

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: 577.218+577.217

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

03.00.03 – молекулярна біологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,  
**Філоненко Валерій Вікторович**,  
Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України,  
завідувач відділу сигнальних систем  
клітини.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор  
**Колибо Денис Володимирович**,  
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна  
НАН України,  
завідувач лабораторією імунології;

кандидат біологічних наук, с.н.с.  
**Шлапацька Лариса Миколаївна**,  
Інститут експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р. Є.  
Кавецького НАН України.

Захист відбудеться «17» грудня 2019 року о 10<sup>30</sup> на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

Автореферат розіслано « » листопада 2019 року.

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



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Кіназа 1 рибосомного білка S6 – S6K1 – функціонує як один з ключових компонентів PI3K/mTOR/S6K1-залежного сигнального шляху, залученого до регуляції трансляції, клітинного росту, виживання, проліферації та міграції (Foster et al., 2010, Fenton et al., 2011). S6K1 є серин/треоніною кіназою, яка активується білковим комплексом mTORC1 у відповідь на дію ростових факторів, мітогенів та поживних речовин. Порушення в 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 (Zoncu et al., 2011, Dann et al., 2007, Hoeffler et al., 2010).

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 АТГ), 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 (Magnuson et al., 2012). Було виявлено, що експресія мінорної ізоформи p31-S6K1 здатна ініціювати злоякісну трансформацію епітеліальних клітин молочної залози людини (Ven-Hug, 2013), однак механізм, який лежить в основі онкогенних властивостей p31-S6K1, наразі залишається невідомим. Дані щодо експресії гіпотетичної ізоформи p60-S6K1 є дуже обмеженими (Kim et al., 2009), 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. (Magnuson et al., 2012). 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 (Bärlund et al., 2000, Castellvi et al., 2006, Ismail, 2012), раку легень, ендометрія, яєчника, щитоподібної та передміхурової залоз (Pópulo et al., 2012, Lyzogubov et al., 2003, Lytvyn et al., 2003, Lyzogubov et al., 2005), 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 випробування як протипухлинні засоби (Pópulo et al., 2012).

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 НЕК-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 кіназу активність подібно до p70/p85-S6K1 ізоформ.
4. Оцінити статус фосфорилювання 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 НЕК-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 НЕК-293 на їхню проліферацію та міграцію.
7. Дослідити вплив селективної експресії p60-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах НЕК-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, імунофлюоресцентний 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 HEK-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 29<sup>th</sup> – December 1<sup>st</sup>, 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 дисертації.** 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.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

Синтез кДНК. З клітин різних ліній було екстраговано тотальну РНК за допомогою набору реагентів “GeneJET RNA purification kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Після вимірювання концентрації виділеної РНК, фракцію РНК обробляли ДНКазою I. Отримані зразки РНК використовували для синтезу кДНК з використанням набору реагентів “RevertAid Reverse Transcriptase” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Оцінку рівнів експресії транскриптів S6K1 у клітинних лініях проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та праймерів, специфічних до р60-S6K1 (екзон 1a-9), р70/p85 S6K1 (екзон 2-4 та 14-15), β-актину та з використанням набору реагентів “DreamTaq DNA Polymerase” (ThermoScientific) та “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Scientific). Усі реакції проводили на приладі

“FlexCycler” (Analytik Jena). Утворення відповідних фрагментів ПЛР було у подальшому проаналізовано за допомогою електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

Кількісна ПЛР. Реакції проводили із застосуванням набору реагентів “Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) і приладу “Thermal Cycler CFX96 Real-Time System” (Bio-Rad). Для вимірювання відносної експресії генів застосовували  $\Delta C^t$  метод розрахунку. Як референтний використовували ген *TBP*, відносно якого і проводився розрахунок експресії цільових генів.

Клонування gRNA олігонуклеотидів у ДНК векторі для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування S6K1 гена. Для клонування гРНК олігонуклеотидів використовували ДНК вектор pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Процедура клонування складалася з наступних етапів: фосфорилування та відпал гРНК олігонуклеотидів, рестрикція ДНК вектору (сайт рестрикції BbsI) із наступним дефосфорилуванням, лігування олігонуклеотидів та вектору.

Клонування shRNA олігонуклеотидів 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 BglII та HindIII.

