

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



**ГОЦУЛЯК Назарій Ярославович**

УДК 577.218+576.322

**РОЛЬ mTOR-СИГНАЛЬНОЇ МЕРЕЖІ У РЕГУЛЯЦІЇ  
ЛОКОМОТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПУХЛИННИХ КЛІТИН  
ПІД ВПЛИВОМ МІКРООТОЧЕННЯ**

03.00.03 – молекулярна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

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

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

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

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

Захист відбудеться 23 лютого 2021 року о 10:30 на засіданні спеціалізованої  
вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики  
НАН України за адресою: 03143, вул. Заболотного, 150, м. Київ.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою:  
03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150  
(тел. (044) 526-11-69; e-mail: inform@imbg.org.ua).

Автореферат розіслано \_\_ січня 2021 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник



І.В.Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогоднішній день однією з найпоширеніших причин смертності у світі є онкологічні захворювання. Численні дослідження, як сучасні, так і здобутки минулих десятиліть, чітко свідчать про ключову роль порушень у функціонуванні сигнальних систем клітини у процесах ініціації та розвитку пухлинних новоутворень. Перспективність дослідження та поглиблення розуміння молекулярних механізмів функціонування сигнальних систем полягає у очікуваній можливості ефективного використання їхніх ланок як біомаркерів у діагностиці та як безпосередніх мішеней у таргетній хіміо- та імунотерапії при лікуванні онкологічних захворювань.

mTOR-сигнальна мережа – одна з центральних сигнальних систем, порушення у функціонуванні якої призводять до розвитку раку. Ця система присутня у всіх типах клітин ссавців та відповідає за сприйняття клітиною сигналів від низки факторів росту, гормонів та інших сигнальних молекул, а також за трансформацію цього сигналу у регуляції біосинтезу білка та асоційованих з ним процесів. Численні дослідження підтверджують гіперактивацію та гіперекспресію ланок цього сигнального шляху у багатьох злоякісних новоутвореннях, включаючи карциноми молочної залози людини. Центральними елементами mTOR-сигнальної мережі є відповідно кіназа mTOR та один з її основних субстратів – кіназа рибосомального білка S6 (S6K1) (*Sabatini, 2017, Saxton 2017, Aoki et al., 2017, Populo et al., 2012*). Особливий інтерес саме до mTOR/S6K1-сигнальної ланки мережі викликано на сьогоднішній день виявленням та підтвердженням існування нової ізоформи кінази S6K1 – p60S6K1 (*Zaiets et al., 2018*), а також можливістю ефективного блокування функцій окремих ізоформ S6K1, зокрема і p60S6K1, завдяки сучасному розвитку технології редагування геному CRISPR/Cas9 (*Hassan et al., 2019*). Окрім нововиявленої ізоформи, родина кінази S6K1 включає також ізоформи p70S6K1 і p85S6K1, які синтезуються за механізмом трансляції з альтернативних сайтів ініціації, а також p31S6K1, яка синтезується за механізмом альтернативного сплайсингу. Найбільш вивченими на сьогоднішній день є ізоформи p70S6K1 та p85S6K1, які є активними регуляторами низки фізіологічних та патологічних процесів у клітині і мають виразний онкогенний потенціал. Разом з тим, все ж, більшість представлених у літературі досліджень не розділяє функцій кінази S6K1 з розмежуванням функцій специфічних для цих ізоформ (*Sridharan et al., 2020, Tavares et al, 2015, Magnusson et al., 2012*). Відомості нещодавніх попередніх досліджень, зосереджених на p60S6K1, свідчать про наявність онкогенного потенціалу характерного і для цієї ізоформи і, що ще більш цікаво, вказують на можливість, навіть радикально, відмінних її функцій (*Kosach et al., 2020, Zaiets et al. 2019*).

Дана дисертаційна робота присвячена ідентифікації, розмежуванню та характеристиці функцій ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, як елементів mTOR-сигнальної мережі, у процесі сприйняття сигналів генерованих пухлинним мікрооточенням та їх трансформації у регуляції рухливості пухлинних клітин.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано у відповідності з планами наукових досліджень відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та у зв'язку з темами наукових досліджень: «Особливості функціонування mTOR-залежних сигнальних шляхів: множинність ізоформ mTOR та регуляція метаболічних процесів в клітині» (номер державної реєстрації – 0110U000692, 2011-2015 рр.), «Створення та характеристика клітинної моделі на основі співкультивування пухлинних та стромальних клітин для оцінки ефективності впливу протипухлинних засобів» (номер державної реєстрації – 0115U001403, 2015-2019 рр.), «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.), «З'ясування особливостей регуляції експресії генів та характеристика нових молекулярних маркерів злоякісних новоутворень» (номер державної реєстрації – 0117U002123, 2017-2019 рр.), «Характеристика нових молекулярно-генетичних маркерів злоякісних новоутворень людини для діагностики онкологічних захворювань, оцінки метастатичного потенціалу та чутливості пухлин до хіміотерапії» (номер державної реєстрації – 0120U100648, 2020-2021 рр.), а також у зв'язку з проектом за конкурсом науково-дослідних робіт молодих учених НАН України на тему: «Роль p60 ізоформи кінази S6K1 в індукції епітеліально-мезенхімального переходу у клітинах раку молочної залози», 2019-2020 рр.

**Мета дослідження** – з'ясувати участь mTOR-сигнальної мережі у регуляції рухливості пухлинних клітин під впливом фібробластів мікрооточення з виокремленням функцій ізоформ кінази S6K1.

#### **Завдання дослідження:**

1. Проаналізувати вплив молекул паракринної сигналізації продукованих фібробластами на активність елементів mTOR/S6K1-сигнальної ланки у пухлинних клітинах лінії MCF-7.
2. Охарактеризувати функціональний стан mTOR-сигнальної мережі у клітинних лініях із нокдауном окремих ізоформ S6K1.
3. Модифікувати модель «раневої поверхні» для можливості вимірювання рухливості клітин в умовах співкультивування.
4. Проаналізувати вплив фібробластів на міграційні властивості клітин MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 на моделях двовимірної та тривимірної міграції.
5. Проаналізувати профіль експресії білків клітинної адгезії, механорецепції, цитоскелету та міжклітинних контактів у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1.

**Об'єкт дослідження** – молекулярні механізми функціонування mTOR-сигнальної мережі у клітинах аденокарциноми молочної залози людини.

**Предмет дослідження** – функціональна здатність mTOR/S6K1-сигнальної ланки до регуляції клітинної рухливості та сприйняття паракринної сигналізації генерованої нормальним пухлинним мікрооточенням.

**Методи дослідження** – молекулярно-біологічні, біохімічні, клітинно-біологічні, зокрема: культивування та співкультивування ліній клітин людини (дво- та тривимірне), отримання первинної культури фібробластів людини, ПЛР-тестування на контамінацію клітинної культури мікоплазмами, електрофоретичне розділення білків, імуноблот аналіз, денситометричний аналіз блотограм, імунофлюоресцентний аналіз, світлова та конфокальна мікроскопія, формування та стандартизація багатоклітинних сфероїдів, морфометричний аналіз багатоклітинних сфероїдів, вимірювання міграційної активності клітин на моделі «раневої поверхні» та моделі «реверсії багатоклітинного сфероїда».

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, здатність mTOR/S6K1-сигнальної ланки у клітинах раку молочної залози сприймати та опосередковувати вплив молекул паракринної сигналізації фібробластів. Продемонстровано здатність дермальних фібробластів паракринно посилювати активність міграції клітин раку молочної залози у двовимірних та тривимірних умовах, за одностороннього впливу та двосторонньої взаємодії, а також залучення до регуляції цієї активації mTOR/S6K1-сигнальної ланки. Показано, що дія молекул паракринної сигналізації, продукованих фібробластами може нейтралізувати ефект рапаміцину на рухливість пухлинних клітин. Продемонстровано здатність дермальних фібробластів обмежувати активність міграції клітин раку молочної залози за умов прямої фізичної взаємодії у тривимірних умовах. Встановлено залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 та відмінності їхніх ролей у регуляції клітинної рухливості під впливом паракринної сигналізації фібробластів; у підтриманні нормальної морфології клітин раку молочної залози, здатності до самоорганізації у просторі у вигляді багатоклітинних сфероїдів та реалізації стратегій клітинної міграції; у регуляції активності елементів PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху – кіназ АКТ, GSK-3 $\beta$  та eEF2K, регуляції ступеню фосфорилування білків S6, RAPTOR та потенційних білків-мішеней кінази АКТ, активності регулятора ремоделювання актинового цитоскелету – кінази FAK, активності експресії білків цитоскелету –  $\beta$ -актину та гістіоспецифічних – цитокератинів і віментину, експресії білка щільних контактів – ZO-1, експресії молекул адгезії / білків-механорецепторів – CD29 та CD44, експресії молекул клітинної адгезії – CD326, CD227 та CD66e. Розроблено та адаптовано модифікацію моделі «раневої поверхні», що уможливорює вимірювання з її використанням міграційної активності клітин за умов співкультивування.

**Практичне значення одержаних результатів.** Ідентифікація нових функціональних зв'язків mTOR/S6K1-сигнальної ланки у клітинах раку молочної залози та у пухлино-стромальній взаємодії поглиблює розуміння її ролі у процесах ініціації, розвитку та метастазування злоякісного новоутворення загалом та раку молочної залози зокрема, а також дозволяє подальше більш глибоке вивчення функціонування цієї ланки у нормі та патології. Отримані результати дають підставу розглядати S6K1, як ключовий компонент системи регуляції рухливості клітин раку молочної залози паракринною сигналізацією фібробластів мікрооточення. Це може бути

важливим при експериментальному моделюванні пухлинного росту чи розробці стратегій ефективної терапії раку. Крім того, продемонстрована виразна та багатогранна участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції клітинної рухливості та пухлино-стромальної взаємодії дозволяє розглядати їх у якості перспективних мішеней таргетної терапії раку. Адаптована та апробована у даній роботі модель раневої поверхні може бути застосована як для дослідження базових механізмів канцерогенезу, так і для розробки протипухлинних препаратів з урахуванням гетеротипових паракринних взаємодій. Результати дисертаційної роботи рекомендовано до використання при підготовці лекційних та практичних занять студентів університетів, що навчаються за спеціальностями «Біохімія», «Молекулярна біологія», «Біотехнологія» у складі загального курсу «Молекулярна біологія клітини» та спецкурсу «Сигнальні механізми клітин».

