Cas9 з метою вимкнення експресії або тільки p70- та p85-S6K1 (послідовність gRNA комплементарна ділянці кодуючої послідовності гена S6K1 між другим і третім стартовими кодонами), або всіх трьох ізоформ (послідовність gRNA комплементарна ділянці кодуючої послідовності гена S6K1 після третього стартового кодону).

Спочатку був проведений дизайн gRNA олігонуклеотидів довжиною 20 п.о. (опис дизайну даний у підрозділі 2.7): перша пара олігонуклеотидів відповідала 106-125 нуклеотидам кодуючої послідовності мРНК для вимкнення експресії p85- та p70-S6K1 ізоформ, оскільки другий стартовий кодон відповідає 70-72 нуклеотидам кодуючої послідовності; друга пара олігонуклеотидів відповідала 279-298 нуклеотидам для вимкнення експресії усіх трьох ізоформ, оскільки третій стартовий кодон відповідає нуклеотидам 160-162 кодуючої послідовності. ДНК вектор, який кодує ендонуклеазу Cas9 разом із вбудованими gRNA олігонуклеотидами, за допомогою трансфекції був уведений в клітини HEK-293. Після селекції індивідуальних клонів за допомогою антибіотика пуроміцина, отримані клони були проаналізовані з

використанням методів вестерн-блоту (рис. 3.3а та 3.3б) та імуофлуоресценції (додатки Б1.1 та Б1.2) за допомогою антитіл проти С-кінця S6K1. Дійсно, аналіз отриманих клонів за допомогою зазначених методів підтвердив, що таргетування послідовності S6K1 між другим і третім стартовими кодонами призводить до вимкнення експресії р85- та р70-S6K1 ізоформ, у той час як порушення послідовності нуклеотидів після третього стартового кодону призводить до пригнічення експресії усіх трьох ізоформ. Відповідні клони були відібрані для подальших досліджень.

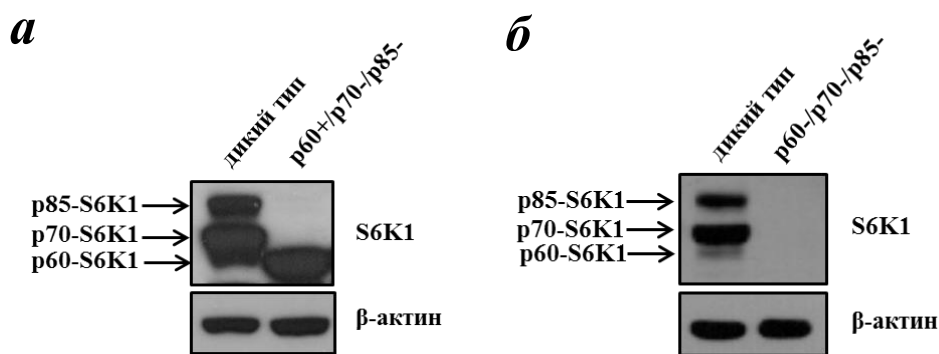


Рис. 3.3. Створення клітинних ліній HEK-293 із селективною експресією ізоформи р60-S6K1 (p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293) та з вимкненою експресією ізоформ S6K1 – р60, р70 та р85 (p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293). У досліджуваних клітинах проводили редагування гена S6K1 за допомогою системи CRISPR/Cas9 з використанням специфічних анти-p70/p85-gRNA та анти-p60/p70/p85-gRNA. *а* – вестерн-блот аналіз експресії ізоформ S6K1 в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293. *б* – вестерн-блот аналіз експресії ізоформ S6K1 в клітинах p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293. Антитіла проти β-актину використовували для контролю нанесення однакової кількості зразків.

Слід зауважити, що CRISPR/Cas9-опосередковане редагування гена S6K1 також призводило до появи мутантних клонів HEK-293, в яких спостерігалася експресія як додаткових поліпептидів, які впізнаються антитілами проти S6K1, так і не повне пригнічення експресії відповідних ізоформ. Такі спостереження пояснюються випадковою мутагенною дією процесу негомологічного з'єднання

кінців унаслідок CRISPR/Cas9-опосередкованих дволанцюгових розривів ДНК. Як наслідок, можливі різного розміру делеції або інсерції, які можуть приводити до трансляції або різного розміру поліпептидів (у випадку зсуву відкритої рамки зчитування), або мутантних ізоформ (у випадку збереження відкритої рамки зчитування).

Таким чином, отримані нами результати є першим експериментальним підтвердженням того, що ізоформа p60-S6K1 є продуктом саме трансляції мРНК, використовуючи третій послідовний стартовий кодон для ініціації трансляції ізоформи, а не виникає внаслідок протеолітичного розщеплення домінантних ізоформ p70/p85-S6K1.

3.1.2. Ідентифікація сплайсового варіанту S6 кінази 1, який кодує ізоформу p60-S6K1, у клітинах раку молочної залози MCF-7. У попередньому дослідженні нами було показано, що ізоформа p60-S6K1 підлягає трансляції внаслідок використання третього стартового кодону, а не є продуктом обмеженого протеолізу домінантних p85- та p70-S6K1 ізоформ. Проте, після проведення біоінформатичного аналізу бази даних NCBI Reference Sequence Database з метою пошуку специфічного для p60-S6K1 транскрипту, було знайдено окремий сплайсовий варіант S6K1 – S6K1 transcript variant 4 (NM_001272044.1, RefSeq, NCBI) [надалі використовується назва “транскрипт p60-S6K1”], який гіпотетично може транслювати ізоформу p60-S6K1. Нуклеотидна послідовність транскрипту NM_001272044.1 була отримана з результатів проекту NEDO, проекту по секвенуванню людських кДНК, які відповідають сплайсовим варіантам (AK297147.1, GenBank, NCBI) [неопубліковані дані]. Цей транскрипт містить інсерцію між екзонами 1 і 2 розміром 129 п.о. (екзон 1a), у межах якої розташований стоп-кодон (рис. 3.4). Останній знаходиться в межах відкритої рамки зчитування і тим самим має відбутися рання термінація трансляції ізоформ p85- та p70-S6K1. Однак, з цього транскрипту гіпотетично може транслюватися повнорозмірна ізоформа p60-S6K1, оскільки третій стартовий кодон розташований в межах екзону 2.

Незважаючи на дані NCBI Reference Sequence Database, автори роботи (7) відмовилися від гіпотези, що р60-S6K1 транслюється з окремого сплайсового варіанту, оскільки не змогли підтвердити наявність р60-S6K1-специфічного транскрипту в клітинах. Тим не менше, ідентичність транскрипту р60-S6K1 іншими за ДНК секвенування методами не була встановлена, не було підтверджено здатність цього транскрипту ініціювати трансляцію ізоформи р60-S6K1, а також не були визначені рівні експресії транскрипту в клітинах.

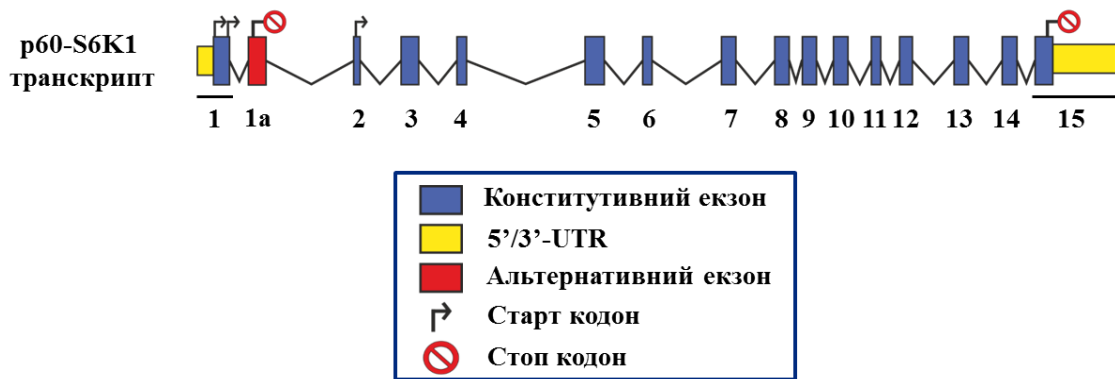
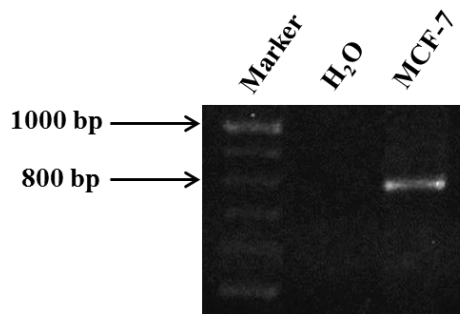
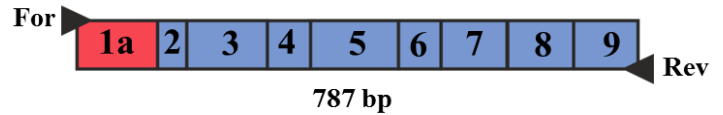


Рис. 3.4. Схематичне зображення сплайсового варіанту р60-S6K1, який відповідає за синтез ізоформи р60-S6K1. Транскрипт р60-S6K1 містить додатковий екзон (позначений як 1a), який відсутній у домінантного транскрипту р60/p70/p85-S6K1. У межах екзону 1a у відкритій рамці зчитування знаходиться стоп-кодон, який, у свою чергу, ініціює ранню термінацію трансляції ізоформ р70 та р80. Таким чином, можливою залишається лише ініціація трансляції тільки ізоформи р60 з наступного, третього, стартового кодону.

З метою ідентифікації транскрипта р60-S6K1 в клітинах ми використали метод ЗТ-ПЛР аналізу та клітини раку молочної залози MCF-7. Для ПЛР детекції один з праймерів був націлений на екзон 1a, у той час як інший праймер був комплементарний ділянці екзона 9. ЗТ-ПЛР аналіз підтвердив наявність експресії транскрипта р60-S6K1 (рис. 3.5a). Утворений ПЛР продукт був виділений з агарозного гелю з наступним ДНК секвенуванням. Результати

секвенування показали, що ДНК фрагмент, ампліфікований за допомогою ПЛР, відповідає нуклеотидній послідовності S6K1 transcript variant 4, яка була знайдена у базі даних NCBI Reference Sequence Database (рис. 3.5б).

a*б*

```

TTCTGTCGGGAGTAGCACTGCCGCTGCTGTTACAGCCACCAGGAG
TTTTATTTTCGGGAGCAAGGGGGCTCTGCTGCATCTTCCAATCTTC
CAGGGGTCAGTTAAATGAAAGCATGGACCATGGGGGAGTTGGACC
ATATGAACTTGGCATGGAACATTGTGAGAAATTTGAAATCTCAGA
AACTAGTGTGAACAGAGGGCCAGAAAAAATCAGACCAGAATGTTT
TGAGCTACTTCGGGTACTTGGTAAAGGGGGCTATGGAAAGTTTTT
TCAAGTACGAAAAGTAACAGGAGCAAATACTGGGAAAATATTTGC
CATGAAGGTGCTTAAAAAGGCAATGATAGTAAGAAATGCTAAAGA
TACAGCTCATACAAAAGCAGAACGGAAATATTTCTGGAGGAAGTAAA
GCATCCCTTCATCGTGGATTTAATTTATGCCTTTCAGACTGGTGG
AAAACSTACCTCATCCTTGAGTATCTCAGTGGAGGAGAACAATTT
TATGCAGTTAGAAAAGAGAGGGAATATTTATGGAAGACACTGCCTG
CTTTTACTTGGCAGAAATCTCCATGGCTTTGGGGCATTTACATCA
AAAGGGGATCATCTACAGAGACCTGAAGCCGGAGAATATCATGCT
TAATCACCAAGGTCATGTGAAACTAACAGACTTTGGACTATGCAA
AGAATCTATTCATGATGGAACAGTCACACACACATTTTGTGGAAC
AATAGAATACATGGCCCCTGAAATCTTGATGAGAAGTGGCCACAA
TCGTGCTGTGGATTGGTGGAGT

```

Рис. 3.5. Ідентифікація транскрипту нового сплайсового варіанту S6K1, який експресує ізоформу r60-S6K1, в клітинах лінії MCF-7. *a* – ПЛР детекція транскрипту r60-S6K1, який виділений з клітинної лінії MCF-7. Для ПЛР аналізу була використана пара праймерів, серед яких прямий є специфічним до ділянки екзону 1a, у той час як зворотній – до ділянки екзону 9. *б* – послідовність ПЛР фрагменту, визначена за допомогою ДНК секвенування. Праймери, які використовували для секвенування (послідовності позначені зеленим кольором), відповідали таким у пункті *a* і давали продукт розміром 787 п.о. Послідовність екзону 1a в межах секвенованого ПЛР амплікону позначена голубим кольором.

На наступному етапі роботи ми використали технологію РНК-інтерференції для підтвердження ідеї, що ідентифікований транскрипт відповідає за синтез ізоформи r60-S6K1. Для цього нами був проведений дизайн послідовності

shRNA, яка є комплементарною послідовності інсерції (екзон 1a), специфічної для транскрипту p60-S6K1. Олігонуклеотиди, які відповідають послідовності shRNA, були клоновані у ДНК векторі. Після цього проводили трансфекцію ДНК вектором клітин MCF-7 і отримували змішану стабільну клітинну лінію на основі селекції антибіотиком пуроміцином тих клітин, в геном яких вбудувався ДНК вектор. Вестерн-блот аналіз отриманої стабільної лінії виявив значне пригнічення експресії білка p60-S6K1 у порівнянні з контрольними клітинами дикого типу (рис. 3.6). Таким чином, нами було встановлено, що S6K1 transcript variant 4 ініціює трансляцію ізоформи p60-S6K1. Отримані результати також дають змогу припустити, що трансляція з альтернативно сплайсованого

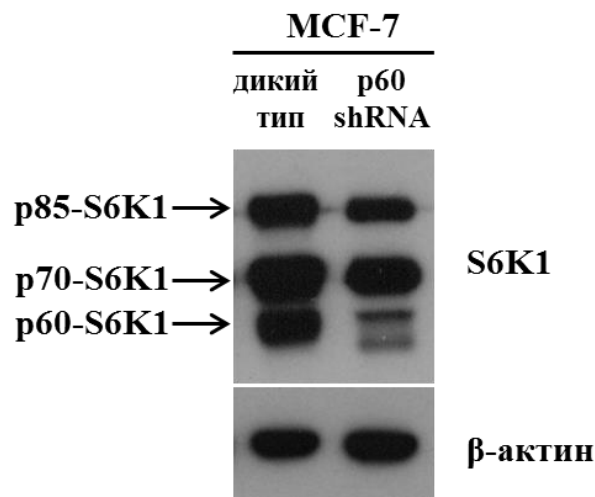


Рис. 3.6. Транскрипт p60-S6K1 відповідає за синтез ізоформи p60-S6K1. Послідовність shRNA, яка є комплементарною специфічній послідовності транскрипту p60-S6K1, було клоновано у ДНК векторі і введено в клітини MCF-7. Отримані клітини, які стабільно експресують p60-shRNA, були проаналізовані за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням антитіл проти С-кінця S6K1. Антитіла проти β-актину були використані для підтвердження нанесення однакової кількості тотального білка.

варіанту S6K1 може бути ключовим механізмом експресії ізоформи p60-S6K1 в клітинах MCF-7, оскільки shRNA, специфічна до p60-S6K1, майже повністю пригнічує експресію p60-S6K1. Натомість, трансляція ізоформи p60-S6K1 з домінантного транскрипту шляхом альтернативної трансляції в клітинній лінії MCF-7 також може бути одним із шляхів експресії p60-S6K1. Проте, вибір механізму експресії p60-S6K1 та його регуляція можуть залежати від типу клітини та/або фізіологічних умов.

Після встановлення ідентичності транскрипту p60-S6K1 та підтвердження здатності транскрипту транлювати ізоформу p60-S6K1 було досліджено його експресію у ряді клітинних ліній різного походження. На додаток, ми проаналізували експресію ізоформи p60-S6K1 у цих клітинах з метою порівняти рівні експресії мРНК та білка. Отримані дані демонструють гетерогенну експресію транскрипту та ізоформи p60-S6K1 в різних типах клітин (рис. 3.7a), оскільки рівні їх експресії варіюють в залежності від типу клітини. Більш того, не спостерігалось кореляції між рівнями експресії p60-S6K1 мРНК і домінантної S6K1 мРНК у досліджуваних клітинних лініях. Останнє спостереження означає, що ізоформа p60-S6K1 може відігравати роль у клітині відмінну від такої для p70/p85-S6K1 ізоформ. Несподівано, використання різних пар праймерів для детекції тотальної S6K1 мРНК давало різні профілі експресії. Тільки одна пара праймерів (екзон 1-15), яка опосередковує синтез повнорозмірної домінантної p60/p70/p85-S6K1 мРНК, давала змогу детектувати рівні експресії, що приблизно відповідали рівням експресії білка, хоча ефективність ПЛР була доволі низькою. Проте, питання, чому використання різних пар праймерів до S6K1 дає різні результати, потребує вирішення у майбутніх дослідженнях, оскільки це питання є дуже важливим для наступного кількісного аналізу експресії p60-S6K1 у патологічних тканинах.

Отримані результати також показали невідповідність профілів експресії транскрипту p60-S6K1 та відповідного білкового продукту в різних типах клітин (рис. 3.7). Така різниця в експресії могла би бути пояснена наявністю

двох альтернативних шляхів синтезу ізоформи р60-S6K1: з домінантного S6K1 та з р60-S6K1 транскриптів.

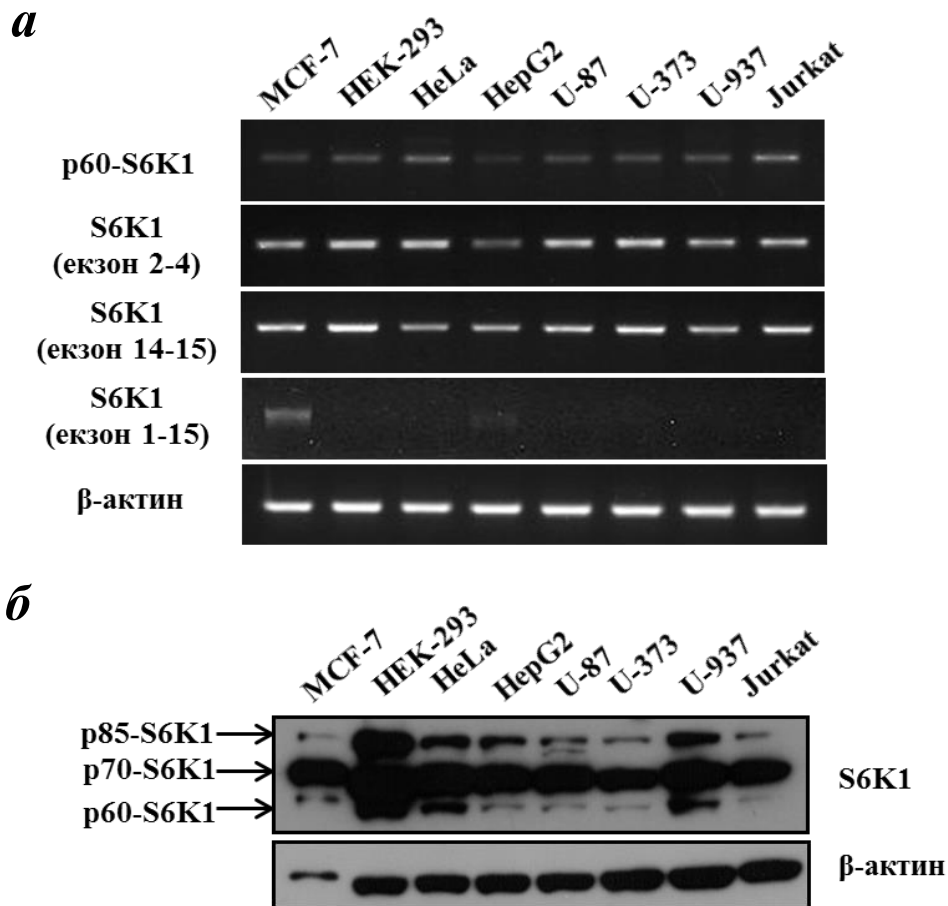


Рис. 3.7. Профілі експресії ізоформи р60-S6K1 на рівні мРНК та білка в панелі клітинних ліній різного походження. *а* – ЗТ-ПЛР аналіз експресії транскрипта р60-S6K1 в різних клітинних лініях (MCF-7, HEK-293, HeLa, HepG2, U-87, U-373, U-937, Jurkat). З усіх клітинних ліній виділяли тотальну РНК, синтезували кДНК і проводили ПЛР аналіз за допомогою праймерів, які є специфічними до р60-S6K1 (верхня панель), тотальної S6K1 (середні панелі) та β -актину (нижня панель). *б* – вестерн-блот аналіз експресії ізоформи р60-S6K1 у зазначених клітинних лініях. Детекцію білка проводили за допомогою антитіл проти С-кінцевої ділянки S6K1. Для підтвердження однакової кількості білка в різних пробах, використовували антитіла проти β -актину.

Отже, експресія ізоформи р60-S6K1 може відбуватися двома шляхами у клітині: 1) р60-S6K1 може бути синтезованою на основі домінантного

p60/p70/p85-S6K1 транскрипту шляхом використання альтернативного третього стартового кодону; 2) Ініціація трансляції p60-S6K1 може відбуватися з використанням окремого сплайсового варіанту p60-S6K1.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.
2. Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., **Zaiets, I. V.** p60-S6K1 mRNA transcript expression profile in a panel of cell lines and breast cancer tissue samples. Young scientists conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018”, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, May 23-25, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90(3), p. 115.
3. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V. (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
4. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 73.
5. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 23.

6. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Filonenko V. V. (2019). Identification of a novel S6K1 splice variant coding for the p60-S6K1 isoform. *Biopolymers and Cell*, 35(2), pp. 99-106.

3.2. Активність ізоформи p60-S6K1 та її регуляція в клітинах НЕК-293, які вибірково експресують p60-S6K1

3.2.1. Встановлення кіназної активності ізоформи p60-S6K1 у клітинах лінії p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293. Оскільки ізоформа p60-S6K1 містить у своєму складі кіназний домен, вона могла би виявляти каталітичну активність подібно до ізоформ p70/p85-S6K1. Проте, p60-S6K1 має вкорочений N-кінець, і, таким чином, не містить сайту зв'язування комплексу mTORC1, який фосфорилує S6K1 за одним із ключових для активності сайтів Thr389 (для p70-S6K1). Отже, це ставить під питання mTOR-залежне фосфорилування p60-S6K1 і, відповідно, активність даної ізоформи. Для того, щоб встановити чи є p60-S6K1 каталітично активною ізоформою, ми імунопреципітували p60-S6K1 з клітин p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293 і провели *in vitro* кіназну реакцію з використанням класичного S6K1 субстрату – rpS6. Загальний пул ізоформ S6K1, виділений з клітин НЕК-293 дикого типу, був використаний як позитивний контроль кіназної реакції. Результати експерименту показали, що імунопреципітована ізоформа p60-S6K1 фосфорилує rpS6 за Ser240/244 *in vitro*, однак кіназна активність досліджуваної ізоформи була значно нижчою за таку, яка спостерігалась при використанні загального пулу імунопреципітованих з клітин НЕК-293 дикого типу S6K1 ізоформ (рис. 3.8).

3.2.2. Стан фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами в клітинній лінії p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293 за різних умов росту клітин. Після того, як ми визначили кіназну активність p60-S6K1 ми зосередили свою увагу на дослідженні регуляції ізоформи шляхом фосфорилування за сайтами, які є критичними для кіназної активності ізоформ p70- та p85-S6K1. Мета завдання полягала у з'ясуванні питання чи підлягає ізоформа p60-S6K1 способу регуляції через фосфорилування подібному до такого для ізоформ p70- та p85-S6K1 у відповідь на позаклітинні стимули.

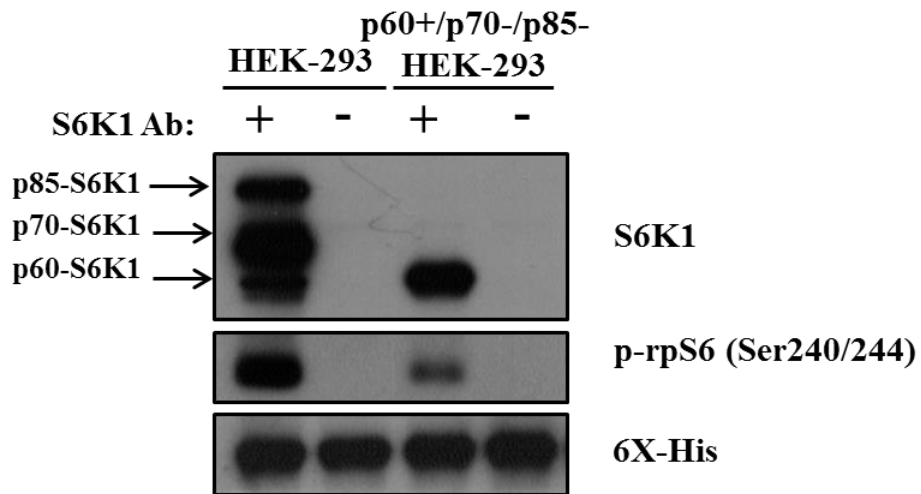


Рис. 3.8. p60-S6K1 є ізоформою S6 кінази 1, яка виявляє кіназну активність, як показано *in vitro* кіназною реакцією. Ізоформи S6K1 були імунопреципітовані з позначених клітин за допомогою поліклональних С-кінцевих антитіл. Кіназну активність імунопреципітатів було визначено з використанням 6X-His-rpS6 як субстрату. Аналіз кіназної реакції проводили за допомогою вестерн-блоту. S6K1 – S6 кіназа 1, rpS6 – рибосомний білок S6, His – гістидин.

Спочатку клітини p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293 та HEK-293 дикого типу піддавали голодуванню, після чого проводили стимуляцію сироваткою, яка містить необхідні ростові фактори, для посиленої активації mTORC1-залежного сигналювання в досліджуваних клітинах. Надалі, клітинні лізати аналізували методом вестерн-блот аналізу з використанням антитіл, які є специфічними до досліджуваних сайтів фосфорилування – Thr229, Ser371, Thr389 та Thr421/Ser424 для ізоформи p70-S6K1 і, відповідно, Thr199, Ser341, Thr359 та Thr391/Ser394 для ізоформи p60-S6K1.

Несподівано, аналіз фосфорилування р60-S6K1 за Т-петлевим та НМ сайтами з використанням вестерн-блоту не виявив фосфорилування за цими сайтами в клітинах р60⁺/р70⁻/р85-НЕК-293 за різних умов росту клітин (рис. 3.9). Такі результати припускають, що ізоформа р60-S6K1 може не підлягати Thr199 (Thr229 для р70-S6K1) та Thr359 (Thr389 для р70-S6K1) сайт-специфічному фосфорилуванню у досліджуваній клітинній лінії. Незважаючи на відсутність фосфорилування за Thr199 та Thr359, ізоформа р60-S6K1 була фосфорильована за Ser341 (Ser371 для р70-S6K1) (рис. 3.9).

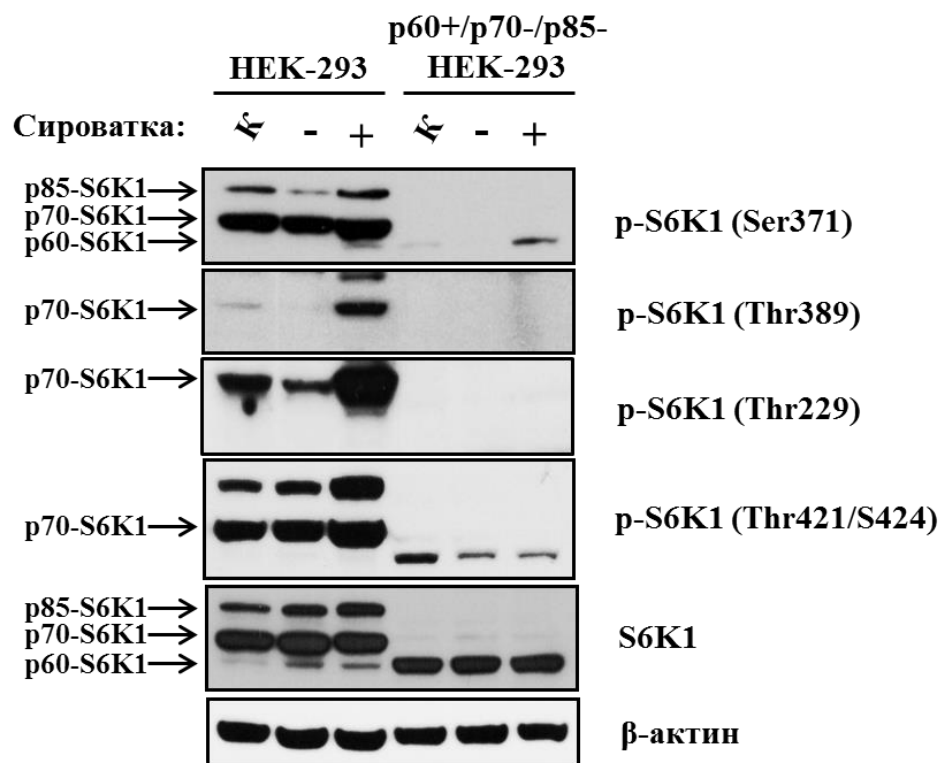


Рис. 3.9. Стан фосфорилування ізоформи р60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами у клітинній лінії НЕК-293. Клітини НЕК-293 дикого типу та р60⁺/р70⁻/р85-НЕК-293 підлягали голодуванню у культуральному середовищі без сироватки протягом 24 год. Після цього, клітини були стимульовані 20% сироваткою протягом 1 години. Клітинні лізати були проаналізовані за допомогою вестерн-блоту з використанням зазначених антитіл. У якості контролю нанесення був використаний β-актин. Усі зазначені сайти фосфорилування відповідають ізоформі р70-S6K1.

У цьому дослідженні нами також було вивчено стан фосфорилування p60-S6K1 за С-кінцевими сайтами Thr391 та Ser394 (Thr421/Ser424 для p70-S6K1). Хоча досліджувана ізоформа і фосфорилувалася за цими сайтами (рис. 3.9), проте, динаміка цього фосфорилування у часі при стимуляції клітин сироваткою відрізнялася від такої для p70/p85-S6K1 (додаток В).

3.2.3. Стан фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами в клітинній лінії MCF-7 за різних умов росту клітин. На відміну від отриманих нами даних, результати, які були отримані в (7), свідчать про наявність фосфорилування за Thr359 в ізоформи p60-S6K1 у клітинній лінії MCF-7. Таким чином, на наступному етапі роботи ми використали клітини MCF-7 для дослідження стану фосфорилування ізоформи p60-S6K1. Дійсно, як видно з результатів, у досліджуваних клітинах спостерігається високий ступінь фосфорилування p60-S6K1 за Thr359, а також за PDK1-регульованим сайтом Thr199 (рис. 3.10), що узгоджується з даними, представленими в (7). Також за представленими результатами спостерігається чутливість ізоформи p60-S6K1 до ростових сигналів, оскільки рівні фосфорилування за вказаними сайтами зменшуються у відповідь на голодування клітин і збільшуються при стимуляції ростовими факторами порівняно з рівнями фосфорилування за базальних умов.

На рис. 3.11 представлено схематичне порівняння стану фосфорилування ізоформи p60-S6K1 у клітинних лініях HEK-293 та MCF-7. Ізоформа p60-S6K1 є нечутливою до сигналів від ростових факторів і мітогенів, зокрема mTORC1-залежного сигналювання, у клітинній лінії HEK-293, оскільки не підлягає фосфорилуванню за PDK1- та mTORC1-залежними сайтами. Напроти, в клітинах MCF-7 спостерігається PDK1- та mTORC1-залежне фосфорилування ізоформи p60-S6K1, рівень якого змінюється відповідним чином за різних умов росту клітин.

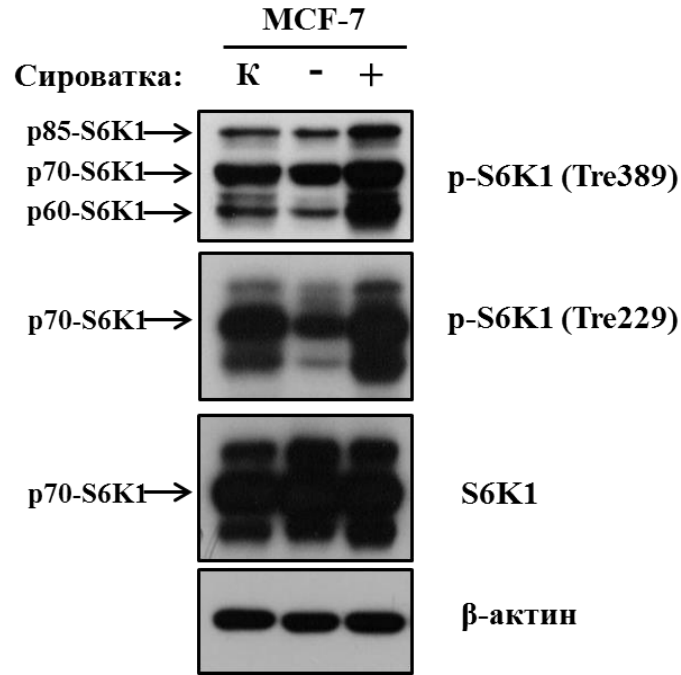


Рис. 3.10. Стан фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами у клітинах MCF-7. Експериментальні умови були ідентичними до описаних у рис. 3.7.

3.2.4. Особливості регуляції активності ізоформи p60-S6K1 через PI3K/mTORC1-залежний сигнальний каскад у клітинах p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293. Як відомо, активність p70/p85-S6K1 контролюється через PI3K/mTORC1 сигнальний шлях у відповідь на ростові фактори та мітогенні стимули. Внаслідок відсутності фосфорилування за Thr199 та Thr359 у p60-S6K1 в клітинній лінії p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293, нами було висунуто припущення, що регуляція активності цієї ізоформи відбувається незалежно від PI3K/mTORC1 сигналювання в клітинах НЕК-293. З метою дослідити залежність активності p60-S6K1 від стану активації PI3K/mTORC1 сигнального каскаду, ми провели обробку клітин mTOR-специфічним інгібітором рапаміцином. Спочатку, клітини p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293 росли у середовищі без сироватки з наступною обробкою рапаміцином і потім стимулювали сироваткою. Після цього, ізоформа p60-S6K1 була імунопреципітована з лізатів досліджуваних

клітин і її активність аналізували за допомогою *in vitro* кіназної реакції. Для кіназної реакції в якості субстрату був використаний рекомбінантний білок рpS6.

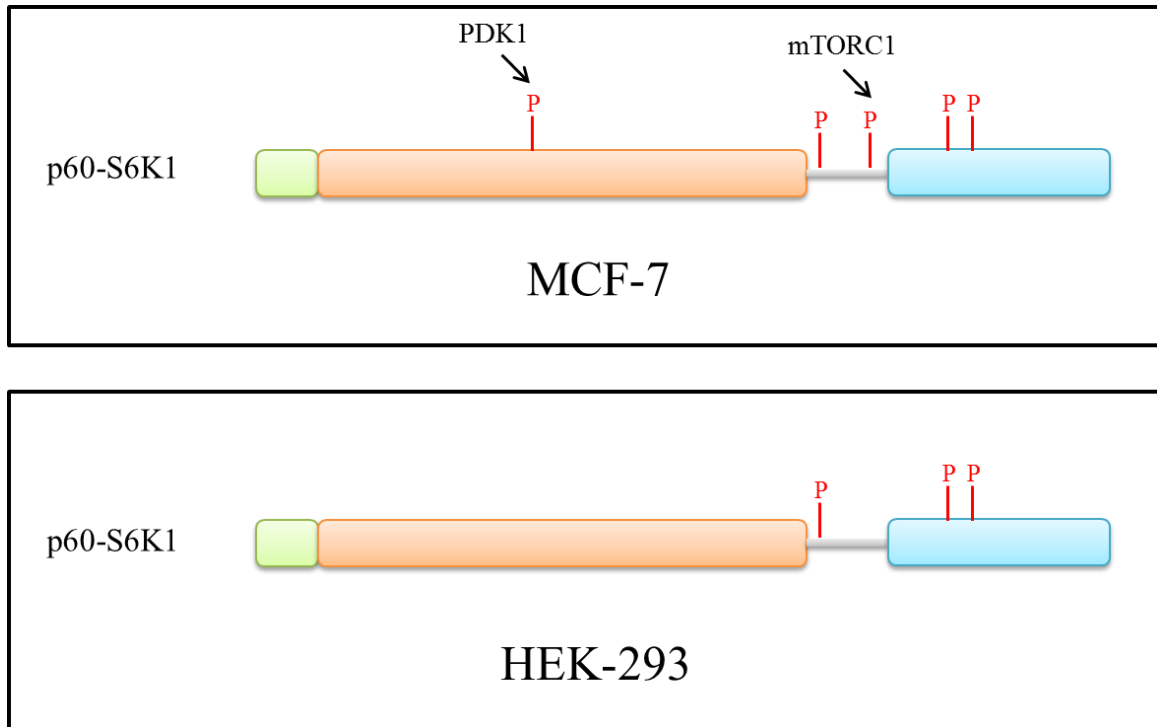
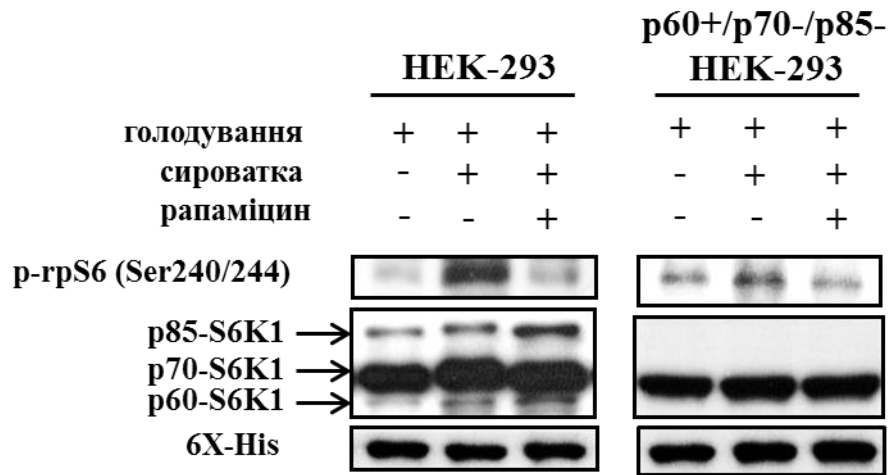


Рис. 3.11. Схематичне порівняння стану фосфорилювання ізоформи р60-S6K1 в клітинних лініях HEK-293 та MCF-7 у відповідь на сигнали від ростових факторів та мітогенів.

Отримані результати свідчать про те, що р60-S6K1 є нечутливою до рапаміцину та мітогенів кіназою, оскільки за умов інгібування активності mTORC1 рівень фосфорилювання білка рpS6 за Ser240/244 у кіназній реакції суттєво не відрізнявся від такого, який спостерігався при голодуванні, а також стимуляції PI3K/mTOR сигнального шляху ростовими факторами та мітогенами сироватки (рис. 3.12).



in vitro кіназна реакція

Рис. 3.12. Кіназна активність ізоформи p60-S6K1 в клітинах НЕК-293 не залежить від активності mTORC1. Вказані клітинні лінії вирощували в середовищі без сироватки протягом 24 год, інкубували у присутності 20 нМ рапаміцину і далі стимулювали 20% сироваткою протягом 1 години. Імунопреципітована S6K1 і 6X-His-rpS6 як субстрат були використані в *in vitro* кіназній реакції, аналіз якої був проведений за допомогою вестерн-блоту з використанням вказаних антитіл.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.
2. 1. Sivchenko, A. S., Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Phosphorylation state of mitogen-regulated sites in the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p60-S6K1, at different cell growth conditions. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*, 34(2), p. 152. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V.

- (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
3. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 73.
 4. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 23.
 5. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., Smialkovska, V. V., Filonenko, V. V. (2019). p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms. *Ukr Biochem J*, 91(4), pp. 17-25.

3.3. Функціональні особливості ізоформи p60-S6K1 у клітинах ліній HEK-293 та MCF-7

3.3.1. Роль ізоформи p60-S6K1 у функціонуванні клітин лінії HEK-293 у контексті PI3K/mTOR-регульованих клітинних процесів

3.3.1.1. Аналіз рівнів фосфорилювання факторів трансляції в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293. Одним з найбільш вивчених клітинних процесів, до регуляції якого залучена S6K1, є трансляція. Для дослідження активності S6K1-залежних факторів трансляції отримані клітинні лінії підлягали різним умовам росту, а саме голодуванню у середовищі без сироватки і стимуляції ростовими факторами, які містяться у сироватці. Оцінку рівня активності факторів трансляції проводили методом вестерн-блот аналізу з використанням фосфо-специфічних антитіл. Отримані результати показують, що в клітинах p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293 спостерігається дещо нижчий рівень фосфорилювання білка eIF4B за Ser422 у порівнянні з контрольними клітинами (рис. 3.13). Натомість, рівні фосфорилювання eEF-2K (Ser366) залишаються незмінними (рис. 3.13). У разі вимкнення експресії ізоформ p70 та p85 в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293 рівні фосфорилювання зазначених факторів були на однаковому рівні порівняно з контрольними клітинами. Також не було помічено різниці у стані фосфорилювання білка rpS6 за сайтами Ser235/236/240/244 між усіма досліджуваними клітинними лініями (рис. 3.13). Така розбіжність в результатах може пояснюватись використанням різних клітинних ліній та/або різних методів пригнічення експресії S6K1. Отже, згідно з даними нашого дослідження, CRISPR/Cas9-опосередковане пригнічення експресії ізоформ S6K1 не призводить до суттєвих змін у рівнях фосфорилювання, а отже і активності, факторів трансляції як у клітинах p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293, так і в p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293. Відсутність значних змін у рівнях фосфорилювання субстратів у досліджуваних клітинах можна пояснити компенсаторним ефектом зі сторони кіназ RSK та S6K2, які також залучені до регуляції досліджуваних субстратів шляхом фосфорилювання.