Культивування клітин ссавців. Для культивування клітин використовували середовище DMEM, RPMI-1640 та EMEM. Усі клітини культивували при 37°C у зволоженій атмосфері, яка містила 5% CO<sub>2</sub>. Стандартні процедури маніпуляції з клітинами були: розмороження, заміна культурального середовища, сплітування та кріоконсервація.

Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК. Клітини нарощували до конфлюентності 60-80% і додавали реагент для трансфекції jetPEI (Polyplus-transfection) разом з цільовим ДНК вектором. Через добу клітини переносили у середовище з відповідним антибіотиком для подальшої селекції клонів, які стабільно експресують цільову послідовність ДНК.

Вестерн-блот аналіз. Лізис клітин проводили у відповідному буферному розчині з додаванням інгібіторів протеаз. Концентрацію білка розраховували за методом Бредфорд. Електрофоретичне розділення білків у лізатах проводили у денатуруючих умовах у поліакриламідному гелі. Після електрофоретичного розділення білки переносили із гелю на попередньо активовану метанолом полівініліденфторидну мембрану, яку інкубували з відповідними первинними і вторинними антитілами. Детектування сигналів від вторинних антитіл на мембрані проводили використовуючи реакцію підвищеної хемілюмінесценції.

Імунопреципітація та in vitro кіназна реакція. Імунопреципітацію S6K1 ізоформ проводили за допомогою кролячих поліклональних антитіл проти С-кінця S6K1. На першому етапі антитіла інкубували із суспензією протеїн G агарози (“Generon Ltd.”, США), після чого зв’язані з агарозою антитіла змішували з розчинними фракціями клітинних лізатів. Імунопреципітати використовували для подальшої кіназної реакції шляхом їх інкубації з

рекомбінантним білком грS6 у присутності 1 мМ АТФ у кіназному буфері. Реакцію термінували шляхом додавання 2X буфера Лемлі. Усі зразки потім аналізували за допомогою вестерн-блот аналізу.

Імунофлуоресцентний аналіз. Клітини культивували у 24-лункових планшетах до стану конфлюентності 70-80% з подальшою фіксацією 10% формаліном. Після цього фіксовані клітини пермеабілізували розчином 0,2% Triton X-100 та інкубували у розчині 10% ембріональної сироватки теляти ("Gibco BRL", США) для блокування неспецифічного зв'язування. На наступному етапі зразки послідовно інкубували з первинними та міченими флуоресцентною міткою вторинними антитілами. Ядра клітин фарбували барвником DAPI. Надалі зразки закріплювали на мікропрепаратах за допомогою середовища Mowiol 4-88 ("Sigma-Aldrich", США) та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії з використанням приладу Zeiss LSM 510 META Confocal Microscope ("Zeiss AG", Німеччина).

Аналіз швидкості міграції клітин. Швидкість міграції визначали за допомогою методу "раневої поверхні". Одразу після проведення "подряпини" та через 24 год фотографували п'ять полів зору у межах "подряпини" для кожного зразка досліджуваних клітин. 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.

Аналіз рівнів проліферації клітин. Клітини культивували у 96-лунковому планшеті. 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 чотирьох групах росли протягом 24, 48 та 72 год. Наприкінці зазначеного часу до кожної лунки у межах певної групи клітин додавали МТТ ("Sigma-Aldrich", США) і проводили інкубацію протягом 3 год при 37°C. Поглинання розчиненого в ДМСО формагану вимірювали за довжини хвилі 570 нм використовуючи прилад Bio Tek 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, відносне значення якого приймали за одиницю. Експеримент проводили у трьох незалежних повторах для кожної клітинної лінії.