**Особистий внесок здобувача.** Всі дослідження представлені у дисертаційній роботі було виконано особисто або за безпосередньої участі здобувача. Пошук, аналіз та систематизацію наукової літератури за темою дослідження, ведення клітинних культур, переважну більшість експериментів, а також обробку, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів було виконано особисто здобувачем. Головна ідея, мета та завдання дослідження були сформульовані спільно з науковим керівником к.б.н., с.н.с. Хоруженко А. І. Первинну культуру нормальних дермальних фібробластів людини було отримано спільно з к.б.н., с.н.с. Хоруженко А. І. та Шкаріною К. А. Відпрацювання методики формування багатоклітинних сфероїдів клітин MCF-7, імунофлюоресцентний аналіз та конфокальну мікроскопію проведено спільно з к.б.н., с.н.с. Хоруженко А. І. та к.б.н., н.с. Косач В. Р. Всі спільно отримані результати обговорено та опубліковано у спільних наукових публікаціях. Здобувач висловлює подяку д.б.н., проф. В. В. Філоненку за допомогу у розробці стратегій досліджень та корисне обговорення отриманих результатів, а також к.б.н., м.н.с. Зайцю І. В. та к.б.н., н.с. Косач В. Р. за надані генетично-модифіковані, за допомогою технології CRISPR/Cas9, стабільні клітинні лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1. Особливу подяку здобувач висловлює науковому керівнику к.б.н., с.н.с. А. І. Хоруженко за керівництво, підтримку, корисні поради і зауваження під час проведення дисертаційної роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації було апробовано на засіданнях відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Результати досліджень було також представлено та обговорено на 7-ми фахових наукових конференціях: Quantissue Meeting 2013 “Computational approaches to networks, cells and tissues” (Barcelona, Spain, 10-11 April 2013), XIII International Scientific Conference of Young Scientist “Shevchenkivska Vesna: Life Sciences” (Kyiv, Ukraine, 1-3 April 2015), конференція-конкурс молодих учених присвячена 110-річчю з дня народження академіка НАН України Максима Федотовича Гулого «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015» (Київ, Україна, 23-24 квітня 2015 р.), Ukrainian Society of Cell Biology International Conference “Advances in cell biology and biotechnology” (Lviv, Ukraine, 11-13 October 2015), науково-

практична конференція «Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах» (Київ, Україна, 22-23 жовтня 2015 р.), II Scientific and Practical Internet Conference with international participation “Mechanisms of development of pathological processes and their pharmacological correction” (Kharkiv, Ukraine, 21 November 2019), XIV International Young Scientist’s Conference “Biology: From A Molecule up to the biosphere” (Kharkiv, Ukraine, 27-29 November 2019).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них – 5 статей у фахових журналах, які рекомендовані МОН України і входять до наукометричної бази даних Scopus та 7 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та вітчизняних 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 та списку використаних джерел, який охоплює 128 найменувань. Дисертацію викладено на 146 сторінках стандартного машинописного тексту, вона містить 27 рисунків і 3 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Огляд літератури

В огляді літератури узагальнено сучасні відомості про механізми функціонування mTOR-сигнальної мережі та її центральних ланок – кінази mTOR та ізоформ кінази S6K1. Приведено доступні у літературі дані, що наводять на можливість залучення mTOR-сигналізації до регуляції клітинної рухливості. Описано місце фібробластів у пухлинному мікрооточенні та можливості їхнього впливу на mTOR-сигналізацію. Окрему увагу приділено традиційним та класичним способам моделювання пухлино-стромальної взаємодії та клітинної міграції *in vitro*.

### Матеріали та методи досліджень

**Культивування клітин.** Клітини культивували у поживному середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко та збагаченому 10%-м вмістом ембріональної бичачої сироватки, 2 мМ – L-глутаміну, 50 од/мл – пеніциліну та 0,50мкг/мл – стрептоміцину. Первинну культуру дермальних фібробластів людини виділяли з післяопераційного матеріалу експлантатним методом. Кондиціонування середовища дермальними фібробластами проводили протягом 24 годин за стандартних умов культивування.

**Співкультивування клітин.** Розробка методу висаджування та співкультивування двох типів клітин, що уможливорює вимірювання їхньої міграційної активності на моделі «раневої поверхні» – один зі здобутків дисертаційної роботи. Співкультивування організували шляхом почергового висаджування та розмежованого на ростовій поверхні культивування клітин різного типу. Першими на периферію ростової поверхні висаджували дермальні фібробласти, наступними на центральну частину ростової поверхні висаджували клітини MCF-7. Співкультивування ж на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда організували безпосередньо в експериментальних

умовах шляхом висаджування багатоклітинних сфероїдів утворених клітинами клітин MCF-7 на конфлюентний моношар дермальних фібробластів.

**Вимірювання швидкості міграції клітин на моделі «раневої поверхні».**

Клітини культивували/співкультивували до формування ними конфлюентного моношару, розділяли його, фотофіксували та вимірювали відстані між позиціями клітинних фронтів до та після 24-годинного культивування. Швидкість міграції клітин вимірювали як відстань, яку вони подолали у складі клітинного фронту.

**Формування багатоклітинних сфероїдів стандартизованого розміру.**

Клітини, висаджені у кількості 12700/см<sup>2</sup>, культивували на 1% агарозному гелі протягом 72 год. Утворені сфероїди розділяли за розміром шляхом подвійного фільтрування суспензії з ними та відбирали сфероїди діаметром 70-100 мкм.

**Вимірювання швидкості міграції клітин на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда.**

Стандартизовані за розміром багатоклітинні сфероїди висаджували на адгезивну ростову поверхню Позиції 50-ти прикріплених сфероїдів та позиції моношарових колоній утворених внаслідок їхньої реверсії після 24-годинного культивування/співкультивування фотофіксували і вимірювали на мікрофотографіях зайняту кожним сфероїдом/колонією площу. Швидкість міграції клітин вимірювали як площу, яку вони зайняли у процесі реверсії сфероїда.

**Імуноблот аналіз.** Лізис клітин здійснювали у адаптованому буфері «Radioimmunoprecipitation assay buffer». Концентрацію білка у лізатах визначали за методом Бредфорда. Клітинні білки розділяли за допомогою ступінчастого денатуруючого електрофорезу у поліакриламідному гелі та тригліциновому буфері за методом Лемлі та переносили на полівінілденфторидну мембрану у буфері Тоубіна. Вибрані білки імунодетектували із використанням комерційних антитіл до вибраних білків, а також антитіл кон'югованих з пероксидазою хрому. Імунодетектований білок візуалізували на мембрані за допомогою реакції посиленої хемілюмінесценції.

**Імунофлюоресцентна реакція.** Клітини культивували на покривному цитологічному склі, фіксували 10%-м формаліном та пермеабілізували мембрану клітин 0,2%-м розчином детергента «Triton X100», пригнічували аутофлюоресценцію розчином 10 мМ купрум (II) сульфату та 50 мМ амоній ацетату. Сайти неспецифічного зв'язування блокували 1%-м розчином бичачого сироваткового альбуміну. Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом 12 год за +4°C. Інкубацію з вторинними антитілами, мічені флюоресцентною міткою проводили протягом 1 год за 37°C. Мікропрепарати герметизували у середовищі «Mowiol 4-88» та аналізували за допомогою флюоресцентної або конфокальної мікроскопії.

**Статистичний аналіз.** Кожен експеримент повторювали не менш, ніж тричі. Результати експериментів подавали у вигляді середнього арифметичного зі стандартним квадратичним відхиленням. Достовірність відмінностей між двома незалежними вибірками даних оцінювали за допомогою двовибіркового t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали статистично достовірними за значень  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  та  $p < 0,005$ .



## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Реакція білків mTOR/S6K1-сигнальної ланки пухлинних клітин на паракринний вплив фіброblastів мікрооточення.** Для ідентифікації mTOR-сигнальної мережі як одного з молекулярних механізмів впливу стромальних клітин на поведінку пухлинних у даній роботі було описано функціональний стан mTOR/S6K1-сигнальної ланки у клітинах MCF-7, що перебували під впливом молекул паракринної сигналізації продукованих дермальними фіброblastами. Результати імуноблот аналізу з детекцією активованих форм ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, її основного регулятора – кінази mTOR та її субстрата – білка S6 (Рис. 1) продемонстрували підвищення вмісту цих білків внаслідок впливу на клітину кондиціонованого середовища (КС) фіброblastів, а отже здатність mTOR/S6K1-сигнальної ланки до сприйняття та передачі сигналів мікрооточення.

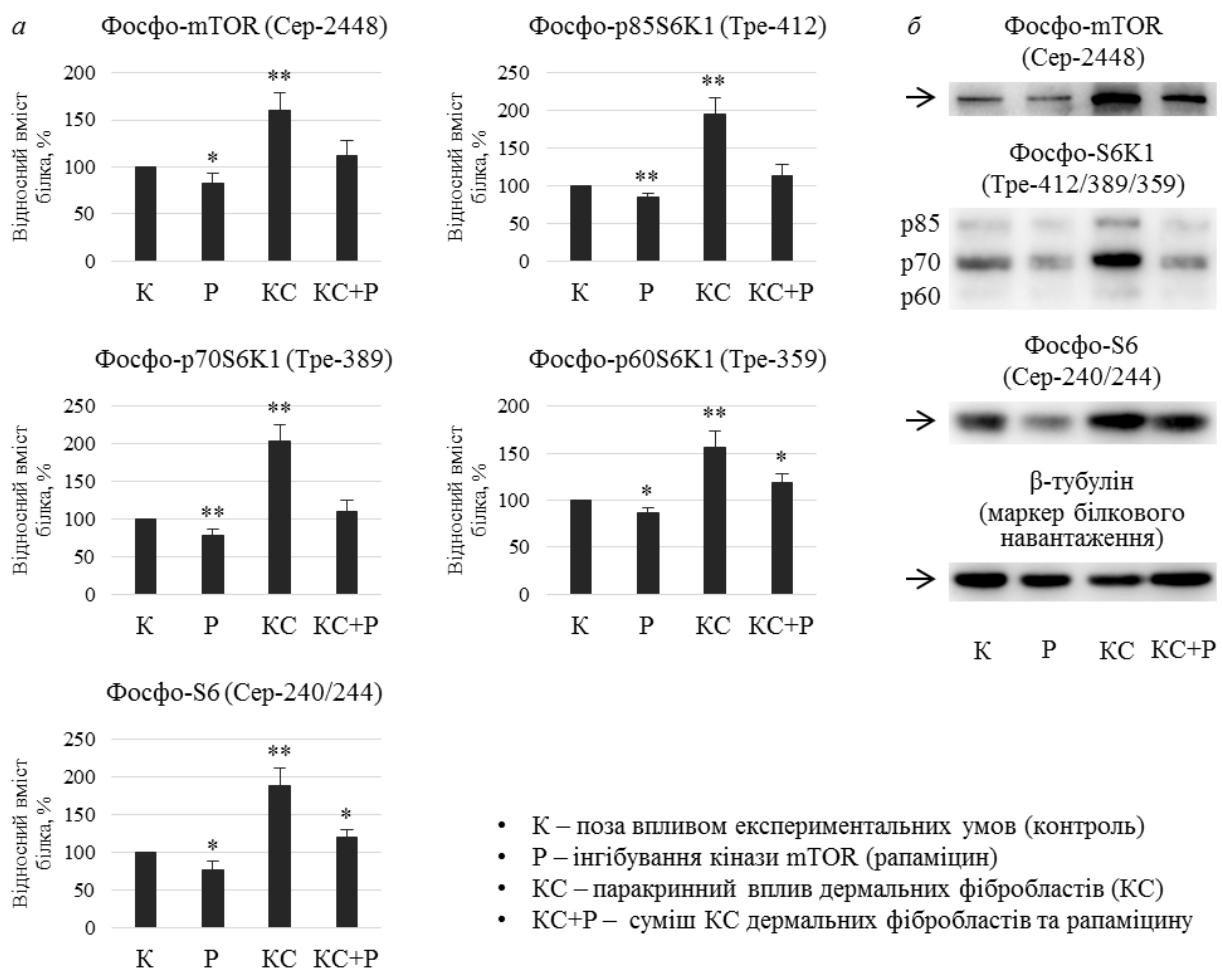


Рис. 1. Активність елементів mTOR/S6K1-сигнальної ланки – кінази mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та рибосомального білка S6 – у клітинах лінії MCF-7 під впливом паракринної сигналізації дермальних фіброblastів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 нМ рапаміцину) та синхронної дії цих факторів (суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином) за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст фосфорильованих активних форм білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 поза впливом експериментальних умов: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$

Також було виявлено, що додавання рапаміцину (специфічного інгібітора кінази mTOR) до КС фіброblastів суттєво знижувало вміст активованих форм

цих білків, послаблюючи і нівелюючи його ефект на активність mTOR/S6K1-сигнальної ланки. При цьому активність все ж не знижувалася до рівня, що спостерігався при окремій дії рапаміцину. Характер відповіді активованої сигнальної ланки на КС та рапаміцин загалом узгоджується з сучасними відомостями про її функціонування.