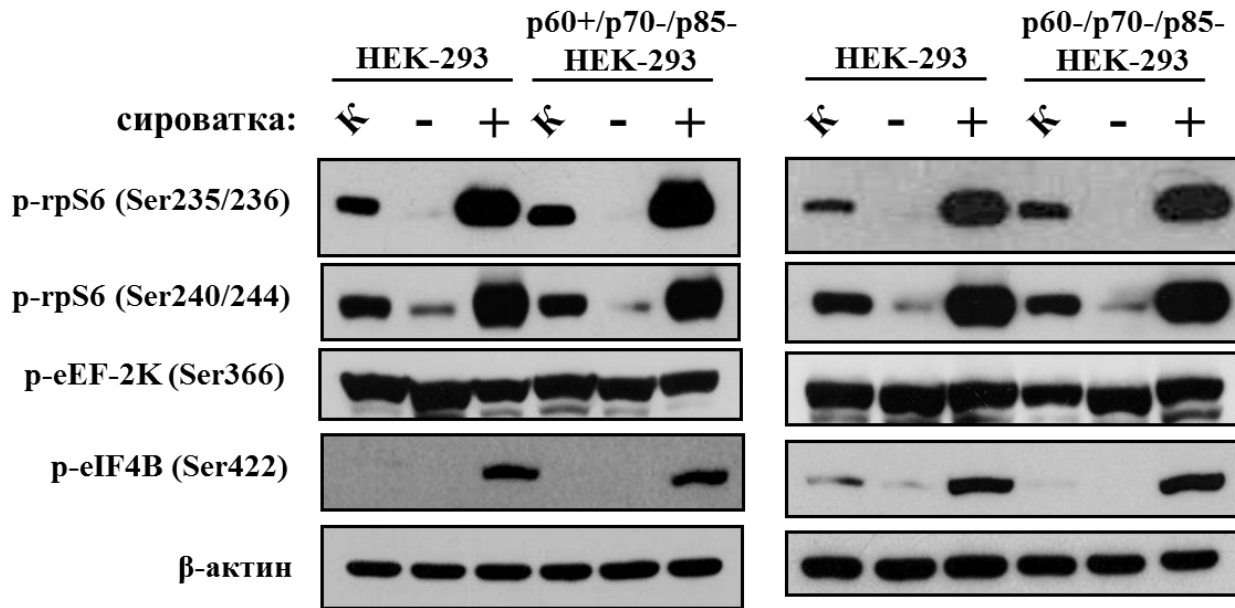


Рис. 3.13. Стан фосфорилювання факторів трансляції в клітинах p60⁺/p70/p85-НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85-НЕК-293 за різних умов росту клітин. Досліджувані клітинні лінії підлягали голодуванню протягом 24 год з наступною стимуляцією 20% сироваткою протягом 1 години. Після цього проводили вестерн-блот аналіз використовуючи зазначені антитіла. Для підтвердження нанесення однакової кількості тотального білка були використані антитіла, які є специфічними до β-актину. rpS6, ribosomal protein S6; eEF-2K, eukaryotic elongation factor 2 kinase; eIF4B, eukaryotic initiation factor 4B.

3.3.1.2. Дослідження рівнів проліферації клітинних ліній p60⁺/p70⁻/p85⁻ НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻ НЕК-293. Оскільки S6K1 стимулює анаболічні процеси, зокрема синтез білків та ліпідів, здатність клітин рости і проліферувати також залежить від активності S6K1. Крім того, як було показано, у деяких випадках S6K1 здатна сприяти клітинній проліферації незалежно від регуляції клітинного росту (54, 181). Для оцінки внеску ізоформи p60-S6K1 у модуляцію клітинної проліферації ми порівняли, використовуючи МТТ тест, рівень проліферації клітин p60⁺/p70⁻/p85⁻ НЕК-293 з таким для p60⁻

/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та клітин дикого типу (рис. 3.14). Згідно отриманих даних блокування експресії усіх трьох ізоформ призводило до значного зниження швидкості проліферації клітин. Наші результати підкреслюють роль S6K1 у регуляції клітинного росту і проліферації, що узгоджується з даними, отриманими іншими дослідниками (54, 160, 181). У той самий час клітини p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 хоч і проліферували повільніше за дикий тип, проте, інгібуючий ефект блокування експресії p70 та p85 був слабший ніж у випадку вимкнення експресії усіх трьох ізоформ. Ймовірно, що експресія p60-S6K1 частково відновлює здатність клітин НЕК-293 до проліферації.

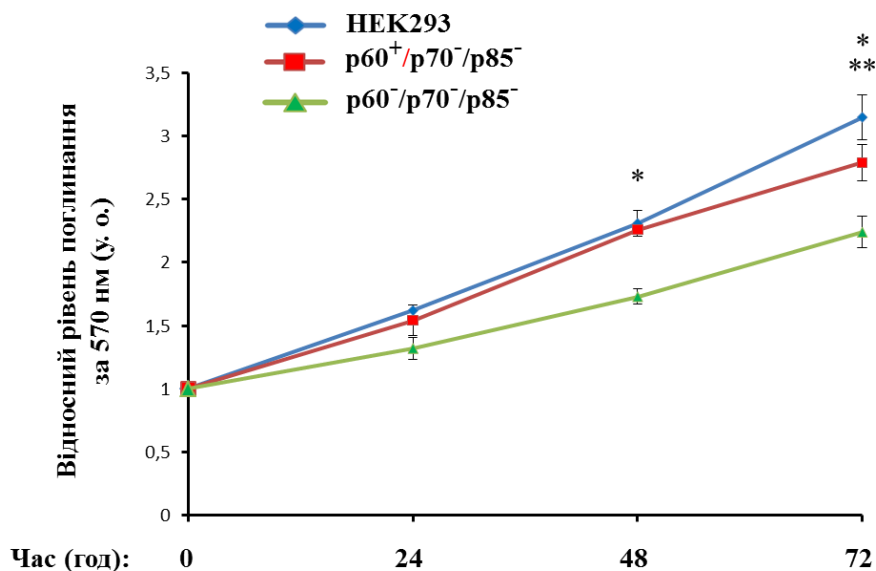


Рис. 3.14. Клітини НЕК-293, які вибірково експресують ізоформу p60-S6K1, показують частково відновлену здатність до проліферації порівняно з p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293. Швидкість проліферації клітинних ліній НЕК-293, p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 визначали за допомогою МТТ тесту. Дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення з трьох незалежних експериментів. * $p < 0.005$, p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 проти НЕК-293 і p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 проти p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293, ** $p < 0.05$, p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 проти НЕК-293.

3.3.1.3. Визначення здатності клітин p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 до міграції. У низці досліджень було продемонстровано здатність S6K1 регулювати актиновий цитоскелет і швидкість клітинної міграції (48, 189). Для визначення швидкості міграції досліджуваних клітин p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 ми використали метод “раневої поверхні”. У нашому дослідженні пригнічення експресії усіх ізоформ призводило також і до зниження швидкості міграції клітин (рис. 3.15), що підтримує ідею про принаймні часткову участь S6K1 у контролі руху клітин.

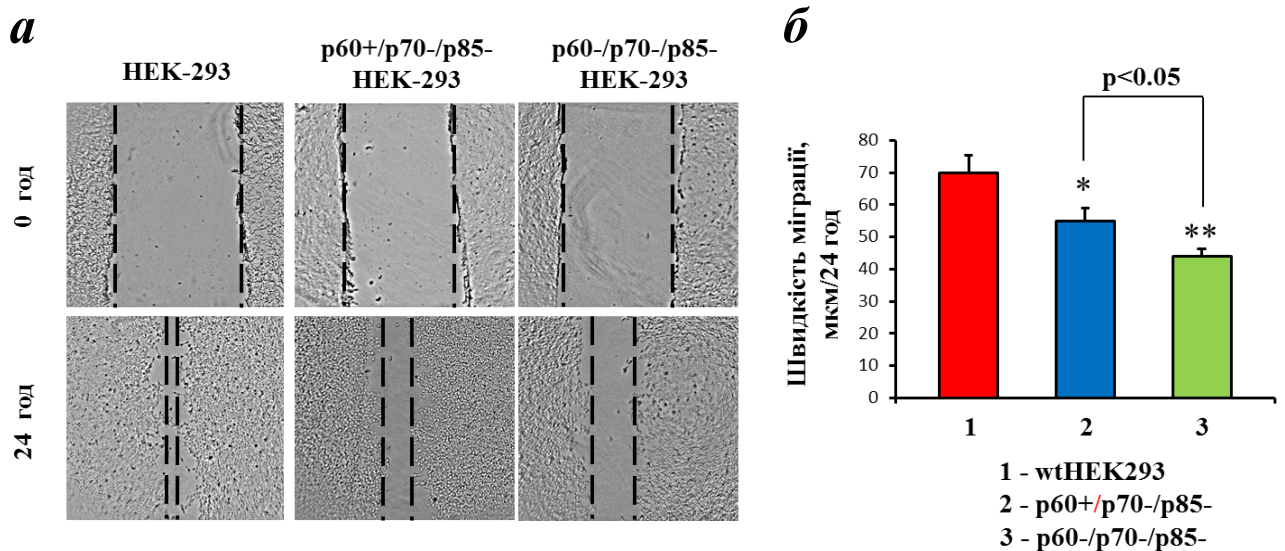


Рис. 3.15. Аналіз клітинної міграції за допомогою методу “раневої поверхні” виявляє часткове відновлення швидкості міграції клітин p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 у порівнянні з клітинами p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293. Конфлюентним клітинам НЕК-293, p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 робили “подряпину” і фотографували одразу після проведення подряпини та через 24 год. *а* – представлені репрезентативні зображення закриття реневої поверхні з трьох незалежних експериментів. *б* – кількісне порівняння швидкостей міграції досліджуваних клітин. Стовбці є середнім значенням ± стандартне відхилення для трьох незалежних експериментів. * (p < 0.05), ** (p < 0.01) проти НЕК-293.

У свою чергу, експресія p60 в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 приводила до підвищеної міграції у порівнянні з p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293, але зниженої порівняно з клітинами дикого типу (рис. 3.15). Останнє спостереження вказує на можливу роль ізоформи p60 у регуляції клітинного руху.

Одним із класичних сигнальних каскадів, через які здійснюється контроль клітинної проліферації та міграції, є PI3K/Akt-залежний сигнальний шлях. Нами було досліджено стан активації ключового компонента даного сигнального шляху в створених клітинах НЕК-293 за допомогою фосфо-специфічних антитіл, а саме кінази Akt (за сайтом Ser473). Вказаний сайт фосфорилування є критичним для каталітичної активності кінази. Усі клітини культивували за різних умов: спочатку стандартних умов росту (10% сироватка), потім клітини піддавали голодуванню (культивували у середовищі без сироватки) і, нарешті, стимуляції 20% сироваткою.

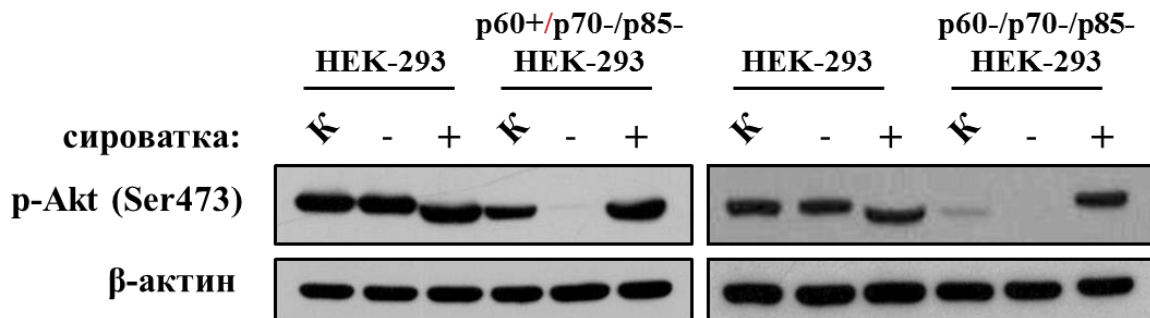


Рис. 3.16. Рівні фосфорилування кінази Akt за Ser473 в створених клітинних лініях p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 за різних умов росту клітин. Усі досліджувані клітини росли в середовищі без сироватки протягом 24 год і потім рестимулювали 20% сироваткою протягом 1 години. Клітинні лізати аналізували за допомогою вестерн-блоту з використанням антитіл проти фосфо-Ser473. Антитіла проти β-актину були використані для підтвердження нанесення однакової кількості тотального білка.

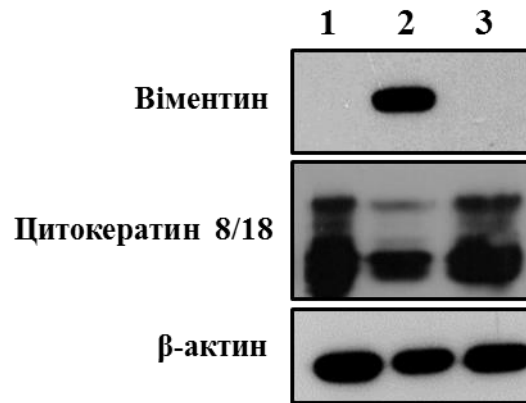
За результатами експерименту, клітини $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ НЕК-293 показали значно знижений рівень фосфорилування кінази Akt за Ser473 у порівнянні з контрольними клітинами НЕК-293. У випадку клітин $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ НЕК-293, як свідчать отримані дані, також спостерігається знижений рівень Ser473 фосфорилування, однак тільки за умов голодування (рис. 3.16). Натомість, клітини $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ НЕК-293 мають пригнічене Akt фосфорилування не тільки за умов голодування, а також і за стандартних умов росту клітин (рис. 3.16). Отримані результати дають змогу пов'язати зміни в швидкості клітинної проліферації та міграції зі змінами в активності Akt, регуляція якої може частково здійснюватися ізоформою $p60$.

3.3.2. Вплив селективної експресії $p60$ -S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах НЕК-293 та MCF-7

3.3.2.1. Аналіз експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в отриманих клітинах НЕК-293 та MCF-7, які селективно експресують $p60$ -S6K1. Подібно до клітин НЕК-293, у нашому відділі було проведено CRISPR/Cas9-опосередковане редагування гена S6K1 також і в клітинній лінії раку молочної залози MCF-7 з метою отримати клітини, які вибірково експресують ізоформу $p60$ -S6K1 ($p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ MCF-7). Також було отримано модельну клітинну лінію $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ MCF-7. Надалі, було досліджено потенціал клітин $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ MCF-7 до міграції та проліферації. Отримані експериментальні дані свідчать про значне підвищення швидкості міграції досліджуваних клітин у порівнянні з клітинами дикого типу. Морфологічний аналіз отриманих клітин $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ MCF-7 виявив, що клітини з вибірковою експресією ізоформи $p60$, на відміну від клітин дикого типу, характеризуються фібробластоподібною, видовженою формою і не здатні формувати щільні кластери клітин. Така морфологія клітин, за якої вони мають видовжену форму та ростуть у культурі дифузно без формування клітинних кластерів є характерною для клітин з мезенхімальноподібним фенотипом.

Для високо агресивних пухлин характерна підвищена здатність до міграції та інвазії навколишніх тканин з наступним метастазуванням у віддалені сайти організму, що супроводжується процесом епітеліально-мезенхімального переходу.

Оскільки в отриманих MCF-7 клітинах з вибірковою експресією p60 ізоформи спостерігається значне посилення швидкості клітинної міграції на відміну від клітин дикого типу і ці клітини мають фібробластоподібну форму, було зроблено припущення, що вибіркова експресія ізоформи p60-S6K1 може приводити до індукції епітеліально-мезенхімального переходу.



1 - MCF-7 (дикий тип)
 2 - p60⁺/p70⁻/p85-MCF-7
 3 - p60⁻/p70⁻/p85-MCF-7

Рис. 3.17. Вестерн-блот аналіз експресії віментину в клітинних лініях p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 у порівнянні з контрольною клітинною лінією MCF-7. Антитіла проти цитокератинів 8 та 18 були використані як додатковий контроль епітеліального фенотипу клітин MCF-7. Експресія β-актину слугувала в якості контролю нанесення однакової кількості тотального білка.

Одним із маркерів клітин мезенхімального походження або клітин, які зазнали епітеліально-мезенхімального переходу є експресія білка проміжних філаментів цитоскелету віментину. В епітеліальних клітинах, навпаки, експресія цього білка є відсутньою. Отже, для встановлення фенотипу досліджуваних клітин був проведений аналіз експресії віментину за допомогою методів імуноблотингу та імунофлуоресценції. Визначення рівнів експресії цими методами показало присутність експресії віментину в клітинах з вибірковою експресією p60 ізоформи, на відміну від інших досліджуваних клітин (рис. 3.17 та 3.18).

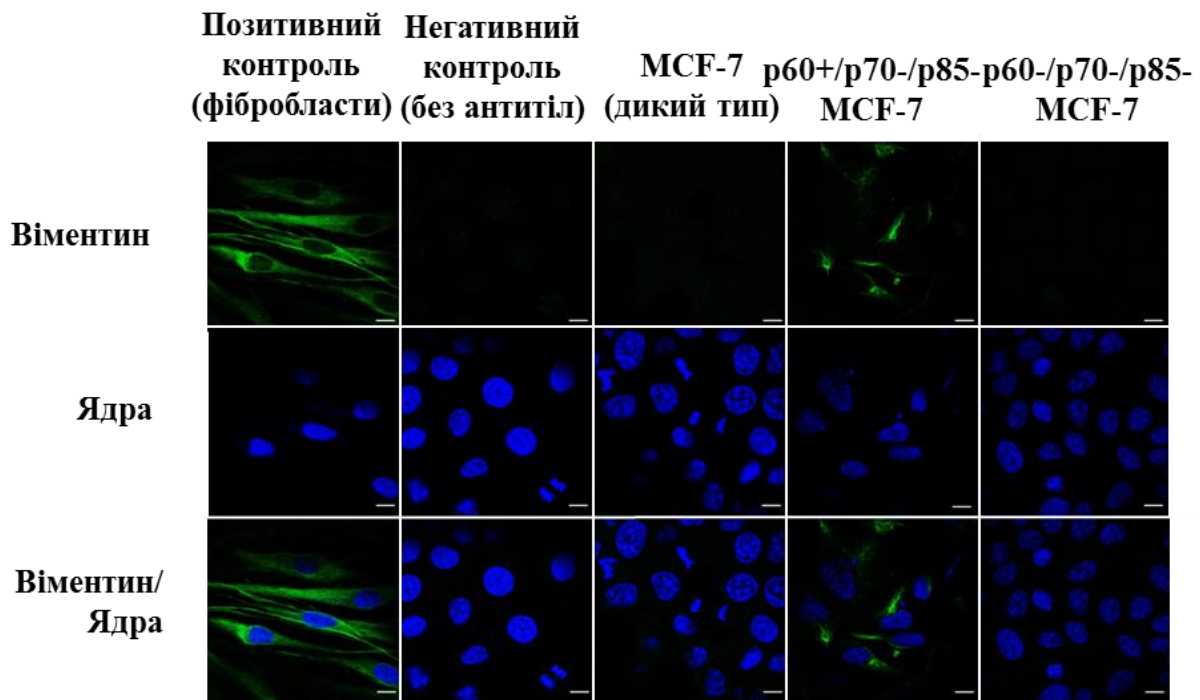


Рис. 3.18. Імунофлуоресцентний аналіз експресії віментину в клітинах MCF-7 після редагування гена S6K1 системою CRISPR/Cas9 у порівнянні з контрольними клітинами MCF-7 дикого типу. Детекцію віментину проводили за допомогою специфічних моноклональних антитіл (зелений). ДНК клітин фарбували барвником Hoechst 33342 (синій). Фібробласти були використані як позитивний контроль експресії віментину. Масштаб – 20 мкм.

У випадку вестерн-блот аналізу детекція експресії цитокератинів 8 та 18 була використана як позитивний контроль епітеліальноподібного фенотипу клітини, оскільки експресія даних цитокератинів є маркером епітеліальних клітин. Як видно з наведених результатів рівень експресії цитокератинів знижувався у клітинах з вибірковою експресією р60, на додаток до появи експресії віментину (рис. 3.17 та 3.18).

Далі була проведена кількісна полімеразно-ланцюгова реакція для оцінки експресії як віментину, так й інших маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу, зокрема Е- та N-кадгеринів. Як відомо, епітеліальні клітини експресують Е-кадгерин і водночас спостерігається відсутність експресії N-кадгерину, у той час як у мезенхімальних клітин спостерігається зворотня експресія цих маркерів. У нашому дослідженні результати аналізу експресії цих маркерів показують, що клітини з вибірковою експресією р60 виявляють мезенхімальний фенотип (рис. 3.19а). У цій клітинній лінії спостерігається експресія N-кадгерину та віментину на фоні пригніченої експресії Е-кадгерину. В клітинах дикого типу та клітинах з вимкненням усіх ізоформ відбувається експресія Е-кадгерину за відсутності експресії як N-кадгерину, так і віментину, що вказує на епітеліальний фенотип цих клітинних ліній.

Також був проведений кількісний ПЛР аналіз досліджуваних маркерних генів для створених клітин НЕК-293 (рис. 3.19б). Проте, у даному випадку спостерігалися приблизно однакові рівні експресії маркерів у всіх досліджуваних клітинних лініях: пригнічена експресія Е-кадгерину і підвищена експресія N-кадгерину та віментину. Слід зауважити, що за представленими результатами клітини НЕК-293 дикого типу виявляють ознаки мезенхімальноподібного фенотипу, і дане спостереження може бути поясненням відсутності впливу селективної експресії р60 ізоформи на фенотип цих клітин.