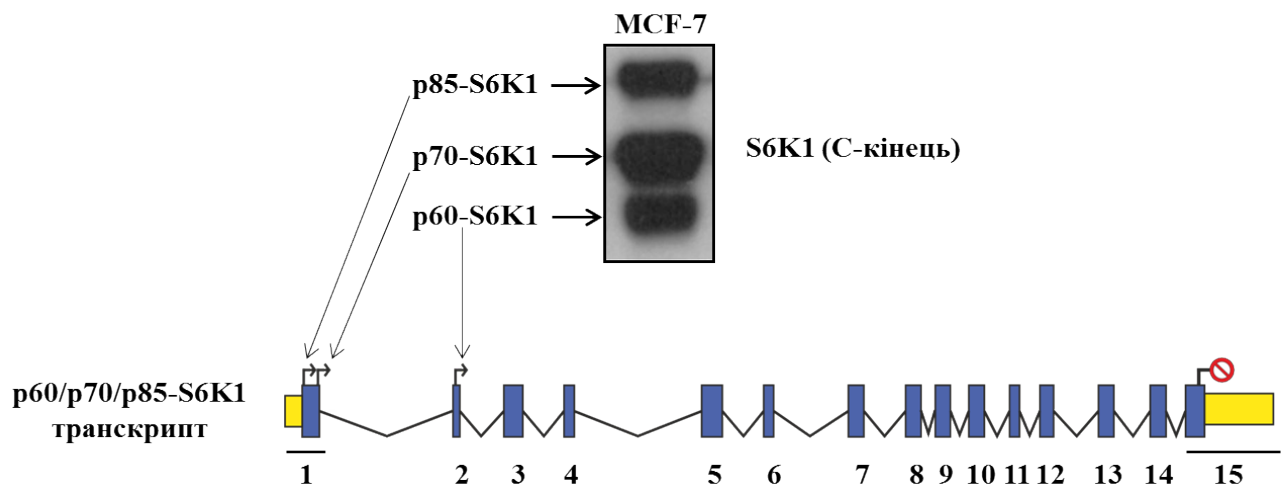
Статистичний аналіз. Для статистичного аналізу експериментальних даних використовували програми OriginPro 8 ("StatSoft Inc.", США) та Excel (MS Office 2010) ("Microsoft Corporation", США). Результати експериментів були представлені у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  стандартне відхилення. Різницю 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.

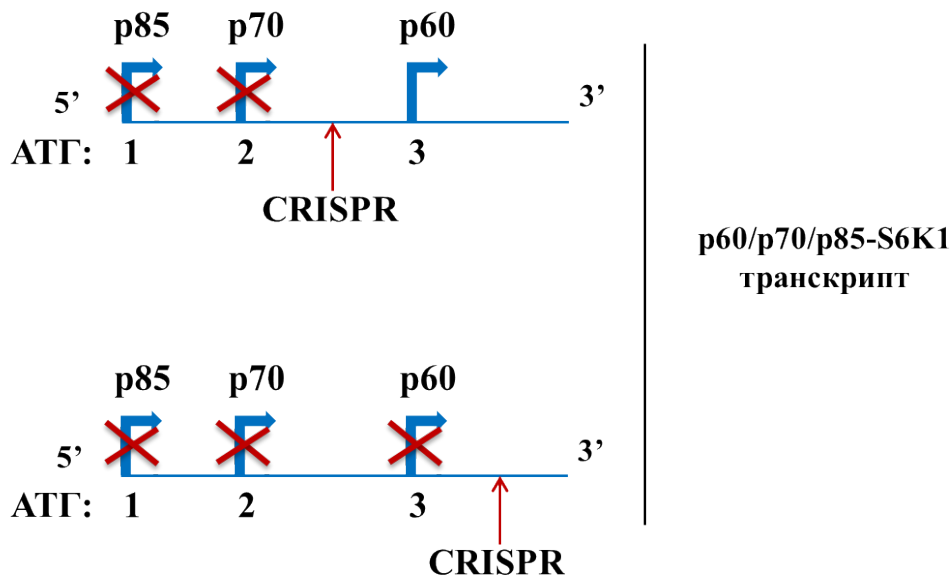
### Результати досліджень та їх обговорення

**Визначення механізму експресії ізоформи p60-S6K1 у клітинах з використанням клітинних ліній HEK-293 та MCF-7.** Літературні дані свідчать про те, що ген S6K1 кодує дві основні білкові ізоформи, p85-S6K1 та p70-S6K1, які транлюються зі спільного транскрипту шляхом використання альтернативних стартових кодонів (Fenton *et al.*, 2011). Ізоформа p85-S6K1 транлюється з першого стартового кодону, у той час як синтез p70-S6K1 ініціюється з наступного стартового кодону (рис. 1). Між тим, існує припущення, що третій стартовий кодон у домінантному транскрипті може гіпотетично ініціювати трансляцію іншої S6K1 ізоформи, p60-S6K1 (рис. 1), яка буде вкороченою з N-кінця на 54 а.з. порівняно з p85-S6K1 (Kim *et al.*, 2009). Однак автори також не виключали, що гіпотетична ізоформа p60-S6K1 може бути продуктом обмеженого протеолізу домінантних ізоформ p70- та p85-S6K1.