**Застосування стабільних клітинних ліній MCF-7 з редагованою за допомогою CRISPR/Cas9 експресією ізоформ кінази S6K1.** Для можливості розмежування та дослідження функцій окремих елементів mTOR/S6K1-сигнальної ланки – ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 було використано блокування експресії, а отже функцій окремих ізоформ та порівняльний аналіз його наслідків для фенотипу клітин. У роботі було використано стабільні клітинні лінії із редагованою експресією ізоформ S6K1: MCF-7 p85-/p70+/p60+ (далі – «M-1») – з нокдауном лише ізоформи p85S6K1; MCF-7 p85-/p70-/p60+ (далі – «M-2») – з нокдауном p85S6K1 та p70S6K1, але активною p60S6K1; та MCF-7 p85-/p70-/p60- (далі – «M-3») із пригніченою експресією одразу трьох ізоформ – p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. Підтвердження ефективності модифікацій цих клітин було виконано за допомогою імуноблот аналізу з використанням антитіл до наявної у всіх цих ізоформ С-кінцевої ділянки молекули (Рис. 2).

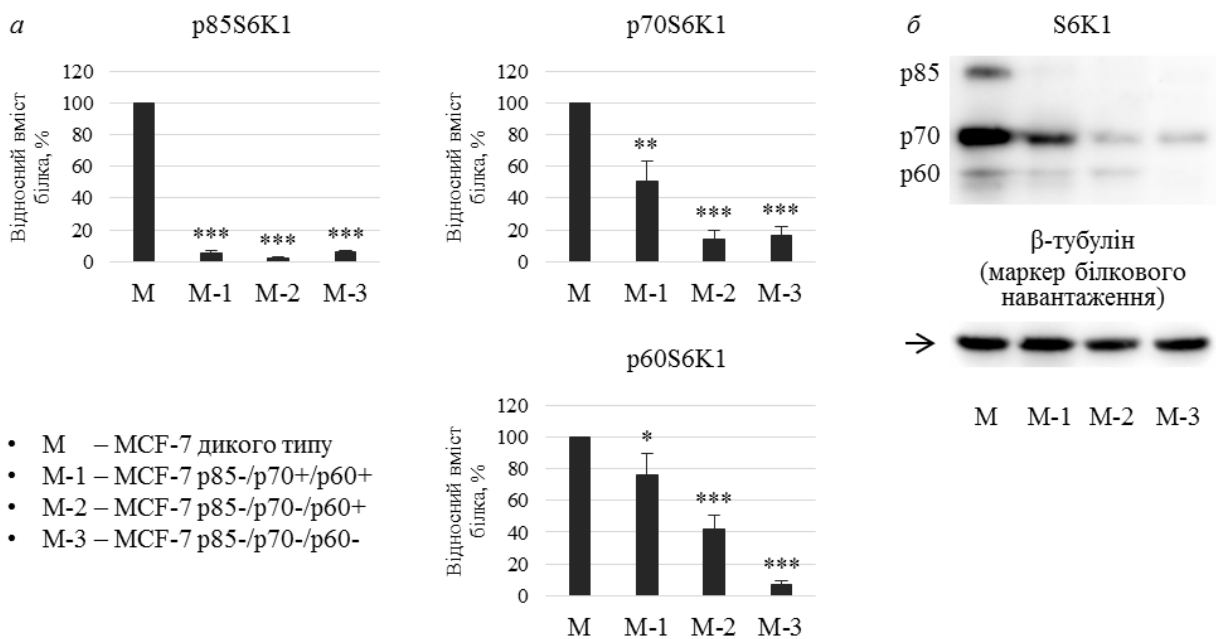


Рис. 2. Рівні експресії p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 ізоформ кінази S6K1 у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

**Залучення ізоформ кінази S6K1 до регуляції функціонування mTOR-сигнального шляху.** Для оцінки активності ізоформ S6K1 у генетично-модифікованих клітинах та встановлення залучення кожної з них до вже відомих функціональних контактів описаних для кінази S6K1 в цілому було проведено імуноблот аналіз з детекцією вмісту у клітинах фосфорильованих

форм основних субстратів S6K1 – рибосомального білка S6 та еукаріотичної кінази елонгаційного фактора 2 (eEF2K) (Рис. 3).

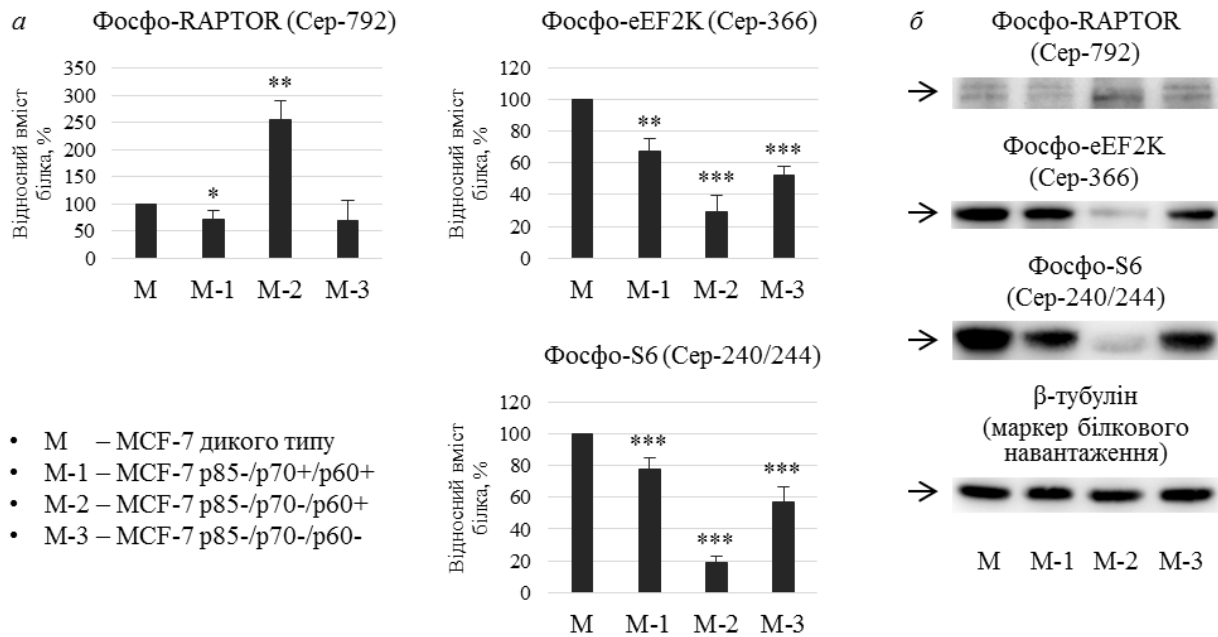


Рис. 3. Активність ланок mTOR-сигнальної мережі – білка RAPTOR (субстрат-презентувального компонента комплексу mTORC1), кінази eEF2K та рибосомального білка S6 (субстратів кінази S6K1) у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст фосфорильованих (деактивованого RAPTOR та активованих eEF2K і S6) форм білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

Було продемонстровано, що рівень фосфорилування S6 (за серином-240/244) та eEF2K (за серином-366) очікувано знижується при блокуванні p85S6K1 та p70S6K1. При цьому у випадку додаткового блокування p60S6K1 у клітинах М-3 виявляється зростання і часткове відновлення рівня їх фосфорилування, що може говорити або про наявність негативного регуляторного зв'язку між нею та її охарактеризованими субстратами або про ефективний компенсаторний ефект здійснений іншими ізоформами групи S6K, який при цьому залежить саме від функцій p60S6K1.

Для встановлення здатності ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до участі у забезпеченні негативного зворотного зв'язку було охарактеризовано функціональний стан безпосереднього регулятора S6K1 – комплексу mTORC1 та однієї з центральних ланок PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху – кінази АКТ. Проведений імуноблот аналіз з детекцією деактивованої форми субстрат-репрезентувального білка mTORC1 – RAPTOR та активованої форми кінази АКТ (Рис. 3, 4) також продемонстрував відмінності між функціями ізоформ.

Нокдаун p85S6K1 очікувано ослабив зворотний негативний регуляторний зв'язок з mTORC1 та незначно з АКТ, нокдаун p70S6K1 також зумовив підвищену активність АКТ, але виражено заблокував активність mTORC1, наступне блокування ж p60S6K1 нейтралізувало p70S6K1-асоційоване блокування mTORC1, але, як і нокдаун інших ізоформ, підвищив активність

АКТ. Таким чином, можна припустити, що всі три ізоформи залучені до зворотної негативної регуляції мережі, але мають місце також специфічні механізми такої регуляції пов'язані з p60S6K1 та p70S6K1.

Особливий інтерес до кінрази АКТ у даній роботі викликано численністю відомих її субстратів та відповідно її функцій, однією з яких, як вважається, може бути регуляція клітинної міграції. Активність кінрази АКТ асоційовану з функціонування у клітині ізоформ S6K1 було додатково досліджено за характером фосфорилування низки її субстратів (Рис. 4).