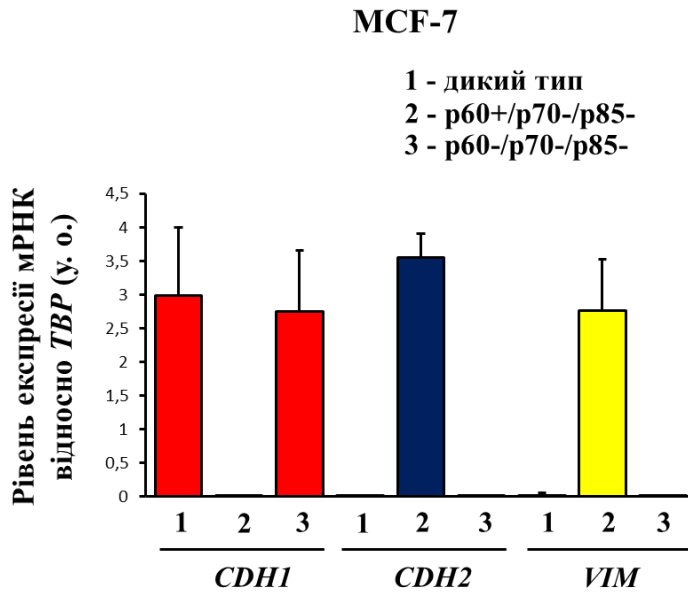
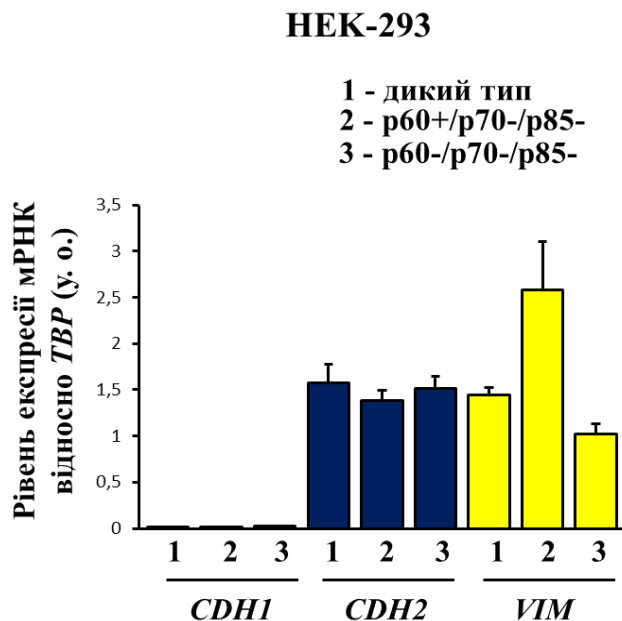
a**б**

Рис. 3.19. Кількісний ПЛР аналіз рівнів експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в клітинних лініях MCF-7 (*a*) та HEK-293 (*б*). В якості референтного гена був використаний *TBP*, відносно якого проводився розрахунок експресії цільових генів. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували ΔC^t метод розрахунку. *CDH1* – E-кадгерин; *CDH2* – N-кадгерин; *VIM* – віментин.

Наступним кроком було визначення рівнів експресії генів транскрипційних факторів, які залучені до ініціації епітеліально-мезенхімального переходу, зокрема *SNAIL1*, *TWIST1* та *ZEB2*. Оскільки клітини HEK-293 характеризуються мезенхімальноподібним фенотипом, аналіз експресії генів транскрипційних факторів проводили тільки для клітин MCF-7. Кількісний ПЛР аналіз експресії цих генів показав підвищену експресію генів *TWIST1* та *ZEB2*, але не *SNAIL1*, у клітинах MCF-7 з вибірковою експресією p60 (рис. 3.20). Проте, як відомо, участь білка *SNAIL1* в ініціації епітеліально-мезенхімального переходу додатково регулюється через стабільність цього білка, яка посилюється стимуляцією, наприклад, Wnt сигнального шляху.

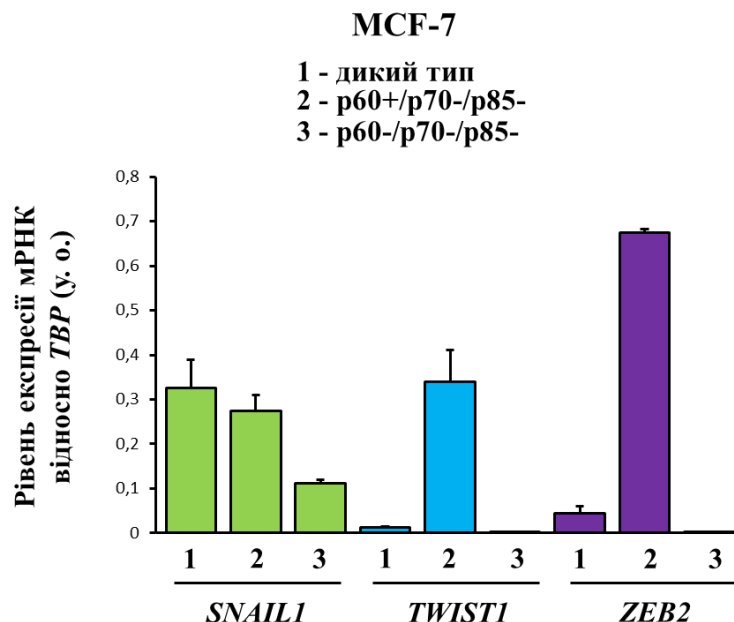


Рис. 3.20. Визначення рівнів експресії генів транскрипційних факторів, які залучені до ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу, в створених клітинних лініях p60⁺/p70⁻/p85⁻-MCF-7 та p60⁻/p70⁻/p85⁻-MCF-7 у порівнянні з MCF-7 дикого типу. Експресію генів визначали за допомогою кількісного ПЛР аналізу. Розрахунок експресії генів проводили відносно гена *TBP*. Відносну експресію генів вимірювали за допомогою ΔC^t метода розрахунку. *SNAIL1* – *SNAIL1* (zinc finger protein *SNAIL1*); *TWIST1* – *TWIST1* (twist-related protein 1); *ZEB2* – *ZEB2* (zinc finger E-box-binding homeobox 2).

Отже, в клітинах MCF-7, які селективно експресують ізоформу p60, спостерігається позитивна регуляція експресії маркерів мезенхімальноподібного фенотипу клітини і пригнічення експресії маркерів епітеліального фенотипу.

3.3.2.2. Вплив селективного вимкнення ізоформи p85-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинній лінії MCF-7. Було визначено, що в клітинах MCF-7 відбувається епітеліально-мезенхімальний перехід за умов вимкнення експресії ізоформ p70- та p85-S6K1 і збереження експресії p60-S6K1. Можливо, що домінантні ізоформи p70 та p85 через петлю негативного зворотнього зв'язку здійснюють інгібуючий вплив на активність ізоформи p60-S6K1. Однак, такий негативний вплив може здійснюватись як обома ізоформами, так і окремою з них. Для вирішення цього питання нами було додатково створено клітинну лінію MCF-7, в якій є вимкненою експресія p85-S6K1 (p60⁺/p70⁺/p85⁻MCF-7), і визначено в цих клітинах рівні експресії основних маркерів епітеліально-мезенхімального переходу. Як вже було зазначено, ізоформи p85 та p70 S6 кінази 1 синтезуються на основі єдиного транскрипту з використанням альтернативних стартових кодонів під час ініціації трансляції (першого для p85-S6K1 та другого для p70-S6K1). Дизайн gRNA був проведений таким чином, щоб вона зв'язувалася з ділянкою гена S6K1, яка знаходиться між двома стартами трансляції, і призводила у кінцевому рахунку до руйнування p85-специфічної послідовності (рис. 3.21).

В результаті за допомогою технології редагування геному CRISPR/Cas9 вдалося отримати три клони з повною відсутністю експресії ізоформи p85-S6K1, що було підтверджено вестерн-блот аналізом з використанням антитіл, специфічних до С-кінця S6K1 (який однаковий в обох ізоформ) та N-кінця p85-S6K1. Результати аналізу представлені на рис 3.22. Для подальших досліджень було обрано клон 2, оскільки саме в цих клітинах не спостерігається значного зниження рівнів експресії ізоформ p70- та p85-S6K1.

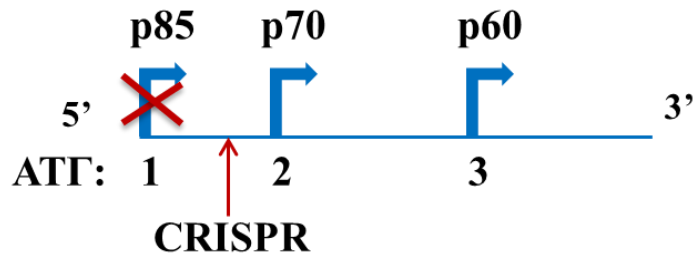


Рис. 3.21. Схематичне зображення 5'-кінця домінантного S6K1 транскрипту, з позначенням ділянки РНК, яка була редагована системою CRISPR/Cas9 з метою вимкнення експресії ізоформи p85-S6K1. Цифрами позначено альтернативні стартові кодони, з яких починається експресія зазначених на схемі ізоформ S6K1.

Додатково, експресія p85-S6K1 була оцінена за допомогою імунофлуоресцентного фарбування досліджуваних клітин антитілами проти N-кінцевого подовження вказаної ізоформи. Як видно з рис. 3.23, дані імунофлуоресцентного аналізу також підтверджують втрату експресії p85-S6K1 мутованими клітинами MCF-7, що узгоджується з результатами вестерн-блот аналізу.

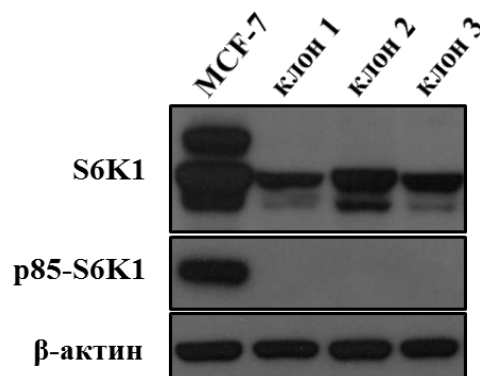


Рис. 3.22. Вестерн-блот аналіз отриманих клонів клітин MCF-7, які були редаговані за допомогою системи CRISPR/Cas9 для вимкнення експресії ізоформи p85-S6K1. Для аналізу були використані антитіла проти C-кінцевої ділянки S6K1, а також проти N-кінцевого подовження, яке є характерним для p85-S6K1. Антитіла, специфічні до β-актину, були використані для підтвердження нанесення однакової кількості тотального білка.

Після селекції відповідного клону клітин $p60^{+}/p70^{+}/p85$ -MCF-7, був проведений аналіз експресії генів, які є маркерами епітеліально-мезенхімального переходу, в досліджуваних клітинах за допомогою кількісної ПЛР (рис. 3.24). Результати аналізу показали, що рівні експресії E-кадгерину як у контрольних клітинах, так і в досліджуваних $p60^{+}/p70^{+}/p85$ -MCF-7 клітинах, є однаковими. При цьому, в обох клітинних лініях спостерігається негативна регуляція маркерних генів мезенхімального фенотипу клітини – N-кадгерину та віментину. Отже, згідно отриманих даних, пригнічення експресії ізоформи $p85$ -S6K1 не здатне ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід.

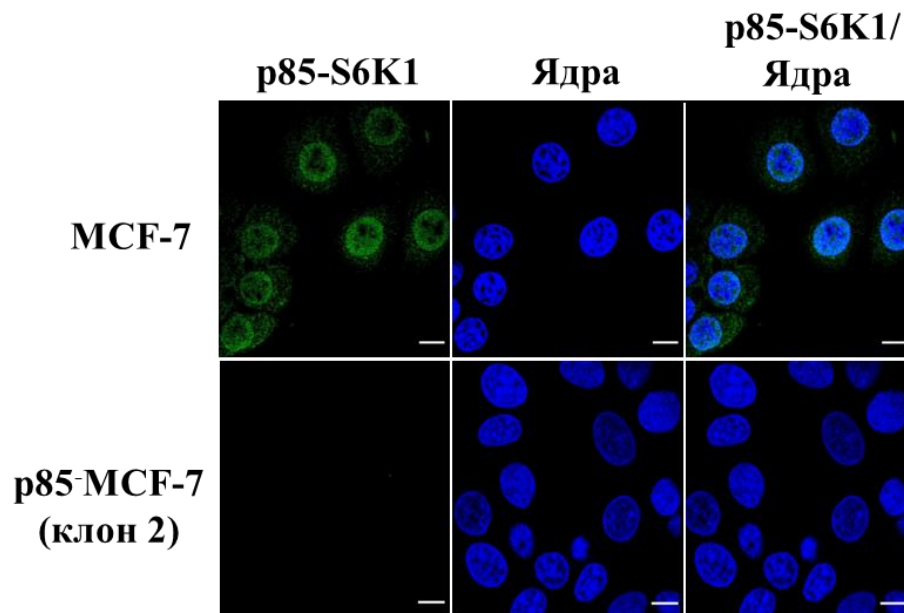


Рис. 3.23. Імунофлуоресцентний аналіз експресії ізоформи $p85$ -S6K1 в клітинах $p60^{+}/p70^{+}/p85$ -MCF-7 та MCF-7 дикого типу. Для виявлення експресії $p85$ -S6K1 використали антитіла, які є специфічними до N-кінця $p85$ -S6K1. ДНК клітин було пофарбоване барвником Hoechst 33342 (синій). Масштаб – 20 мкм.

Таким чином, ключову роль в ініціації процесу епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах $p60^{+}/p70^{+}/p85$ -MCF-7 ймовірно відіграє співвідношення експресії ізоформ $p60$ - та $p70$ -S6K1. При цьому $p70$ -S6K1

ймовірно виконує роль негативного регулятора функції p60-S6K1, яка полягає в ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах MCF-7.

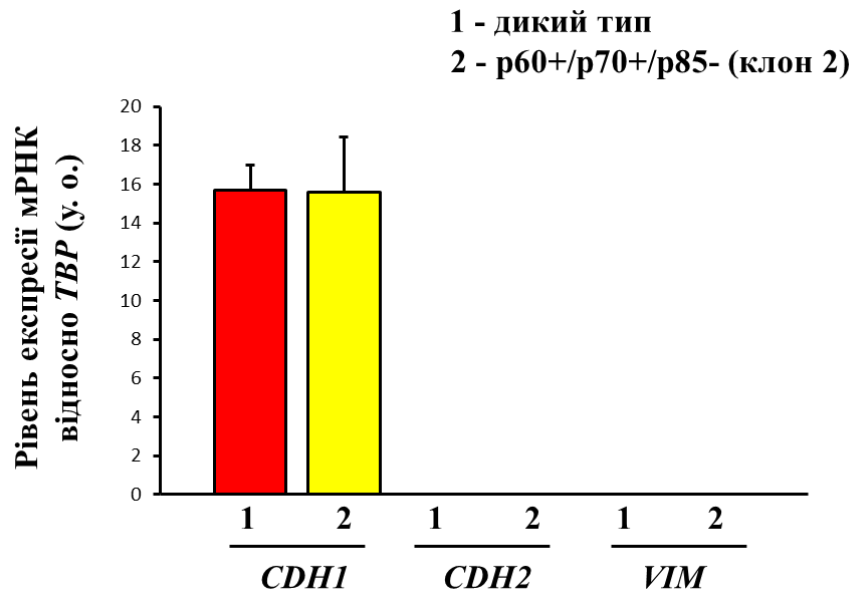


Рис. 3.24. Кількісний ПЛР аналіз рівнів експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в створеній клітинній лінії p60⁺/p70⁺/p85⁻ MCF-7 порівняно з клітинами MCF-7 дикого типу. В якості референтного гена був використаний *TBP*. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували ΔC^t метод розрахунку. *CDH1* – E-кадгерин; *CDH2* – N-кадгерин; *VIM* – віментин.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.
2. Tereshchenko, Y. S., Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.** Generation of MCF-7 cell lines with downregulated expression of different S6K1 isoforms. Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference, V. N. Karazin

Kharkiv National University, November 29 – December 1, 2017, Kharkiv, Ukraine, pp. 38-39.

3. 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. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. *Biopolymers and Cell*, 34(2), p. 164.
4. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V. (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
5. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 73.
6. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*, 90 (Special Issue), p. 23.
7. Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Knockout of the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p85, in the MCF-7 cell line leads to decreased cell growth, survival and migration. 15th Horizons In Molecular Biology, 10th – 13th September, 2018, Gottingen, Germany, p. 84.
8. Kravchenko, A. O., Kosach, V. R., Shkarina, K. A., **Zaiets, I. V.**, I.O. Tykhonkova, I. O., Khoruzhenko, A. I. (2018). Optimization of in vitro model for analysis of tumor cell migration dynamics. *Biopolymers and Cell*, 34(6), pp. 477-486.

9. **Zaiets, I. V.**, Kosach, V. R., Filonenko, V. V. Selective expression of the p60 ribosomal protein S6 kinase 1 isoform induces an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells MCF-7. XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 22-25 травня 2019.
10. Holiar, V. V., Gotsulyak, N. Ya., Khoruzhenko, A. I., **Zaiets, I. V.** (2019). Generation and characterization of the MCF-7 cell line with a knockout of a p85-S6K1 isoform of the ribosomal protein S6 kinase 1. *Biopolymers and Cell*, 35(4), pp. 303-312.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Кіназа S6K1 є широко вивченим ефектором комплексу mTORC1, контролюючи низку фундаментальних клітинних процесів, зокрема транскрипцію, трансляцію, синтез білків та ліпідів, клітинний ріст, виживання, проліферацію та міграцію клітин. Порушена регуляція mTORC1/S6K1 сигнального шляху призводить до різноманітних патологічних станів, особливо злоякісній трансформації клітин епітеліального походження. У трансформованих клітинах часто спостерігається аберантна експресія гена S6K1. На додаток до підвищеної експресії S6K1 на рівні РНК та білка, у клінічних зразках раку молочної залози було виявлено ампліфікацію гена S6K1 (203-206).

В результаті альтернативної трансляції з домінантного S6K1 транскрипту відбувається синтез двох ізоформ, p85-S6K1 та p70-S6K1, відповідно з першого та другого стартових кодонів (3). Ці два білки є домінантними S6K1 ізоформами і відрізняються один від одного 23-х амінокислотним подовженням. Також існує гіпотеза, що згаданий транскрипт використовує йще один стартовий кодон, який може ініціювати трансляцію третьої ізоформи, p60-S6K1, яка є вкороченою на 53 а.з. з N-кінця порівняно з ізоформою p85-S6K1 (7).

Проте, слід зауважити, що при дослідженні регуляції вказаних клітинних процесів вивчалися функції або S6K1 гена в цілому, без акцентування уваги на ролі окремих S6K1 ізоформ (при дослідженнях із використанням технології РНК інтерференції та створенні модельних тварин із нокаутом гена S6K1), або окремо p70-S6K1 та p85-S6K1 ізоформ (при дослідженнях із надекспресією окремих ізоформ в клітинах *in vitro*). Особливості регуляції та функціональне значення ізоформи p60-S6K1 не були досліджені. Так само, не проводились

дослідження і щодо ролі окремих ізоформ у розвитку патологій, пов'язаних із дисфункцією гена S6K1, зокрема раку молочної залози.

Метою представленої роботи було визначити механізми експресії, регуляції активності та функціональні особливості в клітині ізоформи p60-S6K1.

На початковому етапі досліджень нами було експериментально підтверджено гіпотезу, що p60-S6K1 утворюється в результаті трансляції з використанням третього стартового кодону. Надалі було ідентифіковано новий сплайсовий варіант S6K1, який відповідає за трансляцію ізоформи p60-S6K1. У роботі (7), окрім вивчення рівня експресії p60-S6K1 в різних клітинних лініях раку молочної залози, були зроблені спроби з'ясувати спосіб синтезу досліджуваної ізоформи. Одна з гіпотез полягала у тому, що p60-S6K1 могла б синтезуватися з окремого транскрипту, який продукується шляхом альтернативного сплайсингу з домінантного p70/p85-S6K1 транскрипту. Проте, від цієї гіпотези автори відмовилися, оскільки не вдалося ідентифікувати p60-S6K1-специфічний транскрипт. Авторами також було зроблено припущення, що p60-S6K1 могла би бути продуктом альтернативної трансляції подібно до p70/p85-S6K1 ізоформ, ініціація якої відбувається з третього стартового кодону. Ініціація трансляції p85-S6K1 та p70-S6K1 відбувається з єдиного транскрипту з використанням метіоніну 1 та 24 відповідно. Таким чином, ініціація трансляції з метіоніну 54 могла б приводити до синтезу продукту відповідного до гіпотетичної p60-S6K1 розміру, оскільки вестерн-блот аналіз детектує гіпотетичну ізоформу на рівні 60 кДа. Якби дане припущення було вірним, то p60-S6K1 повинна була б мати вкорочений N-кінцевий домен у порівнянні з p70- та p85-S6K1. Для підтвердження цього припущення, автори провели вестерн-блот аналіз із використанням антитіл проти С-кінця та N-кінця p70-S6K1. В результаті С-кінцеві антитіла детектували всі три ізоформи, в той час як N-кінцеві – тільки p70 та p85, вказуючи на те, що p60-S6K1 дійсно має вкорочений N-кінець. Таким чином автори висунули гіпотезу альтернативної трансляції ізоформи p60-S6K1.

Однак, незважаючи на попередні результати (7), які слугують на користь гіпотези альтернативної трансляції, могло б бути й інше пояснення наявності p60-S6K1 у клітинах. Ця ізоформа могла б виникати в результаті протеолітичного розщеплення більш довгих p70- та p85-S6K1 ізоформ. Таким чином, наше перше завдання полягало в тому, щоб з'ясувати чи є ізоформа p60-S6K1 продуктом альтернативної трансляції, чи вона є продуктом протеолізу.

На основі гіпотези альтернативної трансляції p60-S6K1 ми припустили, що порушення нуклеотидної послідовності ДНК між другим і третім стартовими кодонами в межах кодуєчої послідовності гена за допомогою CRISPR/Cas9 системи в разі зсуву рамки зчитування має призвести до вимкнення експресії ізоформ p85- та p70-S6K1, однак не вплинути на експресію ізоформи p60-S6K1. Так само, внаслідок порушення послідовності гена S6K1 після третього стартового кодону в межах кодуєчої послідовності гена можна отримати клітини з вимкненою експресією усіх трьох ізоформ.