**Рис. 1.** Схема альтернативної трансляції ізоформ S6 кінрази 1, p60, p70 та p85, з домінантного транскрипту S6K1. Найдовша ізоформа p85-S6K1 (525 а.з.) транлюється 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, теоретично 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; ■ конститутивний кодон, ■ 5'/3'-UTR, ↗ стартовий кодон, / стоп кодон

Таким чином, наше перше завдання полягало в тому, щоб з'ясувати чи є ізоформа p60-S6K1 продуктом трансляції з третього альтернативного стартового кодону, чи вона є продуктом обмеженого протеолізу ізоформ p85- та p70-S6K1. 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 блокування експресії ізоформ p85- та p70-S6K1, однак не вплинути на експресію ізоформи p60-S6K1 (рис. 2). Так само, внаслідок порушення послідовності гена S6K1 після третього стартового кодону в межах кодуєчої послідовності можна отримати клітини із заблокованою експресією усіх трьох ізоформ (рис. 2).



**Рис. 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 кодуєчої послідовності гена S6K1 між другим і третім стартовими кодонами), або всіх трьох ізоформ (послідовність gRNA комплементарна ділянці кодуєчої послідовності гена S6K1 після третього стартового кодону)

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<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> (рис. 3а). Аналогічно, редагування нуклеотидної послідовності після третього старту трансляції призводило до блокування експресії усіх трьох S6K1 ізоформ (рис. 3б) і, відповідно, p60<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> фенотипу клітин.

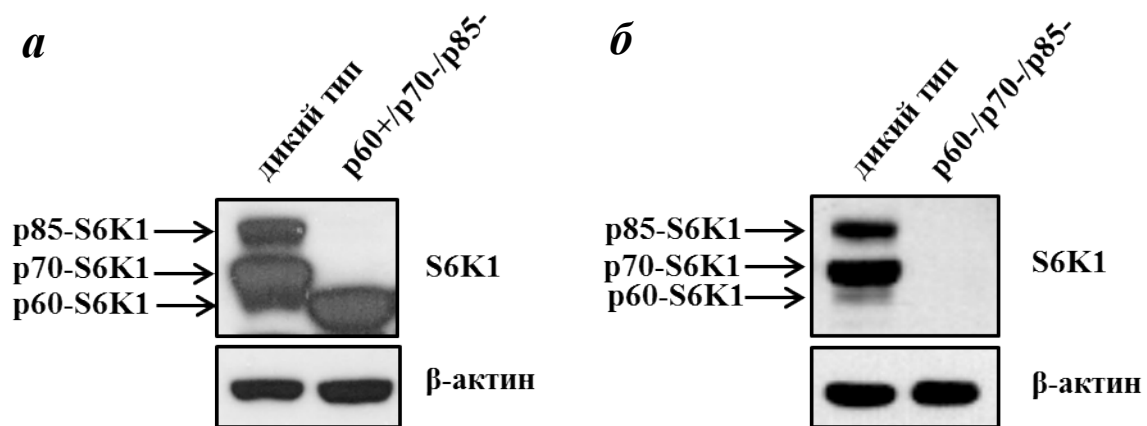


Рис. 3. Створення клітинних ліній HEK-293 із селективною експресією ізоформи p60-S6K1 (p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> HEK-293) та з вимкненою експресією ізоформ S6K1 – p60, p70 та p85 (p60<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> HEK-293). У досліджуваних клітинах проводили редагування 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<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> HEK-293. *б* – вестерн-блот аналіз експресії ізоформ S6K1 в клітинах p60<sup>-</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup> HEK-293. Антитіла і праймери проти β-актину використовували для контролю нанесення однакової кількості зразків

Подальший біоінформатичний аналіз із використанням бази даних NCBI Reference Sequence Database дозволив виявити крім того сплайсовий варіант S6K1 (NM\_001272044.1, RefSeq, NCBI) [надалі “транскрипт p60-S6K1”], який гіпотетично може бути матрицею для синтезу ізоформи p60-S6K1. Цей транскрипт містить інсерцію між екзонами 1 і 2 розміром 129 п.о. (екзон 1a), у межах якої розташований стоп-кодон, завдяки чому має відбутися рання термінація трансляції ізоформ p85- та p70-S6K1 (рис. 4). Однак, з цього транскрипту гіпотетично може транслюватися повнорозмірна ізоформа p60-S6K1.