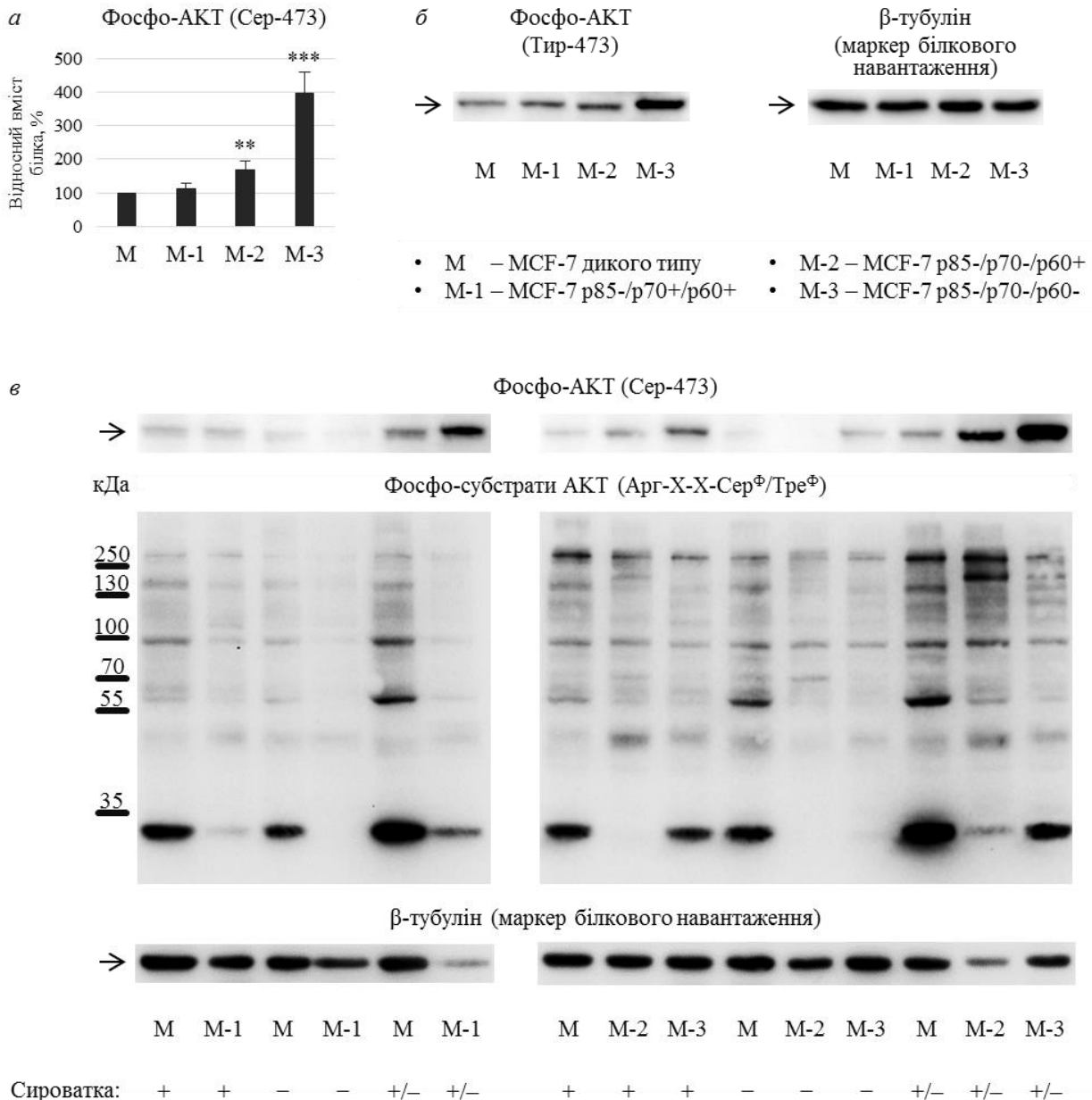


Рис. 4. Активність кінрази АКТ та її субстратів у клітинах лінії MCF-7 з нокадауном окремих ізоформ кінрази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах; б, в – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

Імуноблот аналіз з детекцією білків, що містять послідовністю сайту фосфорилування кіназою АКТ також продемонстрував зміни активності кінрази та патернів фосфорилування її субстратів, що за різних умов стимуляції

клітини ростовими факторами (бичачою ембріональною сироваткою) визначаються присутністю/відсутністю у клітині окремих ізоформ S6K1. Відмінності у впливі на активність АКТ-сигналізації та mTOR-сигнальної мережі в цілому дозволило припускати виразні відмінності у функціональному призначенні окремих ізоформ S6K1, зокрема і у регуляції міграційної активності, що є одним з об'єктів даного дослідження.

**Участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції міграційної активності пухлинних клітин.** Розмежування та дослідження ролей окремих ізоформ S6K1 у регуляції клітинної міграції було виконано за допомогою подвійного блокування функцій S6K1 – використанням клітин з нокадауном окремих ізоформ та інгібуванням функцій присутніх у клітині ізоформ шляхом інгібування кінази mTOR рапаміцином. Завдяки поступовому ускладненню моделювання клітинної міграції та розробленій модифікації моделі «раневої поверхні» вдалося дослідити важливість функціонування окремих ізоформ S6K1 за різних умов клітинної міграції та міжклітинної взаємодії. Загалом було доведено участь усіх трьох ізоформ до забезпечення регуляції клітинної міграції та виявлено відмінності функціональних ролей ізоформ (Рис. 5, 6).

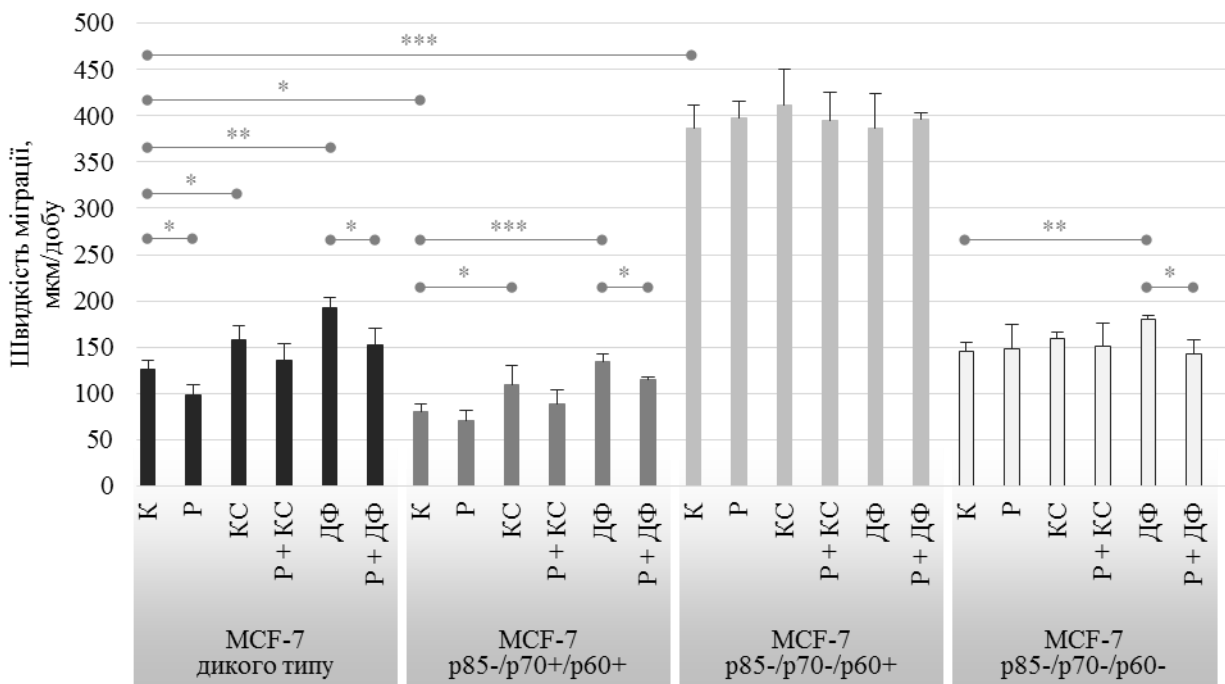


Рис. 5. Міграційна активність клітин лінії MCF-7 з нокадауном окремих ізоформ кінази S6K1 під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (дія 20% КС) – «КС»; за умови паракринної взаємодії з дермальними фібробластами (вплив співкультивування у співвідношенні 4:1) – «ДФ»; за умови блокування mTOR-сигналізації (дія 10 нМ рапаміцину) – «Р»; та за синхронної дії цих факторів (дії суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином – «КС+Р»; та дії 10 нМ рапаміцину на співкультуру «ДФ+Р») на моделі «раневої поверхні». Статистично достовірні відмінності позначено як: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

Міграційну активність клітин на двовимірній поверхні під паракринним впливом дермальних фібробластів було досліджено на моделі «раневої поверхні» та використання КС (Рис. 5: «К, Р, КС, КС+Р»). Результатами серії

вимірювань було продемонстровано здатність паракринної сигналізації дермальних фібробластів у вигляді КС посилювати рухливість клітин MCF-7, що виразно залежить від функціонування mTOR/S6K1, так як реагує на специфічну дію рапаміцину. Рапаміцин ефективно нейтралізував стимулюючий вплив фібробластів, однак максимальної його ефективності навіть після 24-годинної дії не спостерігалось, що говорить про вплив фібробластів і на mTOR-незалежну сигналізацію.

Нокдаун p85S6K1 – обмежив рухливість клітин та дещо обмежив їхню чутливість до дії рапаміцину, однак не торкнувся чутливості до КС, що демонструє p85S6K1 як mTOR-залежного позитивного регулятора клітинної міграції та її незалучення або ж вторинність ролі у сприйнятті впливу фібробластів. Нокдаун p70S6K1, додатковий до нокдауну p85S6K1, призвів до 3,5-разового зростання активності клітин, а також повної втрати ними чутливості до рапаміцину та КС. З огляду на це, p70S6K1 з одного боку підтверджує свою залежність від mTOR-сигналізації і ключову роль у контролі нею міграційної активності та сприйнятті паракринної сигналізації, адже у клітинах M-1 саме вона реагувала на КС і забезпечувала стимулюючий ефект, з іншого – демонструє критичну стримувальну роль у регуляції міграції. Нокдаун же p60S6K1, додатковий до нокдауну p85S6K1 та p70S6K1, повернув рівень міграційної активності клітин до нормального рівня. При цьому клітини залишилися нечутливими до КС чи рапаміцину. Виходячи з поведінки клітин M-3, випливає, що саме p60S6K1 є ініціатором та регулятором різкого зростання міграційної активності клітин M-2 і характеризує її як незалежного від mTOR та паракринної сигналізації фібробластів позитивного регулятора клітинної рухливості. Також з втрати клітинами M-3 ефекту підвищеної рухливості властивої M-2 можна припустити, що цей ефект регулюється антоністичною взаємодією між ізоформами p70S6K1 та p60S6K1, що є найпростішим поясненням, однак підтвердження такої гіпотези потребує окремого дослідження.

Активність міграції клітин на двовимірній поверхні за умов двосторонньої взаємодії з дермальними фібробластами було досліджено на моделі «раневої поверхні» зі співкультивуванням (Рис. 5: «К, Р, ДФ, ДФ+Р»). Можливість вимірювання рухливості клітин на цій моделі було уможливлено розробкою спеціального способу зонального висаджування клітин, як модифікації моделі. Результати вимірювань підтвердили стимулюючий ефект паракринної сигналізації дермальних фібробластів на рухливість пухлинних клітин, а також продемонстрували здатність пухлинної клітини посилювати паракринний вплив фібробластів на себе ж. Характер наслідків викликаних блокування експресії ізоформ S6K1 для клітинної міграції за умов співкультивування відтворив та підтвердив залежності виявлені під впливом КС та відповідно сформовані уявлення про їхню функціональну спеціалізацію.

Рухливість клітин у більш складних та більш близьких до *in vivo* умов під паракринним впливом дермальних фібробластів було досліджено на моделі реверсії багатоклітинних сфероїдів та з використанням КС (Рис. 6: «К, Р, КС, КС+Р»). Ефекти КС, рапаміцину та блокувань експресії окремих ізоформ S6K1

також повністю відтворили та підтвердили залежності ідентифіковані на моделі двовимірної міграції, ще раз продемонструвавши: стимулюючий ефект КС; його чутливість від супутньої дії рапаміцину; зниження рухливості та чутливості до рапаміцину викликане блокуванням p85S6K1 у М-1; різке зростання рухливості та виникнення резистентності до рапаміцину і КС внаслідок додаткового блокування p70S6K1 у М-2; а також відновлення нормальної рухливості при додатковому блокуванні p60S6K1 у М-3 зі збереженням нечутливості зовнішнього впливу.