Результати CRISPR-опосередкованого вимкнення експресії ізоформ S6K1 в клітинах HEK-293 показали, що редагування нуклеотидної послідовності між другим та третім стартами трансляції, як і очікували, призводить до блокування експресії p70- та p85-S6K1 ізоформ та збереження експресії p60-S6K1 і, відповідно, отримання сублінії клітин HEK-293 з фенотипом p60⁺/p70⁻/p85⁻. Так само, редагування нуклеотидної послідовності після третього старту трансляції призводило до блокування експресії усіх трьох S6K1 ізоформ і, відповідно, p60⁻/p70⁻/p85⁻ фенотипу клітин.

Таким чином, отримані результати є першим експериментальним підтвердженням того, що ізоформа p60-S6K1 є саме продуктом трансляції мРНК, ініціація якої відбувається з третього стартового кодону, а не виникає внаслідок протеолітичного розщеплення домінантних ізоформ p70/p85-S6K1.

Разом з тим виявилось, що у базі даних NCBI Reference Sequence Database представлена послідовність окремого сплайсового варіанту S6K1 мРНК – transcript variant 4 (NM_001272044.1, RefSeq, NCBI) [надалі використовується назва “транскрипт p60-S6K1”]. Нуклеотидна послідовність цього транскрипту

була отримана з результатів проекту NEDO, проекту по секвенуванню людських кДНК, які відповідають сплайсовим варіантам (AK297147.1, GenBank, NCBI) [неопубліковані дані]. Послідовність цього транскрипту відрізняється від послідовності домінантного транскрипту тільки наявністю інсерції (екзон 1a) між екзонами 1 і 2. Проте, ця додаткова послідовність нуклеотидів містить стоп-кодон, який знаходиться у відкритій рамці зчитування і не дає таким чином можливості транслюватися повнорозмірним р70- та р85-S6K1 ізоформам, викликаючи ранню термінацію їх трансляції. Водночас, стартовий кодон для р60-S6K1 знаходиться в межах екзону 2, після інсерції, завдяки чому з транскрипту синтезується повнорозмірна р60-S6K1 ізоформа.

Ми використали метод ЗТ-ПЛР для ідентифікації транскрипту р60-S6K1 в клітинах лінії MCF-7, в геномі яких спостерігається ампліфікація гена S6K1. Результати секвенування утвореного ПЛР фрагменту підтвердили, що послідовність цього фрагменту повністю співпадає з такою для S6K1 transcript variant 4.

Далі ми використали технологію РНК-інтерференції для підтвердження гіпотези, що ідентифікований транскрипт відповідає за синтез ізоформи р60-S6K1. Для цього використовували shRNA, яка є комплементарною послідовністю екзону 1a і, відповідно, мішенню для РНК інтерференції. Вестерн-блот аналіз клітинної лінії MCF-7, яка стабільно експресує специфічну для р60-S6K1 транскрипту shRNA, показав, що спостерігається значне пригнічення експресії ізоформи р60-S6K1 у порівнянні з контрольними клітинами дикого типу. Отже, нами було експериментально доведено, що транскрипт р60-S6K1 ініціює трансляцію ізоформи р60-S6K1, але не ізоформ р70/р85-S6K1. Наші результати також вказують на те, що трансляція з окремого сплайсового варіанту може бути ключовим механізмом експресії ізоформи р60-S6K1 в клітинах MCF-7. Однак, не можна виключати і того, що р60-S6K1 може синтезуватися шляхом альтернативної трансляції в клітинній лінії MCF-7, проте вибір механізму експресії р60-S6K1 та його регуляція можуть залежати як від типу клітин, так і від фізіологічних умов.

При дослідженні рівнів експресії p60-S6K1 в клітинах нами було встановлено, що ідентифікований транскрипт виявляє диференційний патерн експресії в різних типах клітин. Однак, експресія транскрипту p60-S6K1, як показано, не корелює з експресією тотальної S6K1 мРНК, вказуючи на можливу незалежну від p70/p85-S6K1 роль нового транскрипту як в нормальній клітинній фізіології, так і захворюваннях, які пов'язані з дисфункцією S6K1.

Дослідження рівнів експресії p60-S6K1 додатково виявило невідповідність профілів експресії p60-S6K1 мРНК та відповідного білкового продукту. Така невідповідність могла би бути пояснена наявністю принаймні двох механізмів синтезу p60-S6K1.

З'ясування функціональної ролі p60-S6K1 в клітині вимагало аналізу її каталітичної активності. Хоча p60-S6K1 має вкорочений N-кінець і не містить, таким чином, у своєму складі сайту зв'язування комплексу mTORC1 (TOS мотив), який є важливим сайтом для активації S6K1 через mTOR-опосередковане фосфорилування за сайтом Thr-389 (для p70-S6K1), проте, ця ізоформа зберігає інтактний кіназний домен. Відсутність TOS мотиву ставить під питання mTOR-залежне фосфорилування p60-S6K1 і, відповідно, активність досліджуваної ізоформи. Отже, після ідентифікації транскрипту, специфічного для p60-S6K1, нами були поставлені завдання виявити кіназну активність ізоформи p60-S6K1. Для цього було вирішено використати клітинну лінію HEK-293, яка селективно експресує p60-S6K1, та імунопреципітувати ізоформу з цих клітин. Кіназна активність p60-S6K1 була проаналізована за допомогою кіназної реакції *in vitro* з використанням рекомбінантного рибосомного білка rpS6 в якості субстрату. Результати кіназного тесту демонструють, що ізоформа p60-S6K1 має кіназну активність і здатна фосфорилувати rpS6 *in vitro*.

Слід зазначити, що іншими дослідниками проводилось вивчення механізму активації p70/p85-S6K1 із використанням мутантів подібних за амінокислотною послідовністю до p60-S6K1. В одному дослідженні (37) коротка делеція N-кінця ізоформи p85-S6K1, $\Delta 58$ -p85, призводила до втрати мутантом кіназної

активності, у той час як автори іншої роботи (34) використали N-кінцеву делецію ізоформи p70-S6K1, $\Delta 53$ -p70, і створена мутантна форма виявляла значно знижену кіназну активність у порівнянні з білком дикого типу. Варто зазначити, що мутант S6K1, який був використаний у (37), являв собою делетовану форму p60-S6K1 із втратою п'яти N-кінцевих амінокислот. Що стосується мутанту S6K1, який був створений у (34), то, хоча його послідовність повністю і співпадала з такою для p60-S6K1, він був фланкований з N-кінця HA-епітопом, що також ускладнює інтерпретацію отриманих даних. На додаток, в обох дослідженнях використовувались клітинні моделі відмінні від такої, яка була застосована у нашому поточному дослідженні, припускаючи різні способи регуляції ізоформи p60-S6K1 в різних типах клітин. Остання обставина може пояснювати розбіжності в результатах, отриманих іншими авторами, та результатами нашого дослідження.

Після визначення здатності каталізувати кіназну реакцію постало питання щодо відповідності механізмів регуляції активності p60-S6K1 тим, що існують для p70 та p85 ізоформ S6K1, оскільки ця ізоформа на відміну від p70/p85-S6K1 не містить у своєму складі TOS мотиву, за допомогою якого у відповідь на позаклітинні ростові сигнали активований mTORC1 здатний зв'язуватися з S6K1 і фосфорилувати останню за Thr389 (для p70-S6K1). Фосфорильований Thr389, наряду з іншими фосфорильованими сайтами (Thr229 та Ser371 для p70-S6K1), ініціює зміну конформації S6K1 таким чином, що кіназа стає активною і здатна фосфорилувати свої субстрати. На сьогодні, існуючі дані вказують на те, що Thr229 (T-петлевий сайт, Thr199 у p60-S6K1), Ser371 (TM сайт, Ser341 у p60-S6K1) та Thr389 (HM сайт, T359 у p60-S6K1) є критичними для активності p70-S6K1 сайтами фосфорилування (16-17, 23, 30, 32-33, 39, 41-42). До прямих регуляторів сайтів Thr229 та Thr389 відносять відповідно PDK1 (23, 39) та mTORC1 (30, 32, 42), які є компонентами PI3K/mTORC1 сигнального шляху, у той час як кіназа для Ser371 сайту залишається невідомою (17). У той самий час, фосфорилування за C-кінцевими сайтами Ser411, Ser418, Thr421 та Ser424 (Ser381, Ser388, Thr391 та Ser394 у p60-S6K1) є ранньою подією в

активації p70-S6K1 у відповідь на ростові фактори та мітогени (19, 25), і, подібно до Ser371, фізіологічні кінази для цих чотирьох сайтів також не ідентифіковані. Дані чотири сайти є пролін-направленими сайтами і розташовані у межах С-кінцевого домену і взаємодіють з N-кінцем у неактивному стані (1, 28). Тим не менше, вважається, що фосфорилування S6K1 за цими сайтами не є критичним для кіназної активності, хоча і сприяє певним чином утворенню активної конформації кінази (22, 29-30). Враховуючи наявність у складі p60-S6K1 усіх трьох ключових сайтів фосфорилування, досліджувана ізоформа могла б гіпотетично підлягати способу регуляції активності, який є характерним для ізоформ p70- та p85-S6K1, у відповідь на позаклітинні ростові сигнали.

Таким чином, наступним завданням роботи було оцінити статус фосфорилування ізоформи p60-S6K1 за ключовими для кіназної активності сайтами в отриманій клітинній лінії p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 за різних умов росту клітин. Аналіз рівнів фосфорилування показав, що p60-S6K1 не підлягає фосфорилуванню за Thr199 та Thr359 сайтами, проте, фосфорилується за Ser341 та Thr391/Ser394. Також було встановлено, що динаміка фосфорилування С-кінцевих сайтів Thr391/Ser394 у часі при активації mTORC1 сигналювання відрізняється від такої для p70/p85-S6K1. Таким чином, згідно отриманих даних, кіназна активність p60-S6K1 у клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 може регулюватися за допомогою механізмів, які є відмінними від таких для p70/p85-S6K1.

За даними літератури в клітинній лінії MCF-7 ізоформа p60-S6K1 фосфорилується за сайтами Ser341, Thr359 та Thr391/Ser394 (7). Разом з тим, рівень фосфорилування p60-S6K1 за PDK1-регульованим сайтом Thr199 не досліджувався і залишалось невідомим чи здатна кіназа PDK1 фосфорилувати p60-S6K1 в клітинах MCF-7. Отже, додатковим завданням було порівняти стан фосфорилування p60-S6K1 за досліджуваними сайтами в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та MCF-7 за різних умов росту. Отримані нами результати виявили високі рівні фосфорилування за mTORC1- та PDK1-регульованими

сайтами Thr359 та Thr199 відповідно, і, таким чином, узгоджуються з тими, які представлені в (7). Такі розбіжності в результатах могли б виникнути із-за використання різних клітинних ліній для аналізу рівнів фосфорилування за Thr359 та Thr199. Враховуючи дану обставину, p60-S6K1 могла би підлягати різним способам регуляції її активності в залежності від типу клітин та їх походження, як наприклад HEK-293 та MCF-7 в даному випадку.

Як відомо, модифікація S6K1 шляхом фосфорилування є основним способом регуляції кіназної активності через PI3K/mTORC1-залежний сигнальний каскад у відповідь на позаклітинні стимули. Приймаючи до уваги встановлений нами стан фосфорилування p60-S6K1 в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻ HEK-293 було зроблено припущення, що ізоформа p60-S6K1 є нечутливою до PI3K/mTORC1-залежних сигналів у клітинній лінії HEK-293. Отже, наступним кроком ми проаналізували активність p60-S6K1 за умов мітогенної стимуляції сироваткою та інгібування PI3K/mTORC1 сигналювання інгібітором рапаміцином в отриманій клітинній лінії p60⁺/p70⁻/p85⁻ HEK-293 і порівняли з активністю p70/p85-S6K1 за тих же умов. Для аналізу активності S6K1 ізоформ використовували *in vitro* кіназну реакцію. Результати експерименту показали, що рівень активності p60-S6K1 залишається однаковим як за умов голодування, так і за стимуляції та блокування PI3K/mTORC1-опосередкованого сигналювання. Напроти, активність ізоформ p70- та p85-S6K1 зростає у відповідь на стимуляцію PI3K/mTORC1 сигналювання і пригнічується за умови дії рапаміцину та голодування. Таким чином, експериментальні дані вказують на те, що ізоформа p60-S6K1 не підлягає регуляції через PI3K/mTORC1 сигнальний шлях в клітинах HEK-293, що узгоджується з результатами дослідження стану фосфорилування p60-S6K1.

Також слід додати, що за нашими спостереженнями в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻ HEK-293 за умов дії рапаміцину рівень фосфорилування ендогенного pS6 за Ser240/244 значно зменшувався, подібно до такого в клітинах дикого типу. Такі результати можна пояснити тим, що p60-S6K1 та p70/p85-S6K1 можуть мати відмінну специфічність до субстратів, і білок pS6 може не

слугувати фізіологічним субстратом для каталітично активної ізоформи p60-S6K1, у той час як *in vitro* p60-S6K1 здатна фосфорилувати рекомбінантний rpS6.

Надалі, після вивчення особливостей регуляції активності p60-S6K1, наше завдання полягало у визначенні функціональних особливостей досліджуваної ізоформи в клітинах HEK-293 та MCF-7. Таким чином, нами було вивчено вплив селективної експресії p60-S6K1 на процеси трансляції, міграції та проліферації в клітинах p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293. Ці фундаментальні клітинні процеси, за даними літератури, є найбільш вивченими у контексті mTOR/S6K1 сигналювання (10-11).

Аналіз рівнів фосфорилування факторів трансляції eIF4B та eEF-2K, а також rpS6 показав, що CRISPR/Cas9-опосередковане пригнічення експресії ізоформ S6K1 не приводить до суттєвих змін у фосфорилуванні, а отже і активності, факторів трансляції як у клітинах p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293, так і в p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293. Слід зауважити, що, окрім S6K1, усі досліджувані білки є мішенями для кількох інших AGC кіназ, зокрема RSK та S6K2 (11). Таким чином, відсутність значних змін у рівнях фосфорилування факторів трансляції в досліджуваних клітинах можна пояснити компенсаторним ефектом з боку RSK та S6K2. Проте, на противагу нашим результатам, дослідження, в яких використовували РНКі-опосередковане вимкнення експресії S6K1 у культивованих клітинах ссавців і нокаутні за геном S6K1 миші, показали зменшення рівня фосфорилування білка rpS6 за усіма чотирма сайтами (171, 243). Така розбіжність в результатах може пояснюватись використанням різних клітинних ліній та/або різних методів пригнічення експресії S6K1. Отже, згідно з даними нашого дослідження, CRISPR/Cas9-опосередковане пригнічення експресії ізоформ S6K1 не приводить до суттєвих змін в активності факторів трансляції як у клітинах p60⁻/p70⁻/p85⁻HEK-293, так і в p60⁺/p70⁻/p85⁻HEK-293. Таке спостереження вказує на іншу роль ізоформи p60-S6K1 у контролі клітинної фізіології. Також варто підкреслити, що відповідно до наших

результатів, у дослідженні (243) спостерігали схожий патерн фосфорилування білка eIF4B після пригнічення експресії S6K1.

На відміну від трансляції, дослідження рівнів проліферації та міграції в створених клітинних лініях p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 виявило частковий компенсаторний ефект з боку експресії p60-S6K1 на проліферацію та міграцію клітин НЕК-293. Так, наші спостереження вказують на можливу роль ізоформи p60-S6K1 у контролі клітинного руху та проліферації.

Одним із класичних сигнальних шляхів, які регулюють клітинну проліферацію та міграцію, є PI3K/Akt-залежний сигнальний шлях. Нами було досліджено стан активації ключового компонента даного сигнального шляху в створених клітинах НЕК-293 – кінази Akt. Аналіз стану фосфорилування Akt за сайтом Ser473, який є критичним для активації Akt, за різних умов росту клітин виявив зниження активності Akt в обох клітинних лініях p60⁺/p70⁻/p85⁻НЕК-293 та p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293. Знову таки, в клітинах з вибірковою експресією p60-S6K1 спостерігався підвищений рівень активації Akt у порівнянні з p60⁻/p70⁻/p85⁻НЕК-293 за базальних умов росту клітин. Отже, як видно з результатів дослідження, ізоформа p60-S6K1 може потенційно бути прямо або опосередковано залученою до регуляції активності Akt.

Загалом, у сучасній літературі існують доволі суперечливі дані щодо рівнів фосфорилування кінази Akt за Ser473 у відповідь на пригнічення експресії гена S6K1. Так, в протипагу нашим результатам існують літературні дані, які свідчать про підвищення рівня фосфорилування за Ser473 при нокдауні S6K1 в клітинній лінії рабдоміосаркоми (225). У той самий час, в іншому дослідженні було продемонстровано або незмінений рівень Ser473 фосфорилування, або навіть зменшений у випадку, коли автори використали методи відповідно хімічного та генетичного інгібування S6K1 (244). На додаток, мишині ембріональні фібробласти, виділені з мишей нокаутних за генами S6K1 та S6K2, показували нормальні рівні Ser473 фосфорилування (176). Хоча S6K1 є негативним регулятором активності Akt, інгібуючи експресію IRS1/2 через

петлю негативного зворотнього зв'язку, існують й інші менш досліджені mTOR-залежні зворотні зв'язки, які негативно модулюють функцію Akt. Можливо, що деякі з цих зворотніх зв'язків стають надактивованими за умов CRISPR-опосередкованого пригнічення експресії S6K1 в клітинах HEK-293.

З огляду на відомі онкогенні властивості S6K1 було важливо з'ясувати яким чином експресія різних ізоформ кінази впливає на проліферацію і міграцію злоякісних клітин, що є важливими показниками агресивності злоякісних пухлин. У нашому відділі також було отримано клітини лінії MCF-7, які вибірково експресують p60-S6K1 (p60⁺/p70⁻/p85⁻MCF-7), за допомогою адаптованої для клітин HEK-293 технології CRISPR/Cas9. Так само, нами було досліджено потенціал створених клітин p60⁺/p70⁻/p85⁻MCF-7 до міграції та проліферації, а також проведено їх морфологічний аналіз. Результати досліджень показали, що клітини p60⁺/p70⁻/p85⁻MCF-7 мають видовжену форму і підвищену здатність до міграції порівняно з контрольними клітинами MCF-7.

Видовжена, фібробластоподібна форма клітин є характерною для мезенхімальних клітин, які мають високий потенціал до міграції та інвазії прилеглих тканин. Таким чином, нами було зроблено відповідне припущення, що вибіркова експресія ізоформи p60-S6K1 й одночасне пригнічення експресії ізоформ p70- та p85-S6K1 може ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід в клітинах MCF-7.

Карцинома молочної залози є одним з найбільш поширених типів раку у жінок. Більшість випадків смерті (90%) від цієї патології виникають в результаті інвазії раковими клітинами прилеглих тканин та метастазування у віддалені сайти організму із формуванням вторинних вогнищ патологічного процесу. У здатності злоякісно трансформованих клітин до інвазії та наступного метастазування головну роль відіграє процес епітеліально-мезенхімального переходу.

Епітеліально-мезенхімальний перехід є складною програмою, за якої епітеліальні клітини втрачають ознаки епітеліального фенотипу і набувають інвазивний та міграційний мезенхімальний фенотип, який дозволяє цим

клітинам залишати паренхіму тканини і потрапляти у серцево-судинну систему під час метастазування. До принципових ознак епітеліально-мезенхімального переходу відносять втрату експресії або функціональної активності E-кадгерину та знижену представленість білків щільних контактів (таких як ZO-1 [zona occludens 1] та оклюдину) і цитокератинів, а також збільшену представленість мезенхімальних маркерів, як наприклад віментину, фібронектину, FSP-1 (fibroblast specific protein 1), α -SMA (α -smooth muscle actin) та N-кадгерину (245).

Втрата адгезивних контактів між клітинами ініціює зміни у складі та організації цитоскелету, що змінює полярність клітини. Остання, у свою чергу, набуває видовженої форми. Утворені мезенхімальні клітини здійснюють інвазію прилеглого базального позаклітинного матриксу і мігрують у навколишні тканини вздовж фібронектинового матриксу, який секретують мігруючі клітини (245).

В основі ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу лежить активація певних транскрипційних факторів, зокрема Snail1 та Snail2 (також відомий як Slug), а також ZEB1, ZEB2 та Twist (246). Усі ці білки взаємодіють з промотерною ділянкою генів, які є асоційованими з міжклітинною адгезією, і здійснюють репресію транскрипції цих генів, що є ключовим початковим етапом епітеліально-мезенхімального переходу. Експресія та активація транскрипційних факторів, які індукують епітеліально-мезенхімальний перехід, відбувається у відповідь на активацію різноманітних сигнальних каскадів сигнальними молекулами факторів TGF- β , BMP, EGF, FGF, PDGF, Wnt, Shh, Notch, а також інтегринів (247).

Покращене розуміння особливостей епітеліально-мезенхімального переходу може дозволити ідентифікувати нові терапевтичні мішені для лікування інвазивного раку молочної залози, а також визначити для діагностичних цілей біомаркери пухлинних клітин зі здатністю до метастазування.