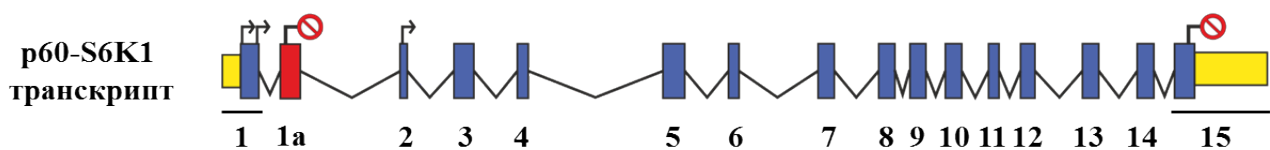
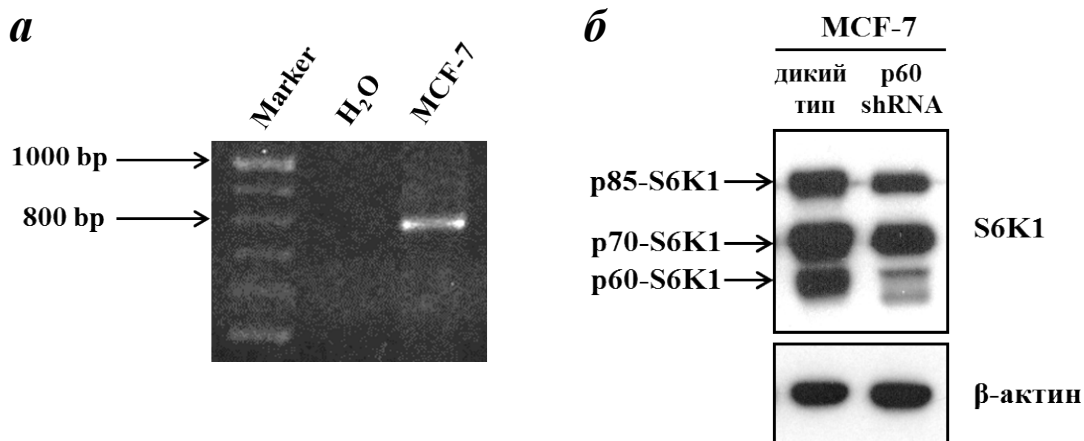


Рис. 4. Схематичне зображення сплайсового варіанту p60-S6K1, який відповідає за синтез ізоформи p60-S6K1. Транскрипт p60-S6K1 містить додатковий екзон (позначений як 1a), який відсутній у домінантного транскрипту p60/p70/p85-S6K1. У межах екзону 1a у відкритій рамці зчитування знаходиться стоп-кодон, який, у свою чергу, ініціює ранню термінацію трансляції ізоформ p70 та p80. Таким чином, можливою залишається лише ініціація трансляції тільки ізоформи p60 з наступного, третього, стартового кодону; ■ конститутивний екзон, ■ альтернативний екзон, ■ 5'/3'-UTR, ↗ стартовий кодон, ⊘ стоп кодон

Таким чином, отримані результати є першим експериментальним підтвердженням того, що ізоформа р60-S6K1 є саме продуктом трансляції мРНК, ініціація якої відбувається з третього стартового кодону, а не виникає внаслідок протеолітичного розщеплення домінантних ізоформ р70/р85-S6K1 на рівні білка.

З метою підтвердження існування окремого для р60-S6K1 транскрипту в клітинах раку молочної залози MCF-7 було застосовано метод ЗТ-ПЛР аналізу (рис. 5а). Для ПЛР детекції один з праймерів був специфічним до ДНК послідовності екзону 1а. Результати секвенування ПЛР продукту показали, що ампліфікований ДНК фрагмент відповідає нуклеотидній послідовності транскрипту р60-S6K1, яка була знайдена у базі даних NCBI Reference Sequence Database.

Для перевірки гіпотези, що ідентифікований транскрипт може відповідати за синтез ізоформи р60-S6K1 було застосовано технологію РНК-інтерференції. Для цього використовували shRNA, яка є комплементарною послідовності специфічного для р60-S6K1 транскрипту екзона 1а і, відповідно, мішенню для РНК інтерференції. Вестерн-блот аналіз клітин MCF-7, які стабільно експресують shRNA, специфічну до транскрипту р60-S6K1, виявив значне пригнічення експресії р60-S6K1 на білковому рівні порівняно з контрольними клітинами дикого типу (рис. 5б).