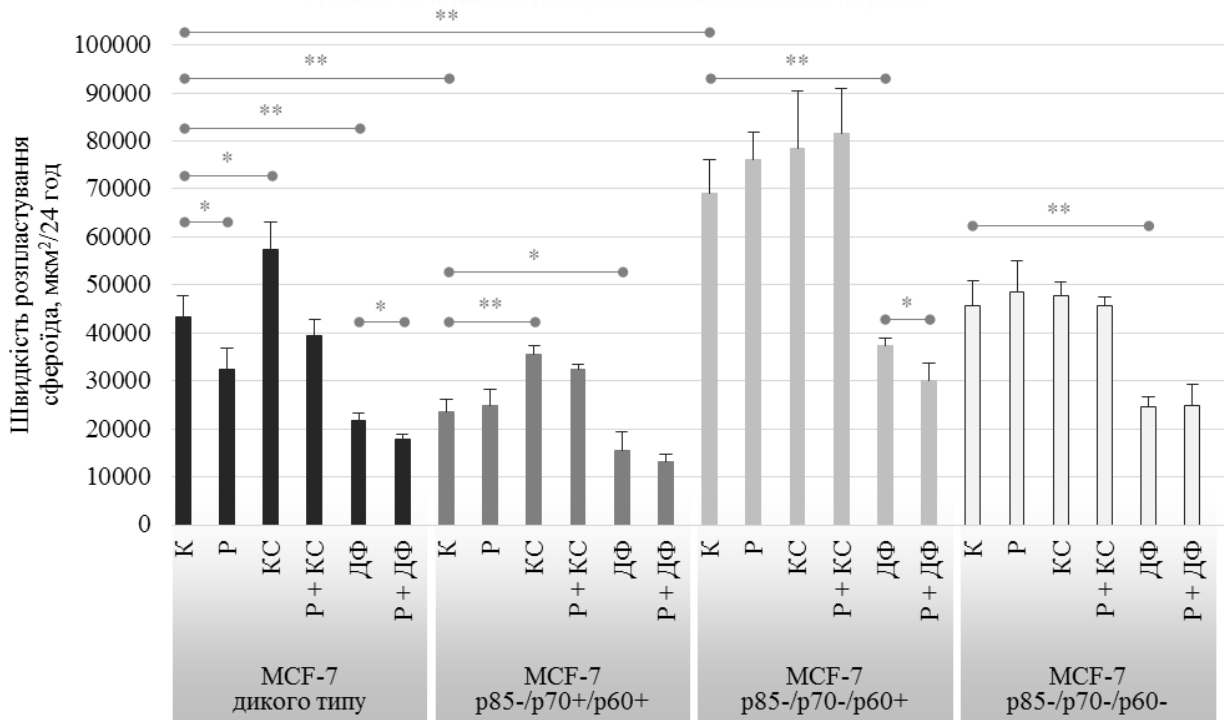


Рис. 6. Міграційна активність клітин лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (дія 20% КС) – «КС»; за умови фізичної та паракринної взаємодії з дермальними фібробластами (вплив висадки на моношар дермальних фібробластів) – «ДФ»; за умови блокування mTOR-сигналізації (дія 10 нМ рапаміцину) – «Р»; та за синхронної дії цих факторів (дії суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином – «КС+Р»); та дії 10 нМ рапаміцину на тривимірну співкультуру «ДФ+Р» на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда. Статистично достовірні відмінності позначено як: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$

Міграційну активність клітин у тривимірних умовах з забезпеченням паракринної і спряженої з нею фізичної взаємодії було досліджено за допомогою моделі реверсії багатоклітинних сфероїдів з їхнім висаджуванням та реверсією на моношарі дермальних фібробластів (Рис. 6: «К, Р, ДФ, ДФ+Р»). Результатами вимірювань було продемонстровано здатність дермальних фібробластів фізично стримувати рухливість пухлинних клітин, нейтралізуючи потенційні ефекти паракринної сигналізації. При цьому рухливість клітин з повноцінною експресією ізоформ продовжувала виявляти чутливість до дії рапаміцину, що свідчить про залучення mTOR/S6K1-сигнальної ланки і у міграції за умов фізичного контакту з фібробластами. Блокування експресії ізоформ S6K1 вплинуло на міграційну активність клітин за умов фізичної взаємодії таким же чином, як і в умовах паракринної взаємодії: клітини М-1

мігрували дещо повільніше за клітини дикого типу, М-2 – значно швидше, М-3 – з тією ж швидкістю, що й клітини дикого типу.

**Залучення ізоформ кінази S6K1 до визначення стратегії міграції пухлинних клітин.** Окрім встановлених залежностей між міграційною активністю клітин та функціонуванням в них окремих ізоформ S6K1 на моделях «раневої поверхні» та реверсії багатоклітинного сфероїда було виявлено також і якісні зміни характеру міграції. Виразні відмінності у стратегії розповсюдження виявилися характерними клітинам з нокдауном ізоформ p85S6K1 та p70S6K1, тоді як клітини М-1 та М-3 мігрували подібно до міграції клітин дикого типу. Відмінності спостерігалися як за міграції у двовимірних умовах, так і у тривимірних умовах, а також просто при культивуванні. За умов міграції з клітинного фронту або сфероїда клітинам М-2 було властиво активно залишати основну групу клітин, поодинокі або ж невеликими групами. У процесі культивування, клітини М-2 значно ефективніше займали ростову поверхню, рівномірно розповсюджуючись на ній і не формуючи колонієподібні групи, як це характерно клітинам лінії MCF-7. Також, при пасажуванні клітини М-2 було значно легше відкріпити від ростової поверхні, що, при цьому вимагало особливого поводження з ними при моделюванні та вимірюванні клітинної міграції. Крім того, сфероїди утворені клітинами М-2 особливо вирізнялися своєю «неправильною» формою – ступінь їхньої сферичності виразно поступався сфероїдам утвореним клітинами дикого типу, М-1 чи М-3.

З огляду на всі ці спостереження наступний пошук механізмів S6K1-асоційованої регуляції характеру клітинної міграції було зосереджено на встановленні зв'язків між функціонуванням окремих ізоформ S6K1 та регуляцією експресії вибраних маркерних білків, що забезпечують клітинну адгезивність, механорецепцію, формування цитоскелету та міжклітинних контактів.

**Участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції експресії маркерних білків клітинної адгезії.** Можливість залучення окремих ізоформ кінази S6K1 до регуляції формування пухлинними клітинами адгезивних контактів було досліджено шляхом вимірювання вмісту епітеліальних білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ S6K1 (Рис. 7). За результатами імуноблот аналізу, нокдаун p85S6K1 призвів до виразного послаблення експресії CD326 та CD66e, але ніяк не вплинув на експресію CD227. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, викликав наступне послаблення експресії CD326 та CD66e, а також практично повністю зупинив експресію CD227. Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, призвів до різкого зростання активності експресії CD326 з досягненням нею рівня вищого за нормальний, але при цьому не вплинув на експресію CD227 та CD66e. Таким чином, було ідентифіковано можливість залучення p85S6K1 як позитивного регулятора експресії CD326 та CD66e, p70S6K1 – як позитивного регулятора експресії CD326, CD227 та CD66e, а p60S6K1 – як негативного регулятора експресії CD326.



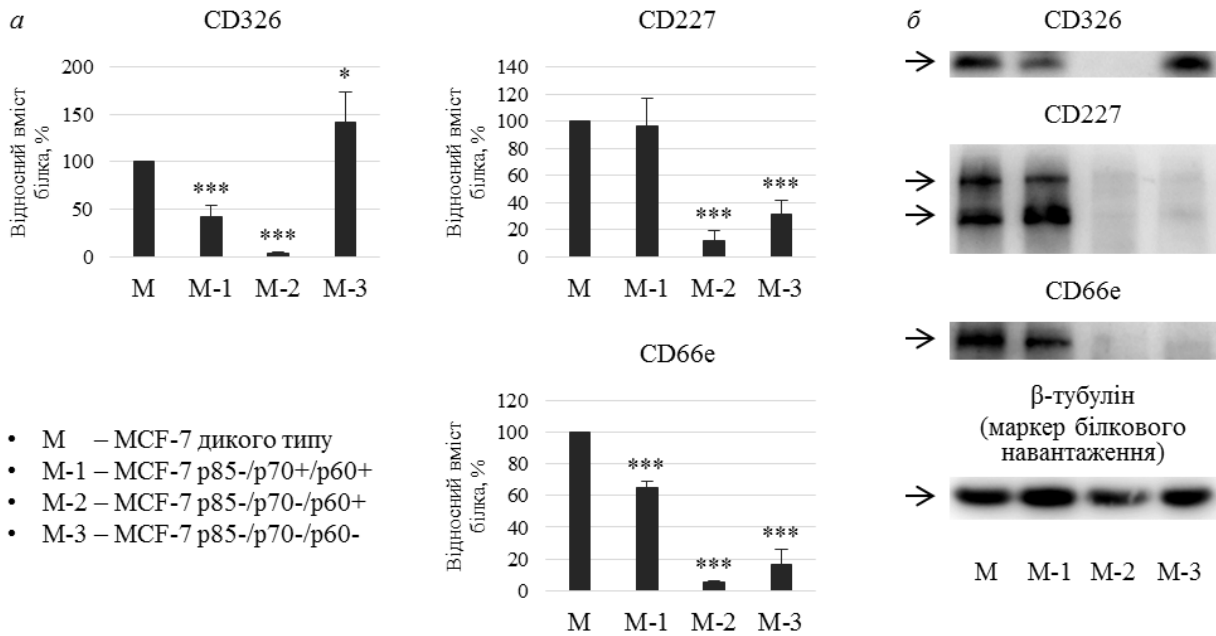


Рис. 7. Рівні експресії білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

Залучення ізоформ кінази S6K1 до регуляції експресії маркерних білків клітинної адгезії з функціями механорецепції. Залучення окремих ізоформ кінази S6K1 до забезпечення механосенсорної здатності пухлинних клітин пов'язаної з формуванням адгезивних контактів було встановлено за змінами активності експресії білків клітинної адгезії з сигнальними функціями – CD29 та CD44 у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ S6K1. Згідно результатів імуноблот аналізу (Рис. 8), нокдаун p85S6K1 зумовив зниження експресії CD29 та не призвів до змін у експресії CD44.