Встановивши, що клітини $p60^+/p70^-/p85^-$ MCF-7 мають фібробластоподібну форму та високий потенціал до міграції, нами далі був проведений аналіз рівня експресії білка віментину в досліджуваних клітинах. Було виявлено, що, при порівнянні з клітинами дикого типу та з такими в яких вимкнена експресія всіх ізоформ S6K1, $p60^+/p70^-/p85^-$ MCF-7 експресують віментин і мають низькі рівні експресії цитокератинів. Отримані результати свідчать про зміну епітеліального фенотипу на мезенхімальний в клітинах MCF-7, які вибірково експресують ізоформу $p60$ -S6K1. Подальше дослідження експресії інших ключових для епітеліально-мезенхімального переходу маркерних генів, а саме N-кадгерину, E-кадгерину і транскрипційних факторів TWIST1, SNAIL1 та ZEB2 також підтвердило, що клітини MCF-7 набувають ознак мезенхімального фенотипу за диференційної експресії ізоформ S6K1. Додатково, для порівняння нами також був проведений аналіз експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в клітинній лінії $p60^+/p70^-/p85^-$ HEK-293. Результати дослідження вказують на те, що клітини HEK-293 дикого типу мають мезенхімальний фенотип, і демонструють, що профіль експресії маркерів епітеліально-мезенхімального переходу не відрізняється від такого для клітин $p60^+/p70^-/p85^-$ HEK-293.

Отже, ізоформа $p60$ -S6K1 ймовірно здатна ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід в клітинах MCF-7. Як видно з результатів, така функція $p60$ -S6K1 може бути реалізованою за умови відсутності експресії інших двох ізоформ $p70$ - та $p85$ -S6K1. Можливо, що $p70$ - та/або $p85$ -S6K1 через петлю зворотнього зв'язку опосередковано здійснюють негативний вплив на індукуючу активність $p60$ -S6K1. Однак, враховуючи те, що в клітинній лінії $p60^+/p70^-/p85^-$ MCF-7 відсутня експресія як $p70$ -S6K1 так і $p85$ -S6K1, то можна припустити, що негативний вплив на $p60$ -S6K1 здійснюється або однією з ізоформ, або обома одночасно. Для вирішення цієї проблеми нами також було створено модельну клітинну лінію $p60^+/p70^+/p85^-$ MCF-7 за допомогою CRISPR/Cas9 системи редагування генів з метою вимкнути експресію тільки ізоформи $p85$ -S6K1. Подальший аналіз експресії маркерних генів епітеліально-

мезенхімального переходу показав, що клітини з пригніченою експресією p85-S6K1 мають епітеліальний фенотип, подібно до клітин MCF-7 дикого типу.

Таким чином, можна припустити, що негативний вплив на індукуючу активність p60-S6K1 опосередковується ізоформою p70-S6K1 в клітинах MCF-7, оскільки відсутність експресії p85-S6K1 не ініціює епітеліально-мезенхімальний перехід в цих клітинах. Суттєвим фактором є співвідношення експресії саме ізоформ p60-S6K1 та p70-S6K1. Проте, остаточну відповідь на це питання можна дати дослідивши клітини з вимкненою експресією лише p70-S6K1 ізоформи, що поки залишається технічно складним завданням.

Як підсумок можна зазначити, що експресія ізоформи p60-S6K1 може відбуватися щонайменше з двох різних транскриптів. У першому випадку, p60-S6K1 синтезується шляхом альтернативної трансляції з третього стартового кодону в межах домінантного S6K1 транскрипту. В іншому випадку, трансляція p60-S6K1 відбувається з окремого сплайсового варіанту S6K1, який продукує тільки p60-S6K1. В результаті синтезується ізоформа S6K1, яка має кіназну активність, однак механізм регуляції цієї активності залежить від типу клітини. Так, в клітинах HEK-293 активність ізоформи p60-S6K1, на відміну від p70/p85-S6K1, не регулюється через PI3K/mTORC1 сигнальний шлях. В той самий час регуляція активності p60-S6K1 шляхом фосфорилування в клітинах MCF-7 напевно відбувається подібно до ізоформ p70- та p85-S6K1. Функціональний аналіз p60-S6K1 дає підстави вважати, що ця ізоформа може виконувати специфічну функцію, яка не властива p70- та p85-S6K1 ізоформам і полягає в ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу в клітині. В першу чергу це може відбуватись завдяки регуляції активності, шляхом фосфорилування, S6K1 субстратів специфічних виключно для p60 ізоформи кінрази, які прямо, або опосередковано, впливають на експресію транскрипційних факторів, що ініціюють програму епітеліально-мезенхімального переходу. Ймовірно, що така функція p60-S6K1 може бути реалізована за умови втрати експресії або пригнічення активності p70-S6K1, яка негативно регулює таку активність p60-S6K1.

На основі отриманих даних нами запропоновано гіпотетичну схему функціональної активності ізоформи p60-S6K1 в клітині (рис. 4.1), згідно якої в залежності від типу клітини p60-S6K1 може піддаватися різним способам регуляції активності і здатна виконувати різні функції. Так, наприклад, в епітеліальній клітині ізоформа p60-S6K1 може за певних умов ініціювати програму епітеліально-мезенхімального переходу, а саме за пригнічення експресії p70-S6K1, яка ймовірно здійснює негативний вплив на p60-S6K1. Напроти, в мезенхімальних клітинах, на відміну від епітеліальних, p60-S6K1 не підлягає регуляції через сигнальні каскади, які контролюються мітогенами та ростовими факторами, і виконує S6K1-залежні функції, контролюючи клітинну проліферацію і міграцію.

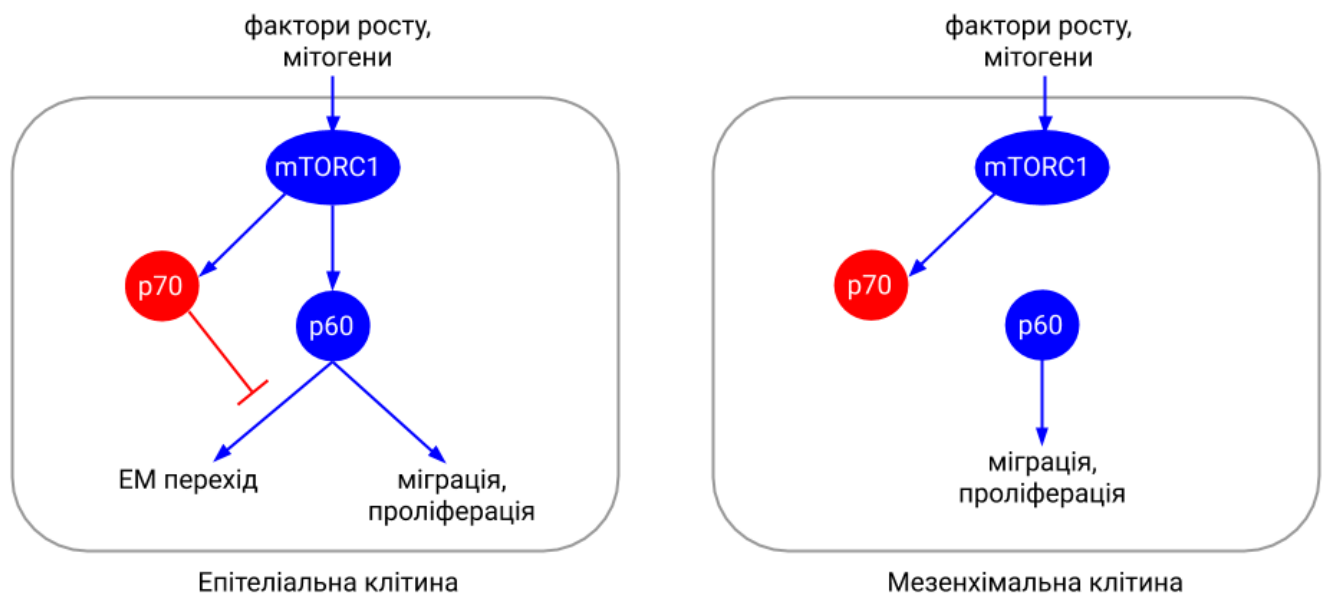


Рис. 4.1. Гіпотетична схема функціональної активності ізоформи p60-S6K1 у клітині

Таким чином, результати досліджень припускають, що співвідношення експресії ізоформ-S6K1, p60- та p70-S6K1, потенційно може слугувати діагностичним маркером клітин інвазивного типу раку молочної залози, в яких

відбувся епітеліально-мезенхімальний перехід. Ізоформа p60-S6K1 також може бути перспективною мішенню для створення специфічних інгібіторів з метою цільової терапії інвазивних типів карциноми молочної залози.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено існування щонайменше двох механізмів експресії нової каталітично активної р60 ізоформи S6K1, що полягають у використанні третього альтернативного старту трансляції спільної для р70/р85S6K1 ізоформ мРНК та/чи нової сплайсової мРНК специфічної виключно для р60-S6K1. Встановлено, що в залежності від типу клітини активність р60-S6K1 може бути мітоген-регульованою або, на відміну від відомих р70/р85-S6K1 ізоформ, мітоген-незалежною. На основі аналізу модельних клітинних ліній НЕК-293 та MCF-7 із диференційною експресією ізоформ S6K1 показано відмінності її функціональної активності порівняно з р70 та р85 ізоформами кінази. Аналогічно до р70/р85-S6K1, ізоформа р60-S6K1 залучена до регуляції S6K1-залежних клітинних процесів, стимулюючи проліферацію та міграцію клітин, однак в залежності від типу клітин може виконувати унікальну функцію, яка полягає в ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу.

1. Встановлено можливість експресії ізоформи р60-S6K1 в клітинах НЕК-293 внаслідок трансляції мРНК S6K1 з альтернативного третього старту трансляції в разі блокування за допомогою технології геномного редагування CRISPR/Cas9 перших двох стартових кодонів, що є специфічними для р70 та р85 ізоформ кінази.
2. Вперше експериментально доведено, що ізоформа р60-S6K1 може експресуватися в результаті трансляції окремого сплайсового варіанту мРНК S6K1. Отримані результати не виключають існування механізму експресії р60-S6K1 шляхом альтернативної трансляції з використанням третього альтернативного стартового кодону у межах домінантного р70/р85-S6K1 транскрипту.

3. Вперше показано, що р60-S6K1 має кіназну активність подібно до р70- та р85-S6K1 ізоформ за умов *in vitro*.
4. Встановлено, що ізоформа р60-S6K1 у клітинах HEK-293 не підлягає фосфорильованню за ключовими для активності р70/р85-S6K1 ізоформ PDK1- та mTORC1-регульованими сайтами, на відміну від клітин MCF-7, у яких таке фосфорильовання спостерігається.
5. З'ясовано, що активність р60-S6K1 у клітинах HEK-293 не чутлива до мітогенних стимулів та інгібітора mTORC1 рапаміцину, що свідчить про її можливу конститутивну активність чи наявність незалежного від ростових факторів і PI3K/mTORC1 сигнального каскаду механізму модуляції активності.
6. Визначено позитивний вплив ізоформи р60-S6K1 на процеси клітинної міграції та проліферації клітин HEK-293.
7. Показано здатність експресії ізоформи р60-S6K1 за пригніченої експресії домінантних ізоформ р70- та р85-S6K1 ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід у клітинах лінії раку молочної залози людини MCF-7.
8. Встановлено, що вимкнення експресії лише ізоформи р85-S6K1 у клітинах MCF-7 не призводить до епітеліально-мезенхімального переходу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Banerjee, P., Ahmad, M. F., Grove, J. R., Kozlosky, C., Price, D. J., Avruch, J. (1990). Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(21), pp. 8550–8554.
2. Kozma, S. C., Ferrari, S., Bassand, P., Siegmann, M., Totty, N., Thomas, G. (1990). Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(19), pp. 7365–7369.
3. Grove, J. R., Banerjee, P., Balasubramanyam, A., Coffey, P. J., Price, D. J., Avruch, J., et al. (1991). Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini. *Mol Cell Biol*, 11(11), pp. 5541–5550.
4. Burnett, P. E., Blackshaw, S., Lai, M. M., Qureshi, I. A., Burnett, A. F., Sabatini, D. M., et al. (1998). Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(14), pp. 8351–8356.
5. Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S. W., Sinha, R., Mu, D., Krainer, A. R. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol*, 14(3), pp. 185–193.
6. Ben-Hur, V., Denichenko, P., Siegfried, Z., Maimon, A., Krainer, A., Davidson, B., Karni, R. (2013). S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1. *Cell Rep*, 3(1), pp. 103-15.
7. Kim, D., Akcakanat, A., Singh, G., Sharma, C., Meric-Bernstam, F. (2009). Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. *Growth Factors*, 27(1), pp. 12-21.
8. Jacinto, E. and Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J*, 410(1), pp. 19–37.
9. Pearce, L. R., Komander, D. and Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1), pp. 9–22.
10. Meyuhas, O. and Dreazen, A. (2009). Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 90, pp. 109–153.

11. Fenton, T. R. and Gout, I. T. (2011). Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(1), pp. 47–59.
12. Foster, K. G. and Fingar, D. C. (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem*, 285(19), pp. 14071–14077.
13. Zoncu, R., Efeyan, A. and Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), pp. 21–35.
14. Chou, M. M. and Blenis, J. (1996). The 70kD S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell*, 85(4), pp. 573–583.
15. Romanelli, A., Martin, K. A., Toker, A. and Blenis, J. (1999). p70 S6 kinase is regulated by protein kinase C ζ and participates in a phosphoinositide 3-kinase-regulated signalling complex. *Mol Cell Biol*, 19(4), pp. 2921–2928.
16. Weng, Q. P., Kozłowski, M., Belham, C., Zhang, A., Comb, M. J. and Avruch, J. (1998). Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific antiphosphopeptide antibodies. *J Biol Chem*, 273(26), pp. 16621–16629.
17. Moser, B. A., Dennis, P. B., Pullen, N., Pearson, R. B., Williamson, N. A., Wettenhall, R. E., Kozma, S. C. and Thomas, G. (1997). Dual requirement for a newly identified phosphorylation site in p70s6k. *Mol Cell Biol*, 17(9), pp. 5648–5655.
18. Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. and Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signalling by the 70kD S6 protein kinases. *Cell*, 69(7), pp. 1227–1236.
19. Kuo, C. J., Chung, J., Florentino, D. F., Flanagan, W. M., Blenis, J. and Crabtree, G. R. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature*, 358(6381), pp. 70–73.
20. Price, D. J., Grove, J. R., Calvo, V., Avruch, J. and Bierer, B. E. (1992). Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science*, 257(5072), pp. 973–977.
21. Pearson, R. B., Dennis, P. B., Han, J. W., Williamson, N. A., Kozma, S. C., Wettenhall, R. E. and Thomas, G. (1995). The principal target of rapamycin-induced

p70S6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J*, 14(21), pp. 5279–5287.

22. Han, J. W., Pearson, R. B., Dennis, P. B. and Thomas, G. (1995). Rapamycin, wortmannin, and the methylxanthine SQ20006 inactivate p70S6k by inducing dephosphorylation of the same subset of sites. *J Biol Chem*, 270(36), 21396–21403.

23. Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N. and Avruch, J. (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol*, 8(2), pp. 69–81.

24. Mukhopadhyay, N. K., Price, D. J., Kyriakis, J. M., Pelech, S., Sanghera, J. and Avruch, J. (1992). An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, 267(5), pp. 3325–3335.

25. Ferrari, S., Bannwarth, W., Morley, S. J., Totty, N. F. and Thomas, G. (1992). Activation of p70s6k is associated with phosphorylation of four clustered sites displaying Ser/Thr-Pro motifs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(15), pp. 7282–7286.

26. Keshwani, M. M., von Daake, S., Newton, A. C., Harris, T. K. and Taylor, S. S. (2011). Hydrophobic motif phosphorylation is not required for activation loop phosphorylation of p70 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1). *J Biol Chem*, 286(26), pp. 23552–23558.

27. Oh, W. J., Wu, C. C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L. A., Finlan, M., Roux, P. P., Su, B. and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J*, 29(23), pp. 3939–3951.

28. Price, D. J., Mukhopadhyay, N. K. and Avruch, J. (1991). Insulin-activated protein kinases phosphorylate a pseudosubstrate synthetic peptide inhibitor of the p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, 266(25), pp. 16281–16284.

29. Ferrari, S., Pearson, R. B., Siegmann, M., Kozma, S. C. and Thomas, G. (1993). The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70S6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *J Biol Chem*, 268(22), pp. 16091–16094.

30. Schalm, S. S. and Blenis, J. (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol*, 12(8), pp. 632–639.
31. Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H. and Sabatini, D. M. (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(4), pp. 1432–1437.
32. Isotani, S., Hara, K., Tokunaga, C., Inoue, H., Avruch, J. and Yonezawa, K. (1999). Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase α in vitro. *J Biol Chem*, 274(48), pp. 34493–34498.
33. Dennis, P. B., Pullen, N., Pearson, R. B., Kozma, S. C. and Thomas, G. (1998). Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation. *J Biol Chem*, 273(24), pp. 14845–14852.
34. Cheatham, L., Monfar, M., Chou, M. M. and Blenis, J. (1995). Structural and functional analysis of p70 S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(25), pp. 11696–11700.
35. Weng, Q., Andrabi, K., Kozlowski, M. T., Grove, J. R. and Avruch, J. (1995). Multiple independent inputs are required for activation of the p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol*, 15(5), pp. 2333–2340.
36. Dennis, P. B., Pullen, N., Kozma, S. C. and Thomas, G. (1996). The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. *Mol Cell Biol*, 16(11), pp. 6242–6251.
37. Mahalingam, M., Templeton, D. J. (1996). Constitutive activation of S6 kinase by deletion of amino-terminal autoinhibitory and rapamycin sensitivity domains. *Mol Cell Biol*, 16(1), pp. 405-413.
38. Schalm, S. S., Tee, A. R. and Blenis, J. (2005). Characterization of a conserved C-terminal motif (RSPRR) in ribosomal protein S6 kinase 1 required for its mammalian target of rapamycin-dependent regulation. *J Biol Chem*, 280(12), pp. 11101–11106.

39. Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A. and Thomas, G. (1998). Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*, 279(5351), pp. 707–710.
40. Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Curr Biol*, 7(4), pp. 261–269.
41. Williams, M. R., Arthur, J. S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P. and Alessi, D. R. (2000). The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol*, 10(8), pp. 439–448.
42. Saitoh, M., Pullen, N., Brennan, P., Cantrell, D., Dennis, P. B. and Thomas, G. (2002). Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem*, 277(22), pp. 20104–20112.
43. Sunami, T., Byrne, N., Diehl, R. E., Funabashi, K., Hall, D. L., Ikuta, M., Patel, S. B., Shipman, J. M., Smith, R. F., Takahashi, I. et al. (2010). Structural basis of human p70 ribosomal S6 kinase-1 regulation by activation loop phosphorylation. *J Biol Chem*, 285(7), pp. 4587–4594.
44. Frodin, M., Antal, T. L., Dummler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S. and Biondi, R. M. (2002). A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J*, 21(20), pp. 5396–5407.
45. Romanelli, A., Dreisbach, V. C. and Blenis, J. (2002). Characterization of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr389 in p70 S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 277(43), pp. 40281–40289.
46. Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*, 16(12), pp. 1472–1487.
47. Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. A., Sotiropoulos, A. and Pende, M. (2005). Atrophy of

- S6K1^{-/-} skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*, 7(3), pp. 286–294.
48. Liu, L., Li, F., Cardelli, J. A., Martin, K. A., Blenis, J. and Huang, S. (2006). Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways. *Oncogene*, 25(53), pp. 7029–7040.
49. Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005). Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or Rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem*, 280(20), pp. 19445–19448.
50. Duvel, K. and Broach, J. R. (2004). The role of phosphatases in TOR signaling in yeast. *Curr Top Microbiol Immunol*, 279, pp. 19–38.
51. Westphal, R. S., Coffee, Jr, R. L., Marotta, A., Pelech, S. L. and Wadzinski, B. E. (1999). Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *J Biol Chem*, 274(2), pp. 687–692.
52. Peterson, R. T., Desai, B. N., Hardwick, J. S. and Schreiber, S. L. (1999). Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(8), pp. 4438–4442.
53. Hahn, K., Miranda, M., Francis, V. A., Vendrell, J., Zorzano, A. and Teleman, A. A. (2010). PP2A regulatory subunit PP2A-B' counteracts S6K phosphorylation. *Cell Metab*, 11(5), pp. 438–444.
54. Yamnik, R. L., Digilova, A., Davis, D. C., Brodt, Z. N., Murphy, C. J., Holz, M. K. (2009). S6 kinase 1 regulates estrogen receptor in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem*, 284(10), pp. 6361–6369.
55. Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., Kozma, S. C. (1998). Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J*, 17(22), pp. 6649–59.
56. Fenton, T. R., Gwalter, J., Ericsson, J. and Gout, I. T. (2010). Histone acetyltransferases interact with and acetylate p70 ribosomal S6 kinases in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(2), pp. 359–366.

57. Fenton, T. R., Gwalter, J., Cramer, R. and Gout, I. T. (2010). S6K1 is acetylated at lysine 516 in response to growth factor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 398(3), pp. 400–405.
58. Wang, M. L., Panasyuk, G., Gwalter, J., Nemazanyy, I., Fenton, T., Filonenko, V. and Gout, I. (2008). Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(2), pp. 382–387.
59. Gwalter, J., Wang, M. L. and Gout, I. (2009). The ubiquitination of ribosomal S6 kinases is independent from the mitogen-induced phosphorylation/activation of the kinase. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(4), pp. 828–833.
60. Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Filonenko, V. and Gout, I. (2008). Ribosomal protein S6 kinase 1 interacts with and is ubiquitinated by ubiquitin ligase ROC1. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(2), pp. 339–343.
61. Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D. C. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.*, 441(1), pp. 1-21.
62. Valovka, T., Verdier, F., Cramer, R., Zhyvoloup, A., Fenton, T., Rebholz, H., et al. (2003). Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase betaII and regulates its subcellular localization. *Mol Cell Biol*, 23(3), pp. 852–863.
63. Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D. W., Filonenko, V., et al. (2006). Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J Biol Chem*, 281(42), pp. 31188–31201.
64. Antion, M. D., Merhav, M., Hoeffler, C. A., Reis, G., Kozma, S. C., Thomas, G., et al. (2008). Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learn Mem*, 15, pp. 29–38.
65. Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J., et al. (2008). 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*, 283(27), pp. 18478–18482.
66. Guertin, D. A. and Sabatini, D. M. (2009). The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*, 2(67), p. 24.

67. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L. and Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 22(2), pp. 159–168.
68. Alessi, D. R., Pearce, L. R. and Garcia-Martinez, J. M. (2009). New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Sci Signal*, 2(67), p. 27.
69. Sengupta, S., Peterson, T. R. and Sabatini, D. M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*, 40(2), pp. 310–322.
70. Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. and Cantley, L. C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell*, 10(1), pp. 151–162.
71. Sancak, Y., Thoreen, C. C., Peterson, T. R., Lindquist, R. A., Kang, S. A., Spooner, E., Carr, S. A. and Sabatini, D. M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 25(6), pp. 903–915.
72. van der Haar, E., Lee, S. I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J. and Kim, D. H. (2007). Insulin signaling to mTOR mediated by the AKT/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9(3), pp. 316–323.
73. Huang, J. and Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*, 412(2), pp. 179–190.
74. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. and Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 13(15), pp. 1259–1268.
75. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. and Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev*, 17(15), pp. 1829–1834.
76. Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. and Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*, 15(8), pp. 702–713.

77. Sato, T., Nakashima, A., Guo, L. and Tamanoi, F. (2009). Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *J Biol Chem*, 284(19), pp. 12783–12791.
78. Soliman, G. A., Acosta-Jaquez, H. A., Dunlop, E. A., Ekim, B., Maj, N. E., Tee, A. R. and Fingar, D. C. (2010). mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem*, 285(11), pp. 7866–7879.
79. Acosta-Jaquez, H. A., Keller, J. A., Foster, K. G., Ekim, B., Soliman, G. A., Feener, E. P., Ballif, B. A. and Fingar, D. C. (2009). Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Mol Cell Biol*, 29(15), pp. 4308–4324.
80. Ekim, B., Magnuson, B., Acosta-Jaquez, H. A., Keller, J. A., Feener, E. P. and Fingar, D. C. (2011). mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, 31(14), pp. 2787–2801.
81. Foster, K. G., Acosta-Jaquez, H. A., Romeo, Y., Ekim, B., Soliman, G. A., Carriere, A., Roux, P. P., Ballif, B. A. and Fingar, D. C. (2010). Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem*, 285(1), pp. 80–94.
82. Wang, L., Lawrence, Jr, J. C., Sturgill, T. W. and Harris, T. E. (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity is associated with phosphorylation of raptor by mTOR. *J Biol Chem*, 284(22), pp. 14693–14697.
83. Carriere, A., Cargnello, M., Julien, L. A., Gao, H., Bonneil, E., Thibault, P. and Roux, P. P. (2008). Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol*, 18(17), pp. 1269–1277.
84. Carriere, A., Romeo, Y., Acosta-Jaquez, H. A., Moreau, J., Bonneil, E., Thibault, P., Fingar, D. C. and Roux, P. P. (2011). ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 286(1), pp. 567–577.

85. Oshiro, N., Takahashi, R., Yoshino, K., Tanimura, K., Nakashima, A., Eguchi, S., Miyamoto, T., Hara, K., Takehana, K., Avruch, J. et al. (2007). The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem*, 282(28), pp. 20329–20339.
86. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A. and Lawrence, Jr, J. C. (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*, 282(27), pp. 20036–20044.
87. Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S. and Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, 137(5), pp. 873–886.
88. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121(2), pp. 179–193.
89. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. and Blenis, J. (2004). Tumor promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(37), pp. 13489–13494.
90. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. and Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294(5548), pp. 1942–1945.
91. Sun, Y., Fang, Y., Yoon, M. S., Zhang, C., Rocco, M., Zwartkruis, F. J., Armstrong, M., Brown, H. A. and Chen, J. (2008). Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(24), pp. 8286–8291.
92. Toschi, A., Lee, E., Xu, L., Garcia, A., Gadir, N. and Foster, D. A. (2009). Regulation of mTORC1 and mTORC2 complex assembly by phosphatidic acid: competition with rapamycin. *Mol Cell Biol*, 29(6), pp. 1411–1420.
93. Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Hsu, J. M., Chou, C. K., Wei, Y., Sun, H. L., Li, L. Y., Ping, B., Huang, W. C. et al. (2007). IKK β suppression of TSC1 links

- inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*, 130(3), pp. 440–455.
94. Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Wei, Y., Chou, C. K., Hung, J. Y., Yen, C. J. and Hung, M. C. (2008). IKK β suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int J Mol Med*, 22(5), pp. 633–638.
95. Dan, H. C., Adli, M. and Baldwin, A. S. (2007). Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I κ B kinase α . *Cancer Res*, 67(13), pp. 6263–6269.
96. Dan, H. C. and Baldwin, A. S. (2008). Differential involvement of I κ B kinases α and β in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. *J Immunol*, 180(11), pp. 7582–7589.
97. Dan, H. C., Cooper, M. J., Cogswell, P. C., Duncan, J. A., Ting, J. P. and Baldwin, A. S. (2008). Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*, 22(11), pp. 1490–1500.
98. Xie, X., Zhang, D., Zhao, B., Lu, M. K., You, M., Condorelli, G., Wang, C. Y. and Guan, K. L. (2011). I κ B kinase ϵ and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(16), pp. 6474–6479.
99. Joung, S. M., Park, Z. Y., Rani, S., Takeuchi, O., Akira, S. and Lee, J. Y. (2011). Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol*, 186(1), 499–507.
100. Ou, Y. H., Torres, M., Ram, R., Formstecher, E., Roland, C., Cheng, T., Brekken, R., Wurz, R., Tasker, A., Polverino, T. et al. (2011). TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation. *Mol Cell*, 41(4), 458–470.
101. Smith, E. M., Finn, S. G., Tee, A. R., Browne, G. J. and Proud, C. G. (2005). The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem*, 280(19), pp. 18717–18727.

102. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C. et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 136(3), pp. 521–534.
103. Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L. and Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), pp. 1496–1501.
104. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P. and Guan, K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10(8), pp. 935–945.
105. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S. and Sabatini, D. M. (2010). Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141(2), pp. 290–303.
106. Nada, S., Hondo, A., Kasai, A., Koike, M., Saito, K., Uchiyama, Y. and Okada, M. (2009). The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J*, 28(5), pp. 477–489.
107. Flinn, R. J., Yan, Y., Goswami, S., Parker, P. J. and Backer, J. M. (2010). The late endosome is essential for mTORC1 signaling. *Mol Biol Cell*, 21(5), pp. 833–841.
108. Saci, A., Cantley, L. C. and Carpenter, C. L. (2011). Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Mol Cell*, 42(1), 50–61.
109. Shackelford, D. B. and Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 9(8), pp. 563–575.
110. Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), pp. 577–590.
111. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30(2), pp. 214–226.
112. Zheng, M., Wang, Y. H., Wu, X. N., Wu, S. Q., Lu, B. J., Dong, M. Q., Zhang, H., Sun, P., Lin, S. C., Guan, K. L. and Han, J. (2011). Inactivation of Rheb by

- PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nat Cell Biol*, 13(3), pp. 263–272.
113. Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W. and Kaelin, Jr, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, 18(23), 2893–2904.
114. Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M. and Ellisen, L. W. (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*, 25(14), pp. 5834–5845.
115. DeYoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., SgROI, D. and Ellisen, L. W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev*, 22(2), pp. 239–251.
116. Budanov, A. V. and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3), pp. 451–460.
117. Whitney, M. L., Jefferson, L. S. and Kimball, S. R. (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 379(2), pp. 451–455.
118. Hresko, R. C. and Mueckler, M. (2005). mTOR·RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 280(49), pp. 40406–40416.
119. Garcia-Martinez, J. M. and Alessi, D. R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, 416(3), pp. 375–385.
120. Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J. and Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev Cell*, 11(6), pp. 859–871.

121. Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 127(1), pp. 125–137.
122. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P. and Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 10(3), pp. 457–468.
123. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 14(14), pp. 1296–1302.
124. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A. and Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 6(11), pp. 1122–1128.
125. Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q. et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*, 27(14), pp. 1932–1943.
126. Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X. and Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*, 27(14), pp. 1919–1931.
127. Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. and Hemmings, B. A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 279(39), pp. 41189–41196.
128. Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M. and Manning, B. D. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, 28(12), pp. 4104–4115.
129. Huang, J., Wu, S., Wu, C. L. and Manning, B. D. (2009). Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and

tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res*, 69(15), pp. 6107–6114.

130. Ma, X. M. and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(5), pp. 307–318.

131. Hershey, J. W. (2010). Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. *Braz J Med Biol Res*, 43(10), pp. 920–930.

132. Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N. and Sonenberg, N. (1996). Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*, 15(3), pp. 658–664.

133. Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P. and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123(4), pp. 569–580.

134. Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J*, 23(8), pp. 1761–1769.

135. Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J. W., Blenis, J., Pende, M. and Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J*, 25(12), pp. 2781–2791.

136. Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E. and Pagano, M. (2006). S6K1- and β TRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314(5798), pp. 467–471.

137. Richardson, C. J., Broenstrup, M., Fingar, D. C., Julich, K., Ballif, B. A., Gygi, S. and Blenis, J. (2004). SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol*, 14(17), pp. 1540–1549.

138. Ma, X. M., Yoon, S. O., Richardson, C. J., Julich, K. and Blenis, J. (2008). SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, 133(2), pp. 303–313.

139. Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R. and Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J*, 20(16), pp. 4370–4379.
140. Abe, Y., Yoon, S. O., Kubota, K., Mendoza, M. C., Gygi, S. P. and Blenis, J. (2009). p90 ribosomal S6 kinase and p70 ribosomal S6 kinase link phosphorylation of the eukaryotic chaperonin containing TCP-1 to growth factor, insulin, and nutrient signaling. *J Biol Chem*, 284(22), pp. 14939–14948.
141. Wilson, K. F., Wu, W. J. and Cerione, R. A. (2000). Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J Biol Chem*, 275(48), pp. 37307–37310.
142. Ferrari, S., Bandi, H. R., Hofsteenge, J., Bussian, B. M., Thomas, G. (1991). Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 266(33), pp. 22770–22775.
143. Wilson, K. F., Fortes, P., Singh, U. S., Ohno, M., Mattaj, I. W., Cerione, R. A. (1999). The nuclear capbinding complex is a novel target of growth factor receptor-coupled signal transduction. *J Biol Chem*, 274(7), pp. 4166–4173.
144. Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., et al. (2003). 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*, 23(23), pp. 8862–8877.
145. McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Dorfman, A. L., Longnus, S., Pende, M., Martin, K. A., Blenis, J. et al. (2004). Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 24(14), pp. 6231–6240.
146. Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., et al. (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-

activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol*, 24(8), pp. 3112–3124.

147. Meyuhas, O. (2008). Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int Rev Cell Mol Biol*, 268, pp. 1–37.

148. Ruvinsky, I., Katz, M., Drazan, A., Gielchinsky, Y., Saada, A., Freedman, N., Mishani, E., Zimmerman, G., Kasir, J. and Meyuhas, O. (2009). Mice deficient in ribosomal protein S6 phosphorylation suffer from muscle weakness that reflects a growth defect and energy deficit. *PLoS ONE*, 4(5), e5618.

149. Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., et al. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 19(18), pp. 2199–2211.

150. Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leever, S., Griffiths, J. R., Chung, Y. L. and Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab*, 8(3), pp. 224–236.

151. Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109(9), pp. 1125–1131.

152. Duvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2), pp. 171–183.

153. Owen, J.L., Zhang, Y., Bae, S.-H., Farooqi, M.S., Liang, G., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2012). Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(40), pp. 16184–16189.

154. Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., and Sabatini, D.M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), pp. 408–420.

155. Han, J., Li, E., Chen, L., Zhang, Y., Wei, F., Liu, J., Deng, H., and Wang, Y. (2015). The CREB coactivator CRTC2 controls hepatic lipid metabolism by regulating SREBP1. *Nature*, 524(7564), pp. 243–246.
156. Lee, G., Zheng, Y., Cho, S., Jang, C., England, C., Dempsey, J. M., Yu, Y., et al. (2017). Post-transcriptional Regulation of De Novo Lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 Signaling. *Cell*, 171(7), pp. 1545-1558.
157. Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C. and Thomas, G. (1999). Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science*, 285(5436), pp. 2126–2129.
158. Deng, H., Hershenson, M. B., Lei, J., Bitar, K. N., Fingar, D. C., Solway, J. and Bentley, J. K. (2010). p70 Ribosomal S6 kinase is required for airway smooth muscle cell size enlargement but not increased contractile protein expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42(6), pp. 744–752.
159. Pende, M., Kozma, S. C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B. and Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*, 408(6815), pp. 994–997.
160. Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C. and Blenis, J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 24(1), pp. 200–216.
161. Dowling, R. J., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M. and Sonenberg, N. (2007). Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res*, 67(22), pp. 10804–10812.
162. Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., et al. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 431(7005), pp. 200–205.
163. Shah, O. J., Wang, Z., Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol*, 14(18), pp. 1650–1656.

164. Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*, 166(2), pp. 213–223.
165. Tremblay, F., Brule, S., Hee Um, S., Li, Y., Masuda, K., Roden, M., Sun, X. J., Krebs, M., Polakiewicz, R. D., Thomas, G. and Marette, A. (2007). Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(35), pp. 14056–14061.
166. Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P. M., et al. (2000). A Rapamycin-Sensitive Pathway Down-Regulates Insulin Signaling via Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Insulin Receptor Substrate-1. *Mol Endocrinol*, 14(6), pp. 783–794.
167. Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C. et al. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*, 118(9), pp. 3065–3074.
168. Liu, Q., Thoreen, C., Wang, J., Sabatini, D. and Gray, N. S. (2009). mTOR mediated anti-cancer drug discovery. *Drug Discovery Today Ther Strateg*, 6(2), pp. 47–55.
169. Holz, M. K. and Blenis, J. (2005). Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 280(28), pp. 26089–26093.
170. Chiang, G. G. and Abraham, R. T. (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*, 280(27), pp. 25485–25490.
171. Dibble, C. C., Asara, J. M. and Manning, B. D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*, 29(21), pp. 5657–5670.
172. Julien, L. A., Carriere, A., Moreau, J. and Roux, P. P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol*, 30(4), pp. 908–921.

173. Treins, C., Warne, P. H., Magnuson, M. A., Pende, M. and Downward, J. (2010). Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene*, 29(7), pp. 1003–1016.
174. Boulbes, D., Chen, C. H., Shaikenov, T., Agarwal, N. K., Peterson, T. R., Addona, T. A., Keshishian, H., Carr, S. A., Magnuson, M. A., Sabatini, D. M. and Sarbassov, D. D. (2010). Rictor phosphorylation on the Thr-1135 site does not require mammalian target of rapamycin complex 2. *Mol Cancer Res*, 8(6), pp. 896–906.
175. Yu, Y., Yoon, S. O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X. M., Villen, J., Kubica, N., Hoffman, G. R., Cantley, L. C., Gygi, S. P. and Blenis, J. (2011). Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science*, 332(6035), pp. 1322–1326.
176. Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., Lim, D., Peterson, T. R., Choi, Y., Gray, N. S., Yaffe, M. B. et al. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332(6035), pp. 1317–1322.
177. Peng, T., Golub, T. R. and Sabatini, D. M. (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol Cell Biol*, 22(15), pp. 5575–5584.
178. Cunningham, J. T., Rodgers, J. T., Arlow, D. H., Vazquez, F., Mootha, V. K. and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature*, 450(7170), pp. 736–740.
179. Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S. et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2), pp. 171–183.
180. de Groot, R. P., Ballou, L. M. and Sassone-Corsi, P. (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell*, 79(1), pp. 81–91.

181. Zhang, H. H., Lipovsky, A. I., Dibble, C. C., Sahin, M. and Manning, B. D. (2006). S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell*, 24(2), pp. 185–197.
182. Carnevalli, L. S., Masuda, K., Frigerio, F., Le Bacquer, O., Um, S. H., Gandin, V., Topisirovic, I., Sonenberg, N., Thomas, G. and Kozma, S. C. (2010). S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 18(5), pp. 763–774.
183. Yeh, W. C., Bierer, B. E. and McKnight, S. L. (1995). Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(24), pp. 11086–11090.
184. Zhang, H. H., Huang, J., Duvel, K., Boback, B., Wu, S., Squillace, R. M., Wu, C. L. and Manning, B. D. (2009). Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE*, 4(7), e6189.
185. Harada, H., Andersen, J. S., Mann, M., Terada, N. and Korsmeyer, S. J. (2001). p70 S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(17), pp. 9666–9670.
186. Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D., Korsmeyer, S. J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, 3(4), pp. 413-422.
187. Malik, R. K., Parsons, J. T. (1996). Integrin-dependent activation of the p70 ribosomal S6 kinase signaling pathway. *J Biol Chem*, 271(47), 29785-29791.
188. Chou, M. M., Blenis, J. (1996). The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell*, 85(4), pp. 573-583.
189. Berven, L. A., Willard, F. S., Crouch, M. F. (2004). Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res*, 296(2), pp. 183-195.
190. Liu, L., Li, F., Cardelli, J. A., Martin, K. A., Blenis, J. and Huang, S. (2006). Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways. *Oncogene*, 25(53), pp. 7029–7040.

191. Heath, J. P. (1983). Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface. *J Cell Sci*, 60, pp. 331-54.
192. Lai, K. P., Leong, W. F., Chau, J. F., Jia, D., Zeng, L., Liu, H., He, L., Hao, A., Zhang, H., Meek, D. et al. (2010). S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response. *EMBO J*, 29(17), pp. 2994–3006.
193. Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J. and Warren, S. T. (2008). 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*, 283(27), pp. 18478–18482.
194. Hoeffler, C. A. and Klann, E. (2010). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*, 33(2), pp. 67–75.
195. Dann, S. G., Selvaraj, A. and Thomas, G. (2007). mTOR complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends Mol Med*, 13(6), pp. 252–259.
196. Aguilar, V., Alliouachene, S., Sotiropoulos, A., Sobering, A., Athea, Y., Djouadi, F., Miraux, S., Thiaudiere, E., Foretz, M., Viollet, B. et al. (2007). S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. *Cell Metab*, 5(6), pp. 476–487.
197. Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C. M. and Kandror, K. V. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes*, 59(4), pp. 775–781.
198. Soliman, G. A., Acosta-Jaquez, H. A. and Fingar, D. C. (2010). mTORC1 inhibition via rapamycin promotes triacylglycerol lipolysis and release of free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids*, 45(12), pp. 1089–1100.
199. Blouet, C., Ono, H. and Schwartz, G. J. (2008). Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab*, 8(6), pp. 459–467.

200. Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C. and Seeley, R. J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312(5775), pp. 927–930.
201. Mori, H., Inoki, K., Munzberg, H., Opland, D., Faouzi, M., Villanueva, E. C., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., MacDougald, O. A., Myers, Jr, M. G. and Guan, K. L. (2009). Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance. *Cell Metab*, 9(4), 362–374.
202. Myers, Jr, M. G., Leibel, R. L., Seeley, R. J. and Schwartz, M. W. (2010). Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab*, 21(11), pp. 643–651.
203. Couch, F. J., Wang, X. Y., Wu, G. J., Qian, J., Jenkins, R. B., James, C. D. (1999). Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res*, 59(7), pp. 1408-1411.
204. Bärlund, M., Monni, O., Kononen, J., Cornelison, R., Torhorst, J., Sauter, G., Kallioniemi, OLLI-P., Kallioniemi, A. (2000). Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res*, 60(19), 5340-5344.
205. Bärlund, M., Forozan, F., Kononen, J., Bubendorf, L., Chen, Y., Bittner, M. L., Torhorst, J., Haas, P., Bucher, C., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A. (2000). Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*, 92(15), pp. 1252-1259.
206. Monni, O., Barlund, M., Mousses, S., Kononen, J., Sauter, G., Heiskanen, M., Paavola, P., Avela, K., Chen, Y., Bittner, M. L., Kallioniemi, A. (2001). Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(10), pp. 5711-5716.
207. Gil, E. M. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 40(7), pp. 862-871.
208. Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F., Wang, B. (2016). Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*, 16(5), pp. 335-343.

209. Khotchkaya, Y. B., Goverdhan, A., Shen, J., Ponz-Sarvise, M., Chang, S. S., Hsu, M. C., Wei, Y., et al. (2014). S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer. *Am J Transl Res*, 6(4), pp. 361-376.
210. Wang, X., Yao, J., Wang, J., Zhang, Q., et al. (2017). Targeting Aberrant p70S6K Activation for Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer Prevention. *Cancer Prev Res*, 10(11), pp. 641-650.
211. Amaral, C. L., Freitas, L. B., Tamura, R. E., Tavares, M. R., et al. (2016). S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 16, p. 602.
212. Chen, B., Yang, L., Zhang, R., Gan, Y., Zhang, W., et al. (2017). Hyperphosphorylation of RPS6KB1, rather than overexpression, predicts worse prognosis in non-small cell lung cancer patients. *PLoS ONE*, 12(8), e0182891.
213. Fan, W., Wang, W., Mao, X., Chu, S., Feng, J., et al. (2017). Elevated levels of p-Mnk1, p-eIF4E and p-p70S6K proteins are associated with tumor recurrence and poor prognosis in astrocytomas. *J Neurooncol*, 131(3), pp. 485-493.
214. Cao, G. D., Xu, X. Y., Zhang, J. W., Chen, B., Xiong, M. M. (2016). Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin p-mTOR Is a Favorable Prognostic Factor than mTOR in Gastric Cancer. *PLoS ONE*, 11(12), e0168085.
215. Li, S. H., Chen, C. H., Lu, H. I., Huang, W. T., Tien, W. Y., et al. (2015). Phosphorylated p70S6K expression is an independent prognosticator for patient with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*, 157(3), pp. 570-580.
216. Populo, H., Lopes, J. M., Soares, P. (2012). The mTOR signalling bpathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 13(2), pp. 1886-1918.
217. Riemenschneider, M. J., Betensky, R. A., Pasedag, S. M., Louis, D. N. (2006). AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Res*, 66(11), pp. 5618-5623.
218. Ismail, H. M. (2012). Overexpression of s6 kinase 1 in brain tumours is associated with induction of hypoxia-responsive genes and predicts patients' survival. *J Oncol*, 20(12):416927.