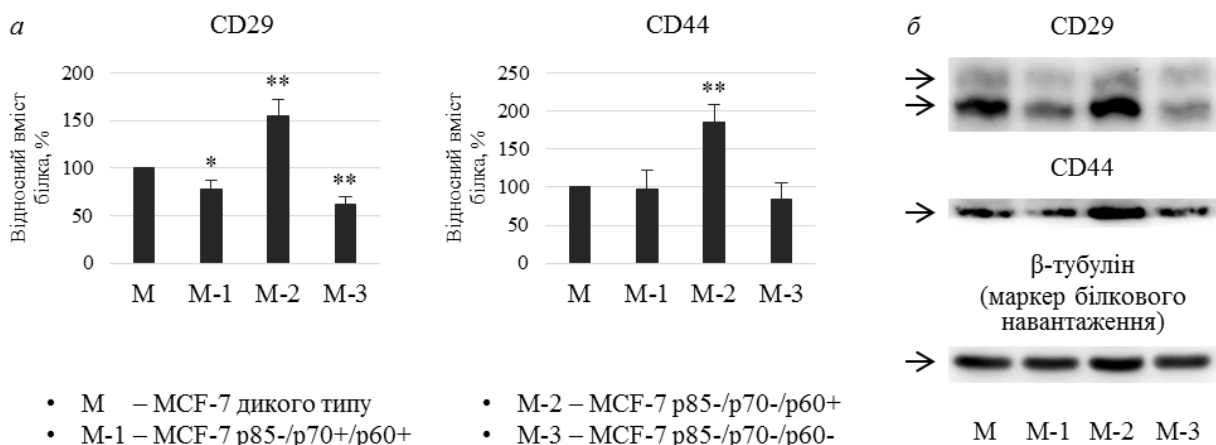


Рис. 8. Рівні експресії білків-механорецепторів CD29 та CD44 у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$

Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, викликав різке посилення експресії як CD44, так і CD29. Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та

p70S6K1, навпаки, став причиною різкого зниження активності експресії обох білків. Відповідно, було встановлено позитивні регуляторні зв'язки між p85S6K1 і експресією CD29, між p60S6K1 і експресією CD29 та CD44, а також негативні регуляторні зв'язки між p70S6K1 та експресією CD29 та CD44.

**Участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції активності ремоделювання адгезивних контактів.** Окрім залучення до регуляції експресії структурних компонентів, що формують адгезивні контакти клітин, було також з'ясовано можливість залучення ізоформ кінази S6K1 до регуляції активності ремоделювання цих структур. Для цього було застосовано імуноблот аналіз з детекцією та вимірюванням вмісту активованої форми кінази точок фокальної адгезії у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ S6K1. Результати експериментів (Рис. 9) показали, що нокдаун p85S6K1 спричинив виразне зниження рівня фосфорилування FAK, нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1 – різке його підвищення, а нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1 – різко знизив рівень фосфорилування кінази до рівня співставного з викликаним нокдауном p85S6K1. З огляду на ці ефекти, p85S6K1 та p60S6K1 відіграють позитивні ролі у регуляції активності FAK, а p70S6K1 – негативну.

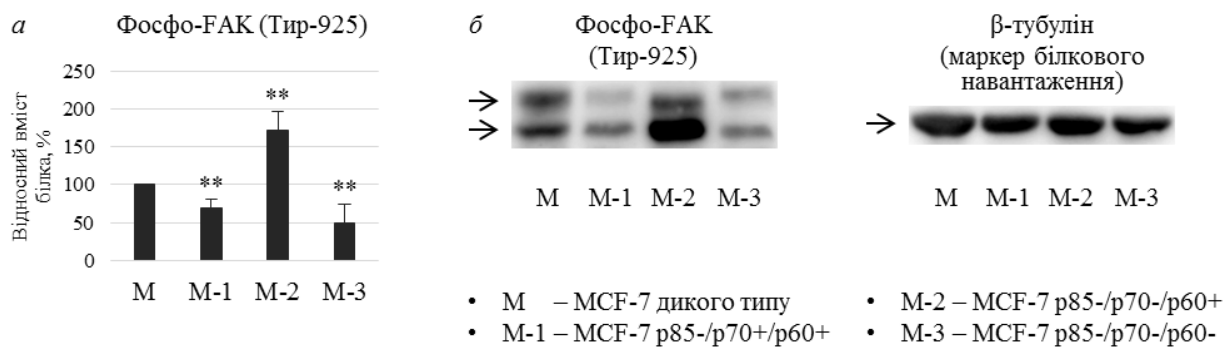
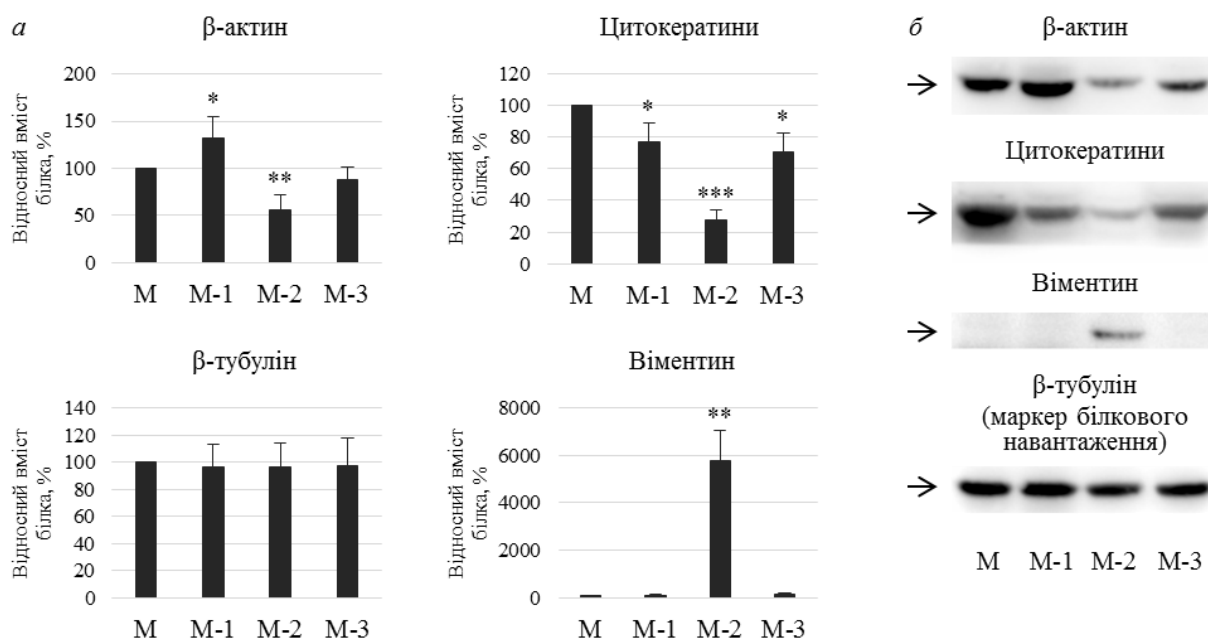


Рис. 9. Активність регулятора ремоделювання адгезивних контактів FAK у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білка у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*\*» –  $p < 0,01$

**Залучення ізоформ кінази S6K1 до регуляції експресії основних та гістіоспецифічних білків цитоскелету.** Причетність окремих ізоформ кінази S6K1 до регуляції формування та ремоделювання пухлинними клітинами цитоскелету було ідентифіковано за рівнями експресії основних його структурних компонентів – β-актину та β-тубуліну, а також гістіоспецифічних – цитокератинів та віментину у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ S6K1. Проведений імуноблот аналіз з детекцією цих білків (Рис. 10) продемонстрував, що нокдаун p85S6K1 призвів до деякого зростання активності експресії β-актину, ніяк не вплинув на експресію β-тубуліну, знизив експресію цитокератинів та не змінив відсутності експресії нехарактерного епітеліальним клітинам віментину. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, зумовив виразне зниження експресії β-актину, також не мав впливу на експресію β-тубуліну, викликав додаткове зниження експресії цитокератинів і, при цьому, ініціював у клітині експресію віментину.



- М – MCF-7 дикого типу
- М-1 – MCF-7 p85-/p70+/p60+
- М-2 – MCF-7 p85-/p70-/p60+
- М-3 – MCF-7 p85-/p70-/p60-

Рис. 10. Рівні експресії білків цитоскелету β-актину, β-тубуліну, групи цитокератинів (4, 5, 6, 8, 10, 13 і 18) та віментину у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*» –  $p < 0,05$ , «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$

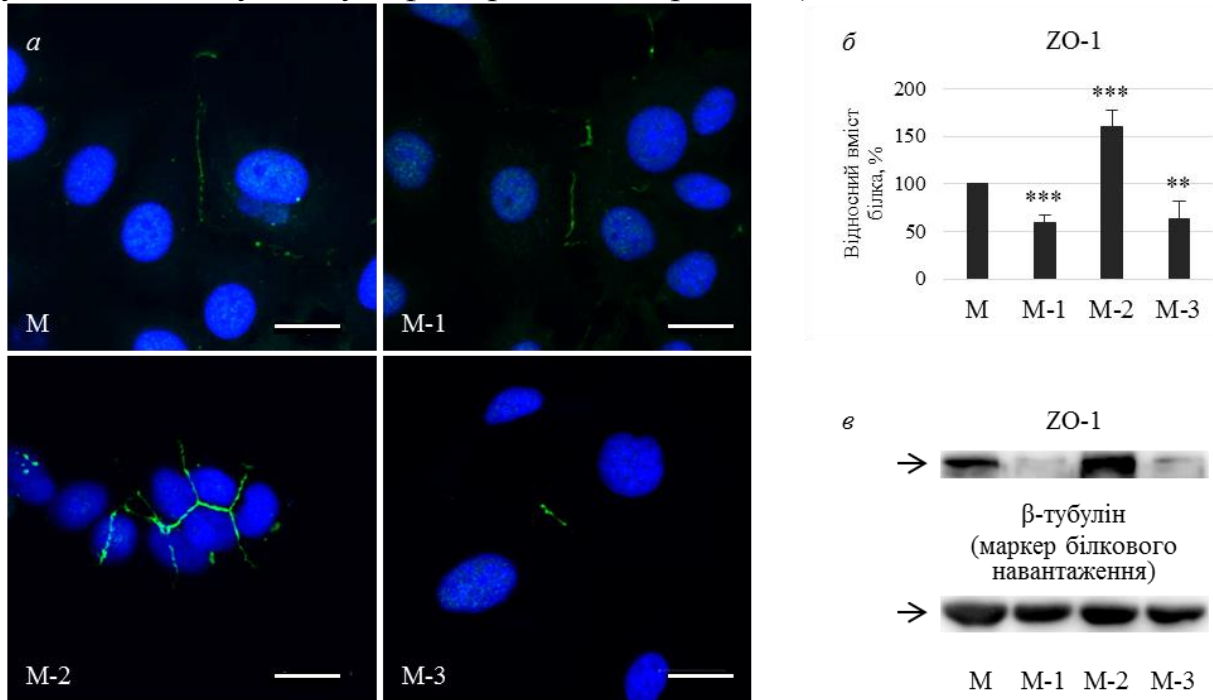
Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, викликав зростання рівня експресії β-актину з відновленням до нормального, також не торкнувся експресії β-тубуліну, призвів до зростання рівня експресії цитокератинів до рівня викликаного окремим нокдауном p85S6K1 і повністю припинив експресію віментину. Таким чином, виявлено здатність p85S6K1 негативно впливати на експресію β-актину та позитивно – на експресію цитокератинів, здатність p70S6K1 позитивно впливати на експресію β-актину та цитокератинів і запобігати експресії віментину, а також здатність p60S6K1 негативно впливати на експресію β-актину і цитокератинів та ініціювати експресію віментину.

Ініціація експресії віментину у клітинах М-2, разом з виявленим зниженням експресії цитокератинів та епітеліальних білків клітинної адгезії (CD326, CD227 та CD66e) на фоні потужного зростання міграційної активності та нейтралізація цих ефектів у клітинах М-3 демонструє ознаки можливості залучення p70S6K1 та p60S6K1 до регуляції розвитку процесів епітеліально-мезенхімальної пластичності.

Також, згідно отриманих результатів, лише експресія β-тубуліну виявилася незалежною від функціонування ізоформ кінази S6K1, тому кількість у клітинах саме цього білка було використано і рекомендується до використання у якості білка-маркера контролю білкового навантаження у дослідженнях mTOR-сигнальної мережі з застосуванням імуноблот аналізу. При цьому

використання з цією метою у подібних дослідженнях іншого традиційного білка-маркера –  $\beta$ -актину виявляється непридатним.

**Участь ізоформ кінази S6K1 у регуляції експресії білка щільних контактів.** Участь окремих ізоформ кінази S6K1 у регуляції формування та ремоделювання пухлинними клітинами щільних міжклітинних контактів було досліджено з вимірюванням рівнів експресії та характеристикою локалізації білка ZO-1 у клітинах MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ S6K1 за допомогою імуноблот аналізу та імунофлуоресцентної реакції (Рис. 11).



- ■ – ZO-1
- ■ – Клітинні ядра

- М – MCF-7 дикого типу
- М-1 – MCF-7 p85-/p70+/p60+

- М-2 – MCF-7 p85-/p70-/p60+
- М-3 – MCF-7 p85-/p70-/p60-

*Рис. 11. Рівень експресії та локалізація білка щільних міжклітинних контактів ZO-1 у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 за результатами імуноблот аналізу та імунофлуоресцентної реакції: а – репрезентативні мікрофотографії препаратів клітин з імунофлуоресцентною детекцією ZO-1 та фарбуванням клітинних ядер DAPI (масштаб – 20 мкм), б – відносний вміст білків у клітинних лізатах, в – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «\*\*» –  $p < 0,01$ , «\*\*\*» –  $p < 0,001$*

Результатами імуноблот аналізу показано, що нокдаун p85S6K1 призвів до виразного послаблення експресії ZO-1, нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1 – різке посилення його експресії, а нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1 – послабив експресію до рівня співставного з викликаним нокдауном p85S6K1. Відповідно результати демонструють залучення p85S6K1 та p60S6K1 до позитивної регуляції експресії ZO-1 і залучення p70S6K1 до негативної її регуляції. Результати проведеної імунофлуоресцентної реакції загалом підтвердили та візуалізували результати отримані за допомогою імуноблот аналізу. Кількість ZO-1 у клітинах М-1 спостерігається менш інтенсивним, більша частина білка розпорошена у цитоплазмі, решта ж концентрується у інтерфейсах взаємодій між меншою кількістю клітин,

порівняно з характерним клітинам дикого типу. У клітинах М-2 кількість ZO-1 значно більша, білок сконцентрований у інтерфейсах взаємодій між майже усіма клітинами у групах і майже не виявляється у цитоплазмі. Клітини ж М-3 характеризуються найменшою кількістю білка, який концентрується у інтерфейсах взаємодій між лише окремими клітинами і при цьому майже не детектується у цитоплазмі.

**Узагальнення.** Встановлені у дослідженні регуляторні зв'язки між ізоформами p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, паракринною сигналізацією мікрооточення, ланками mTOR-сигнальної мережі та білками залученими до регуляції міграційного циклу узагальнено продемонстровано на (Рис. 12).

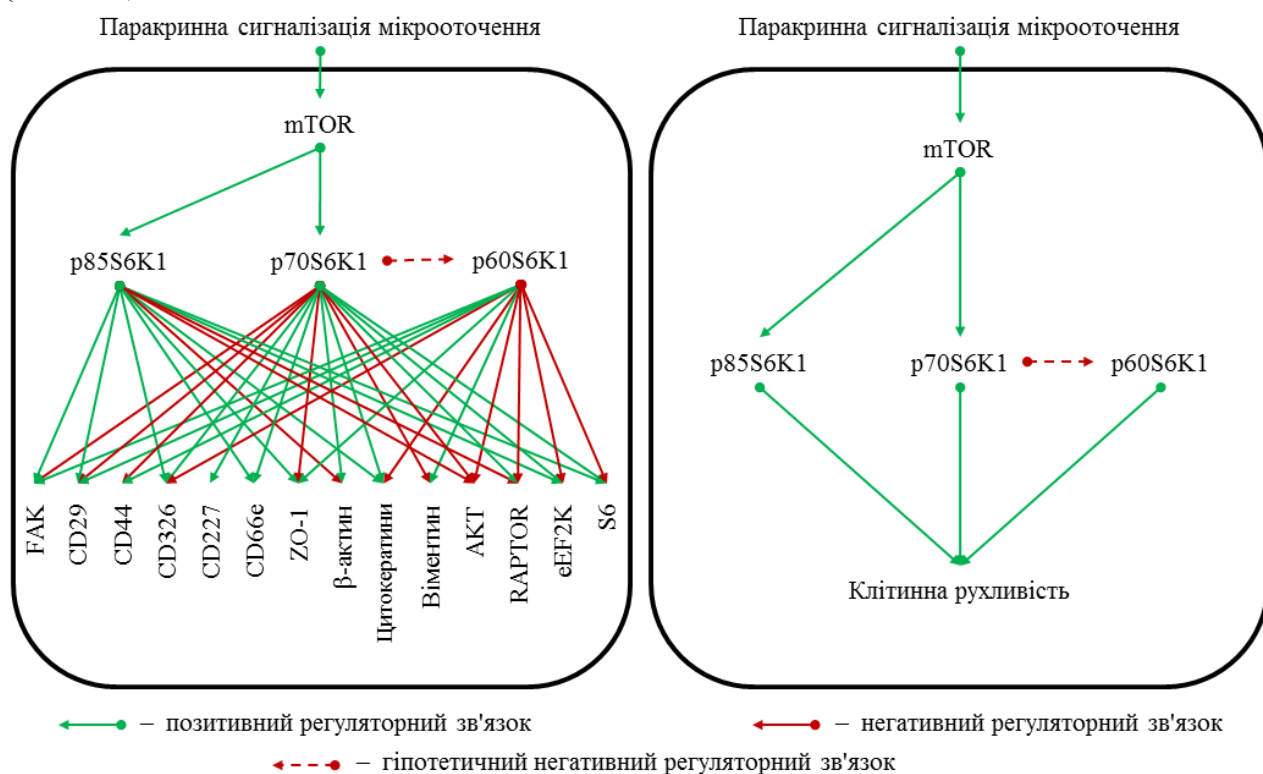


Рис.12. Карти встановлених та підтверджених регуляторних зв'язків між ізоформами p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1, паракринною сигналізацією мікрооточення, ланками mTOR-сигнальної мережі та білками залученими до регуляції міграційного циклу

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що mTOR-сигнальна мережа задіяна у регуляції міграційної здатності пухлинних клітин, опосередковуючи передачу паракринних стимулів від стромального мікрооточення та впливаючи на експресію білків клітинної адгезії, цитоскелету та міжклітинних контактів.

1. Встановлено, що mTOR/S6K1-сигнальна ланка у клітинах лінії MCF-7 здатна сприймати вплив молекул паракринної сигналізації фібробластів, що проявляється у активації кіназ mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та рибосомального білка S6. Паракринний вплив фібробластів здатен нейтралізувати дію рапаміцину на активність цих кіназ.

2. Встановлено відмінності ролей ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у підтриманні функціонування mTOR-сигнальної мережі, зокрема комплексу mTORC1, кіназ АКТ та eEF2K у клітинах лінії MCF-7. Лише ізоформи p70S6K1 та p60S6K1 продемонстрували ознаки залучення до формування петель негативного зворотного зв'язку, що ефективно обмежує активність кінази АКТ, однак разом з цим патерни фосфорилування субстратів кінази зазнавали значних змін внаслідок блокування кожної з ізоформ.
3. Розроблено та адаптовано модифікацію моделі «раневої поверхні», що уможливорює вимірювання з її використанням міграційної активності клітин за умов співкультивування та рекомендована до використання у моделюванні міграції за умов пухлино-стромальних взаємодій *in vitro*.
4. Вперше показано відмінності ролей ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 у регуляції міграційної активності клітин лінії MCF-7 під впливом молекул паракринної сигналізації фібробластів на моделях як двовимірної, так і тривимірної міграції. Продемонстровано критичну важливість функціонування ізоформ p85S6K1 та p70S6K1 для здатності клітини сприймати паракринну сигналізацію у регуляції клітинної рухливості. Блокування цих двох ізоформ зумовило набуття резистентності до паракринного впливу фібробластів та/або дії рапаміцину.
5. Вперше показано залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та відмінності їхніх ролей у специфічній регуляції експресії білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e, білків-механорецепторів CD29 і CD44, білків цитоскелету  $\beta$ -актину, цитокератинів та віментину, білка щільних міжклітинних контактів ZO-1, а також активності регулятора ремоделювання адгезивних контактів кінази FAK, які асоціюються з регуляцією клітинної міграції. Встановлено низку нових регуляторних зв'язків властивих окремим ізоформам кінази S6K1.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Gotsulyak N. Ya.**, Kosach V. R., Cherednyk O. V., Tykhonkova I. O., Khoruzhenko A. I. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay. *Biopolymers & Cell*. 2014. Vol. 30. No. 3. P. 223-228. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин HeLa, вимірювання швидкості міграції клітин HeLa, участь у розробці модифікації моделі «раневої поверхні», участь у аналізі отриманих результатів, підготування статті до друку)
2. **Holiar V. V.**, **Gotsulyak N. Ya.**, Khoruzhenko A. I., Zaiets I. V. 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 & Cell*. 2019. Vol. 35. No. 4. P. 303-312. (Особистий внесок здобувача – участь у аналізі літературних джерел, культивуванні клітин, проведенні імунофлюоресцентної реакції, аналізі отриманих результатів та підготуванні статті до друку)
3. **Hotsuliak N. Ya.**, Kosach V. V., Tykhonkova I. O., Palchevskii S. S., Khoruzhenko A. I. Fibroblasts modulate the tumor cell motility and their mTOR/S6K1 phosphorylation status *in vitro*. *Biopolymers & Cell*. 2019. Vol. 35. No.

6. P. 417-426. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, участь у підготовування статті до друку)

4. Kosach V. R., **Hotsuliak N. Ya.**, Zaiets I. V., Skorokhod O. M., Savinska L. O., Khoruzhenko A. I., Filonenko V. V. Alterations in expression of S6K1 isoforms in MCF-7 cells have a strong impact on the locomotor activity as well as on S6K1 and AKT signaling. *Biopolymers & Cell*. 2020. Vol. 36. No. 2. P. 110-121. (Особистий внесок здобувача – участь у аналізі літературних джерел, культивуванні клітин, проведенні імуноблот аналізу, обробці його результатів та підготовуванні статті до друку)

5. **Hotsuliak N. Ya.**, Kravchenko A. O., Kosach V. V., Tykhonkova I. O., Khoruzhenko A. I. Sensitivity of MCF-7 cells with differential expression of S6K1 isoforms to the regulatory impact of fibroblasts. *Biopolymers & Cell*. 2020. Vol. 36. No. 3. P. 210-228. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, участь у підготовування статті до друку).

6. Khoruzhenko A., **Gotsulyak N.**, Cherednyk O., Filonenko V. Application of image analysis tools to study the locomotor properties of HeLa cells under mTOR signaling inhibition and the presence of stromal cells. *Computational approaches to networks, cells and tissues: Materials of the Quantissue Meeting 2013 (Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spain, 10-11 April 2013)*. Barcelona, 2013. P. 34. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин HeLa, вимірювання швидкості міграції клітин HeLa, участь у розробці модифікації моделі «раневої поверхні», участь у аналізі отриманих результатів).