219. Cai, D. X., James, C. D., Scheithauer, B. W., Couch, F. J., Perry, A. (2001). PS6K amplification characterizes a small subset of anaplastic meningiomas. *Am J Clin Pathol*, 115(2), pp. 213-218.
220. Lyzogubov, V. V., Usenko, V. S., Khojaenko, Y. S., Lytvyn, D. I., Soldatkina, M. A., Rodnin, N. V., Filonenko, V. V., Pogribniy, P. V. (2003). Immunohistochemical analysis of p70S6 kinase α in human thyroid tissue upon pathology. *Exp Oncol*, 25(4), pp. 304-306.
221. Lytvyn, D. I., Dudchenko, T. M., Lyzogubov, V. V., Usenko, V. S., Nespryadko, S. V., Vinnitskaya, A. B., Vorobyova, L. I., Pal'chevskiy, S. S., Filonenko, V. V., Pogrebnoy, P. V. (2003). Expression of α - and β -isoforms of p70S6 kinase in human endometrial tumors. *Exp Oncol*, 25(4), pp. 274-278.
222. Lyzogubov, V. V., Lytvyn, D. I., Dudchenko, T. M., Lubchenko, N. V., Pogrybniy, P. V., Nespryadko, S. V., Vinnitska, A. B., Usenko, V. S., Gout, I. T., Filonenko, V. V. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 expression in endometrial adenocarcinomas. *Exp Oncol*, 26(4), pp. 287-293.
223. O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., et al. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, 66(3), pp. 1500-1508.
224. Shi, Y., Yan, H., Frost, P., Gera, J., Lichtenstein, A. (2005). Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*, 4(10), pp. 1533-1540.
225. Wan, X., Harkavy, B., Shen, N., Grohar, P., Helman, L. J. (2007). Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*, 26(13), 1932-1940.
226. Wang, X., Yue, P., Kim, Y. A., Fu, H., Khuri, F. R., Sun, S. Y. (2008). Enhancing mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rictor-independent Akt activation. *Cancer Res*, 68(18), pp. 7409-7418.

227. Tamburini, J., Chapuis, N., Bardet, V., Park, S., Sujobert, P., et al. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor 1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*, 111(1), pp. 379-382.
228. Choo, A. Y. and Blenis, J. (2009). Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle*, 8(4), pp. 567–572.
229. Feldman, M. E., Apsel, B., Uotila, A., Loewith, R., Knight, Z. A., Ruggero, D., Shokat, K. M. (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*, 7(2), e38.
230. Yu, K., Toral-Barza, L., Shi, C., Zhang, W. G., Lucas, J., et al. (2009). Biochemical, cellular, and in vivo activity of novel ATP-competitive and selective inhibitors of the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res*, 69(15), pp. 6232-6240.
231. Fan, Q. W., Knight, Z. A., Goldenberg, D. D., Yu, W., Mostov, K. E., Stokoe, D., Shokat, K. M., Weiss, W. A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, 9(5), pp. 341-349.
232. Li, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(8), pp.3441–3446.
233. Shioi, T., McMullen, J. R., Tarnavski, O., Converso, K., Sherwood, M. C., Manning, W. J. and Izumo, S. (2003). Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*, 107(12), pp. 1664–1670.
234. Chen, J. K., Chen, J., Neilson, E. G. and Harris, R. C. (2005). Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol*, 16(5), pp. 1384–1391.
235. Chen, J. K., Chen, J., Thomas, G., Kozma, S. C. and Harris, R. C. (2009). S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297(3), F585–F593.

236. Fontana, L., Partridge, L. and Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*, 328(5976), pp. 321–326.
237. Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12(9), pp. 814–822.
238. Madeo, F., Tavernarakis, N. and Kroemer, G. (2010). Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol*, 12(9), pp. 842–846.
239. Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), pp. 124–131.
240. Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S. et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460(7253), pp. 392–395.
241. Selman, C., Tullet, J. M., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S. J., Choudhury, A. I., Claret, M., Al-Qassab, H., Carmignac, D., Ramadani, F. et al. (2009). Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*, 326(5949), pp. 140–144.
242. Savinska, L. O., Kijamova, R. G., Pogrebnoy, P. V., Ovcharenko, G. V., Gout, I. T., Filonenko, V. V. (2001). Comparative characterization of S6 kinase α and β isoforms expression in mammalian tissues. *Biopolimers and cell*, 17(5), pp. 374-379.
243. Chauvin, C., Koka, V., Nouschi, A., Mieulet, V., Hoareau-Aveilla, C., Dreazen, A., Cagnard, N. et al. (2014). Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*, 33(4), pp. 474-483.
244. Wang, X., Yue, P., Tao, H., Sun, S. Y. (2017). Inhibition of p70S6K does not mimic the enhancement of Akt phosphorylation by rapamycin. *Heliyon*, 3(8), e00378.
245. Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), pp. 1420-1428.
246. Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition – activating transcription factors – multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*, 5(4), pp. 188-195.
247. Gonzalez, D. M., Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 7(344), re8.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. (2017). Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolymers and Cell*, 33(5), pp. 356-366.
2. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Savinska, L. O., Filonenko V. V. (2018). The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 90(4), pp. 25-35.
3. Kravchenko, A. O., Kosach, V. R., Shkarina, K. A., **Zaiets, I. V.**, I.O. Tykhonkova, I. O., Khoruzhenko, A. I. (2018). Optimization of in vitro model for analysis of tumor cell migration dynamics. *Biopolymers and Cell*, 34(6), pp. 477-486.
4. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Filonenko V. V. (2019). Identification of a novel S6K1 splice variant coding for the p60-S6K1 isoform. *Biopolymers and Cell*, 35(2), pp. 99-106.
5. **Zaiets, I. V.**, Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., Smialkovska, V. V., Filonenko, V. V. (2019). p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms. *Ukr Biochem J*, 91(4), pp. 17-25.
6. Holiar, V. V., Gotsulyak, N. Ya., Khoruzhenko, A. I., **Zaiets, I. V.** (2019). Generation and characterization of the MCF-7 cell line with a knockout of a p85-S6K1 isoform of the ribosomal protein S6 kinase 1. *Biopolymers and Cell*, 35(4), pp. 303-312.
7. Tereshchenko, Y. S., Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.** Generation of MCF-7 cell lines with downregulated expression of different S6K1 isoforms. Abstracts of the XII International Young Scientists' Conference, V. N. Karazin Kharkiv

- National University, November 29 – December 1, 2017, Kharkiv, Ukraine, pp. 38-39.
8. Holiar, V. V., Sivchenko, A. S., **Zaiets, I. V.** p60-S6K1 mRNA transcript expression profile in a panel of cell lines and breast cancer tissue samples. Young scientists conference “Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology – 2018”, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, May 23-25, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90(3), p. 115.
 9. Sivchenko, A. S., Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Phosphorylation state of mitogen-regulated sites in the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p60-S6K1, at different cell growth conditions. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. Biopolymers and Cell, 34(2), p. 152.
 10. 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. Materials of XII Annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 2018, Kyiv, Ukraine. Biopolymers and Cell, 34(2), p. 164.
 11. **Zaiets, I. V.**, Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Establishment and characterization of S6K1 isoform-specific knockout HEK-293 cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Poster session II. Biotechnology, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90 (Special Issue), p. 73.
 12. Kosach, V. R., **Zaiets, I. V.**, Khoruzhenko, A. I., Filonenko, V. V. Novel aspects in the regulation of cell motility via S6K1. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference, Symposium V, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J, 90 (Special Issue), p. 23.
 13. Holiar, V. V., **Zaiets, I. V.** Knockout of the ribosomal protein S6 kinase 1 isoform, p85, in the MCF-7 cell line leads to decreased cell growth, survival

and migration. 15th Horizons In Molecular Biology, 10th – 13th September, 2018, Gottingen, Germany, p. 84.

14. **Zaiets, I. V.**, Kosach, V. R., Filonenko, V. V. Selective expression of the p60 ribosomal protein S6 kinase 1 isoform induces an epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells MCF-7. XIII Всеукраїнська конференція молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, 22-25 травня 2019.

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. XII міжнародна конференція молодих учених «Biology: from a molecule up to the biosphere» (Харків, 29 листопада – 1 грудня 2017 р.) – публікація тез.
2. Конференція молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, 23-25 травня 2018 р.) – публікація тез.
3. XII річна конференція молодих учених (Київ, 2018 р.) – публікація тез.
4. Міжнародна конференція «XI Parnas Conference on biochemistry and molecular biology for innovative medicine» (Київ, 3-5 вересня 2018 р.) – постерна доповідь.
5. Міжнародна конференція «XI Parnas Conference on biochemistry and molecular biology for innovative medicine» (Київ, 3-5 вересня 2018 р.) – публікація тез.
6. Міжнародна конференція «15th Horizons In Molecular Biology» (Геттінген, 10-13 вересня 2018 р.) – публікація тез.
7. XIII всеукраїнська конференція молодих учених (Київ, 22-25 травня 2019 р.) – публікація тез.

ДОДАТОК Б

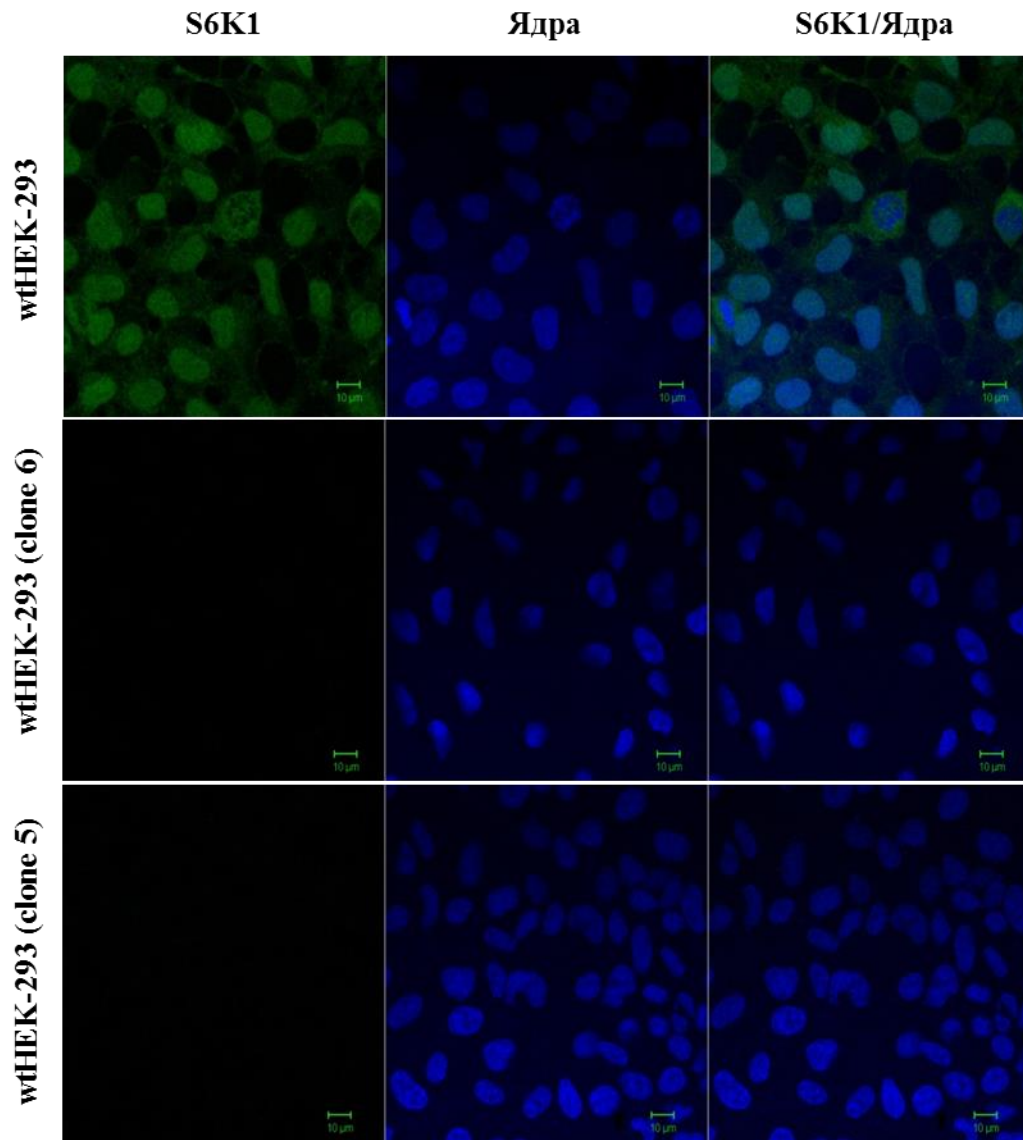
ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ АНАЛІЗ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ НЕК-293 З
ДИФЕРЕНЦІЙНОЮ ЕКСПРЕСІЄЮ ІЗОФОРМ S6K1

Рис. Б1.1. Імунофлуоресцентна детекція S6K1 за допомогою антитіл проти С-кінця S6K1 в клітинах НЕК-293 дикого типу та клонах НЕК-293 (№5 та 6), отриманих після застосування технології CRISPR/Cas9 з метою вимкнути експресію ізоформ р60-, р70- та р85-S6K1.

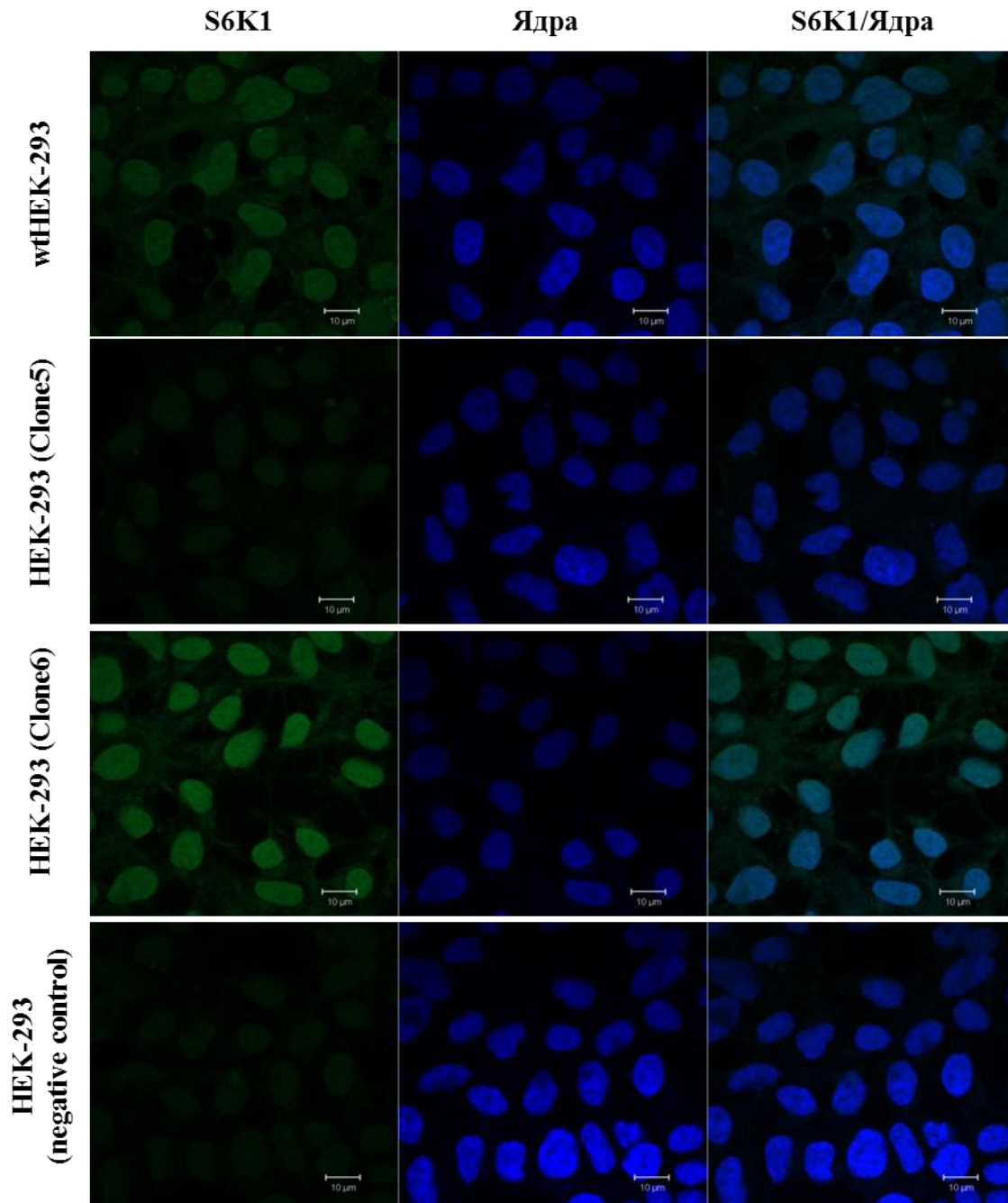


Рис. Б1.2. Імунофлуоресцентний аналіз клітинної лінії $p60^+/p70^-/p85^-$ HEK-293, отриманої за допомогою технології CRISPR/Cas9. Аналіз проводили з використанням антитіл проти С-кінця S6K1. Клітини HEK-293 дикого типу та створений клон 5 (відбулося вимкнення експресії усіх трьох $p60^-$, $p70^-$ та $p85^-$ S6K1 ізоформ) були використані в якості відповідно позитивного та негативного контролю.

ДОДАТОК В

АНАЛІЗ ДИНАМІКИ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ІЗОФОРМИ p60-S6K1 В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЧАСУ В КЛІТИНАХ НЕК-293, ЯКІ СЕЛЕКТИВНО ЕКСПРЕСУЮТЬ p60-S6K1

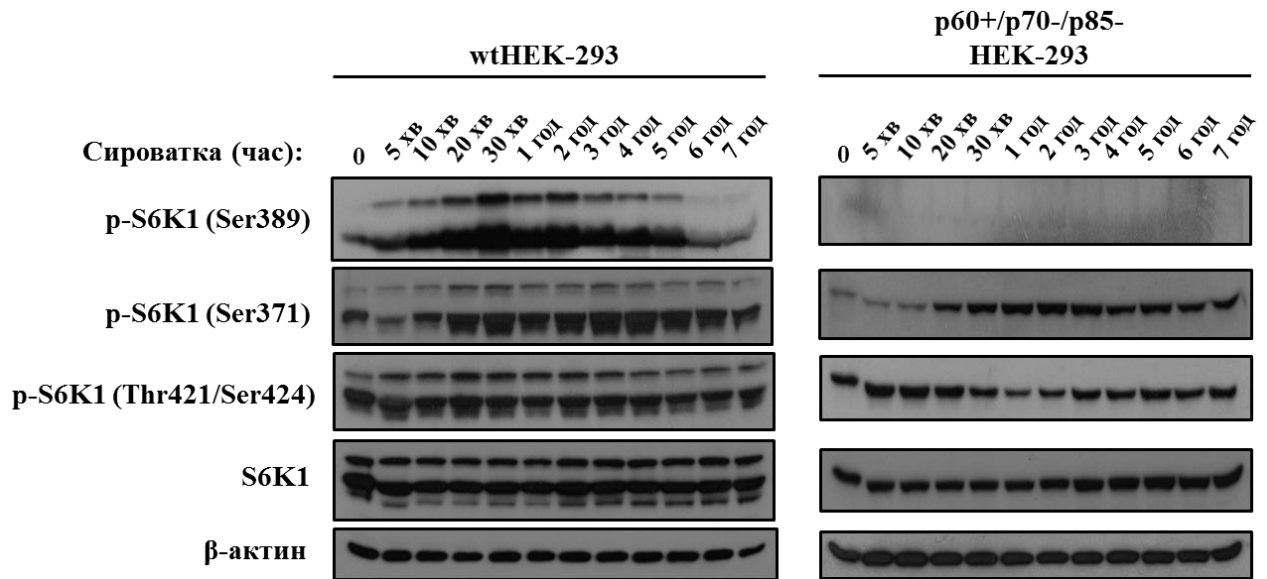


Рис. В1. Ізоформа p60-S6K1 виявляє різну залежну від часу динаміку фосфорилювання в клітинах НЕК-293 за сайтами Ser371 та Thr421/C424 (нумерація сайтів для p70-S6K1) в умовах стимуляції ростовими факторами. Клітини НЕК-293 дикого типу та p60⁺/p70⁻/p85-НЕК-293 підлягали голодуванню у середовищі без сироватки протягом 24 год і потім стимуляції 20% сироваткою протягом зазначених проміжків часу. Динаміку фосфорилювання оцінювали за допомогою вестерн-блоту з використанням зазначених антитіл. Для підтвердження однакового навантаження білкових проб були використані антитіла проти β-актину.