7. **Gotsulyak N. Ya.**, Filonenko V. V., Khoruzhenko A. I. Sensitivity of mTOR-regulated cancer cell motility *in vitro* to paracrine influence of fibroblasts under normal and starvation conditions. *Shevchenkivska Vesna: Life Sciences: Abstract book 2015 of the XIII International Scientific Conference of Young Scientist (Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, 1-3 April 2015)*. Kyiv, 2015. P. 12. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготовування матеріалів до публікації).

8. **Gotsulyak N. Ya.**, Filonenko V. V., Khoruzhenko A. I. mTOR-regulated cancer cell motility *in vitro* under direct and indirect paracrine influence of fibroblasts. *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015: тези доповідей Конференції-конкурсу молодих учених присвяченої 110-річчю з дня народження академіка НАН України Максима Федотовича Гулого (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна, 23-24 квітня 2015 р.)*. Київ, 2015. С. 21. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготовування матеріалів до публікації).

9. **Gotsulyak N. Ya.**, Khoruzhenko A. I. mTOR-associated cytoskeletal remodeling and 3D motility of HeLa cells under paracrine influence of NIH 3T3 fibroblasts *in vitro*. *Advances in cell biology and biotechnology: Materials of the Ukrainian Society of Cell Biology International conference (Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv, Ukraine, 11-13 October 2015)*. Lviv, 2015. P. 114.

(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготування матеріалів до публікації).

10. **Gotsulyak N. Ya.**, Khoruzhenko A. I. mTOR-signaling participation in MCF-7 cells motility modulation by paracrine influence of human dermal fibroblasts *in vitro*. Онкологія. 2015. Т. 17. №3, с. 223. (Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах: тези наукових доповідей Науково-практичної конференції (ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна, 22-23 жовтня 2015 р.). (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготування матеріалів до публікації).

11. **Hotsuliak N. Ya.**, Khoruzhenko A. I. Paracrine suppressive effect of highly confluent monolayer normal fibroblasts on S6K1-regulated motility of cervical cancer cells *in vitro*. *Mechanisms of development of pathological processes and their pharmacological correction*: Book of Abstracts of the II Scientific and Practical Internet Conference with international participation (National University of pharmacy, Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, Ukraine, 21 November 2019). Kharkiv, 2019. P. 23-24. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготування матеріалів до публікації).

12. **Hotsuliak N. Ya.**, Kosach V. R., Zaiets I. V. Selective blocking of S6K1 isoforms expression modulates migration activity of breast cancer cells under effect of rapamycin and paracrine interaction with fibroblast *in vitro*. *Biology: From A Molecule up to the biosphere*: Abstracts of the XIV International Young Scientist's Conference (V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, Ukraine, 27-29 November 2019). Kharkiv, 2019. P. 39-41. (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, підготування матеріалів до публікації).

## АНОТАЦІЯ

**Гоцуляк Н. Я. Роль mTOR-сигнальної мережі у регуляції локомоторних властивостей пухлинних клітин під впливом мікрооточення.** – 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, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі mTOR-сигнальної мережі у регуляції міграційної активності пухлинних клітин під впливом найближчого мікрооточення. У роботі виявлено, що молекули паракринної сигналізації продуковані фібробластами сприяють активації компонентів mTOR/S6K1-сигнальної ланки, включаючи p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. За допомогою стабільних клітинних ліній із редагованою експресією ізоформ S6K1, отриманих за допомогою технології CRISPR/Cas9 на базі клітин лінії MCF-7 з'ясовано, що зміна профілів експресії ізоформ S6K1 суттєвим чином



позначається на функціонуванні mTOR-сигнальної мережі в цілому. Крім того, порушення експресії ізоформ S6K1 призводить до зміни профілів експресії та активації білків, залучених до процесів міграції та адгезії, зокрема FAK, CD29, CD44, CD326, CD227, CD66e та ZO-1. Виявлені зміни профілів експресії цих білків викликають суттєве порушення рухливості пухлинних клітин. Особливо це стосується експресії ізоформи p60S6K1 за умов блокування експресії p85S6K1 та p70S6K1, яка призводить до зростання міграційної активності клітин у 3,5 рази. Цікаво, що клітини з таким профілем експресії ізоформ S6K1, на відміну від клітин дикого типу, втрачають чутливість як до паракринного впливу фібробластів, так і до специфічного інгібування mTOR/S6K1-сигналювання рапаміцином. Окремо слід зазначити, що паракринна дія фібробластів на клітини дикого типу MCF-7 повністю анулює пригнічуючий вплив рапаміцину, відновлюючи локомоторну активність пухлинних клітин до нормального рівня. Отримані у роботі результати свідчать про наявність виразних відмінностей серед функціональних здатностей окремих ізоформ S6K1 та про важливість співвідношення активностей окремих ізоформ для життєдіяльності клітин за різних фізіологічних та патологічних умов.

**Ключові слова:** mTOR-сигнальна мережа, ізоформи кінази S6K1, клітинна міграція, пухлинне мікрооточення, пухлино-стромальна взаємодія, аденокарцинома молочної залози людини.

## АННОТАЦИЯ

**Гоцуляк Н. Я. Роль mTOR-сигнальной сети в регуляции локомоторных свойств опухолевых клеток под влиянием микроокружения.** – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2021.*

Диссертационная работа посвящена исследованию роли mTOR-сигнальной сети в реализации миграционной активности опухолевых клеток под влиянием ближайшего микроокружения. В работе выявлено, что молекулы паракринной сигнализации продуцируемые фибробластами способствуют активации компонентов mTOR/S6K1-сигнального звена, включая p85S6K1, p70S6K1 и p60S6K1. С помощью стабильных клеточных линий с редактированной экспрессией изоформ S6K1, полученных с помощью технологии CRISPR/Cas9 на базе клеток линии MCF-7 установлено, что изменение профилей экспрессии изоформ S6K1 существенным образом сказывается на функционировании mTOR-сигнальной сети в целом. Кроме того, нарушение экспрессии изоформ S6K1 приводит к изменению профилей экспрессии и активации белков, вовлеченных в процессы миграции и адгезии, в частности FAK, CD29, CD44, CD326, CD227, CD66e и ZO-1. Обнаруженные изменения профилей экспрессии этих белков вызывают существенное нарушение подвижности опухолевых клеток. Особенно это касается экспрессии изоформы p60S6K1 при блокировании экспрессии p85S6K1 и p70S6K1, которая приводит к увеличению миграционной активности клеток в 3,5 раза. Интересно, что клетки с таким

профилем экспрессии изоформ S6K1, в отличие от клеток дикого типа, теряют чувствительность как к паракринному влиянию фибробластов, так и к специфическому ингибированию mTOR/S6K1-сигналикации рапамицином. Отдельно следует отметить, что паракринное воздействие фибробластов на клетки дикого типа MCF-7 полностью аннулирует негативное влияние рапамицина, восстанавливая локомоторную активность опухолевых клеток к нормальному уровню. Полученные в работе результаты свидетельствуют о наличии значительных различий среди функциональных способностей отдельных изоформ S6K1 и о важности соотношения активностей отдельных изоформ для жизнедеятельности клеток при различных физиологических и патологических условиях.

**Ключевые слова:** mTOR-сигнальная сеть, изоформы киназы S6K1, клеточная миграция, опухолевое микроокружение, опухолево-стромальное взаимодействие, аденокарцинома молочной железы человека.

### ABSTRACT

**Hotsuliyak N. Ya. The role of mTOR-signaling network in the regulation of locomotor properties of tumor cells under the influence of the microenvironment.** – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

*Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.*

The presented dissertation is devoted to the study of the role of mTOR-signaling network in the response of tumor cells to the regulatory influence of the tumor stroma. First of all, Western blot analysis confirmed that fibroblasts increased the activity of several components of mTOR/S6K1-signaling link including p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 in tumor cells MCF-7. To determine which of the S6K1 isoforms may be responsible for the formation of tumor phenotype, stable cell lines derived from MCF-7 cells with edited expression of S6K1 isoforms were used: MCF-7 p85-/p70+/p60+ (M-1), MCF-7 p85-/p70-/p60+ (M-2) and MCF-7 p85-/p70-/p60- (M-3) using CRISPR/Cas9 technology. Western blot analysis showed changes in the functioning of the mTOR-signaling network in the resulting cell lines with changed profile of S6K1 isoforms expression. It was found that the selective expression of p60S6K1 accompanied by the blocking of p85S6K1 and p70S6K1 expression led to significant reduction of S6, eEF2K, (S6K1 targets) and RAPTOR (component of mTORC1) activity, but increased activity of AKT and RAPTOR. Primary morphological analysis of the studied cell lines revealed that selective expression of p60S6K1 accompanied by the blocking of p85S6K1 and p70S6K1 expression led to the alteration of epithelial growth type in 2D and 3D culture conditions. The cells that selectively expressed p60S6K1 were found to contain significantly less  $\beta$ -actin and cytokeratins than control cells. Instead, they had vimentin, which may indicate epithelial-mesenchymal plasticity of these cells. That's why, the expression and activation profiles of proteins involved in migration and adhesion processes, in particular FAK, CD29, CD44, CD326, CD227, CD66e and ZO-1 were studied in mentioned cell lines. It was determined that the activity of focal

adhesion kinase FAK was significantly increased in M-2 cell line. At the same time a dramatic increase in ZO-1 protein content (tight junction protein) was registered in M-2 cells as well. It should be noted that the content of CD29 and CD44 in the M-2 cells was also significantly elevated. The opposite effect was observed in the study of the content of proteins involved in the adhesion process, namely CD326, CD227 and CD66e, their level in M-2 cells was significantly lower than in MCF-7. It prompted us to analyze the locomotor properties of the studied cells with edited expression of S6K1 isoforms under the influence of stromal cells in two models. For this purpose, scratch test was significantly optimized, which on the one hand greatly simplified the calculation, and on the other – allowed to apply the model of co-cultivation of fibroblasts and tumor cells. Thus, it was found that the medium conditioned by fibroblasts, and especially direct co-cultivation with fibroblasts significantly increase the motility of tumor cells. Besides, the presence of factors produced by fibroblasts canceled the effect of rapamycin, a specific mTOR/S6K1-signaling inhibitor. Selective down regulation of p85S6K1 expression in M-1 cells reduced the locomotor properties in the absence and presence of fibroblasts. Instead, selective expression of p60S6K1 in M-2 cells led to an increase in cell migration by 3-4 times, but these cells were insensitive to the effects of fibroblasts and rapamycin. Knockdown of all three isoforms did not change significantly the cell migration dynamics. Cell models based on three-dimensional cultivation are considered closer to the organism than monolayer culture. Therefore, a model of reversion of a three-dimensional spheroid into a monolayer colony was also used to determine the motility of tumor cells. The obtained data mainly confirmed the results of the previous experiment, except for the condition of direct co-cultivation of tumor spheroids and fibroblast monolayer. Under such conditions, fibroblasts significantly slowed down the migration of tumor cells. The results obtained in this work indicate the presence of significant differences among the functional abilities of individual S6K1 isoforms and the importance of the ratio of the activities of individual isoforms for the vital activity of cells under various physiological and pathological conditions.

**Key words:** mTOR-signaling network, S6K1 kinase isoforms, cell migration, tumor microenvironment, tumor stromal interaction, human breast adenocarcinoma.