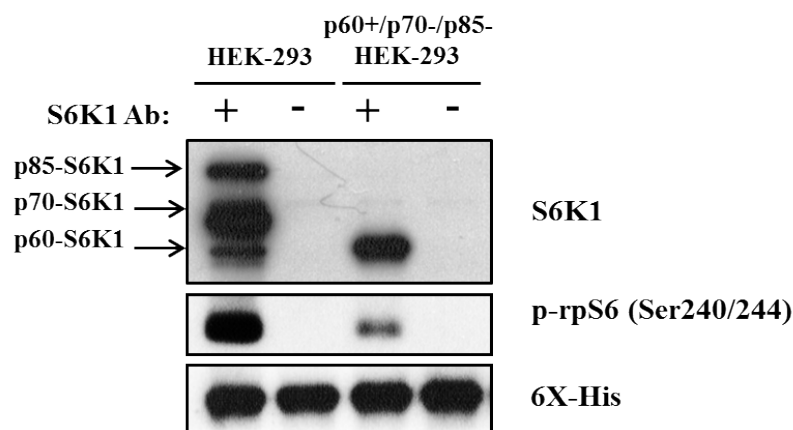
**Рис. 5.** Ідентифікація в клітинах MCF-7 нового сплайсового варіанту мРНК S6K1, який відповідає за трансляцію ізоформи р60-S6K1. *a* – ПЛР детекція сплайсового варіанту р60-S6K1 в клітинній лінії MCF-7. Для ПЛР аналізу була задіяна пара праймерів, серед яких прямий є специфічним до ділянки екзону 1а (входить до складу тільки транскрипту р60-S6K1), у той час як зворотній – до ділянки екзону 9 (входить до складу р60-S6K1 та домінантного S6K1 транскрипту). *б* – вестерн-блот аналіз експресії ізоформ S6K1 за shRNA-опосередкованого пригнічення експресії транскрипту р60-S6K1 в клітинній лінії MCF-7. Отримані клітини, які стабільно експресують р60-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 білку

Таким чином, нами було встановлено, що транскрипт р60-S6K1 може бути відповідальним за трансляцію ізоформи р60-S6K1. Отримані результати

також дають змогу припустити, що трансляція з альтернативно сплайсованого 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. Однак, трансляція ізоформи p60-S6K1 з домінантного транскрипту 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 як від типу клітин, так і фізіологічних умов. Дійсно, із застосуванням ПЛР аналізу нами встановлено, що рівень експресії транскрипту p60-S6K1 суттєво варіює в клітинах різних ліній. Крім того, експресія транскрипту p60-S6K1 не корелювала з експресією домінантної мРНК S6K1, вказуючи на існування незалежної від p70/p85-S6K1 функції ізоформи p60-S6K1 як в нормальній клітинній фізіології так можливо і за патологій, які пов'язані з дисфункцією S6K1.

Отримані результати також показали невідповідність профілів експресії транскрипту p60-S6K1 та відповідного білкового продукту в різних типах клітин, що може бути пояснено існуванням щонайменше двох шляхів синтезу p60-S6K1, адже ця ізоформа може також транслюватися з домінантного p60/p70/p85-S6K1 транскрипту.

**Дослідження активності ізоформи p60-S6K1 та її регуляції з використанням модельних клітин НЕК-293, які вибірково експресують p60-S6K1.** З'ясування функціональної активності p60-S6K1 в клітині вимагало аналізу її ензиматичної активності. Слід зазначити, що ізоформа p60-S6K1 має вкорочений N-кінцевий регуляторний домен, в межах якого розташований TOS мотив, який є відповідальним за зв'язування S6K1 з mTOR кіназою, що є одним із ключових регуляторів активності p60-S6K1. Отже, це ставить під питання mTOR-залежне фосфорилювання p60-S6K1 за одним із ключових для активності S6K1 сайтів фосфорилювання – Thr389 і, відповідно, активність p60-S6K1.



**Рис. 6.** 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

Кіназну активність р60-S6K1 було проаналізовано за допомогою *in vitro* кіназної реакції з використанням рекомбінантного рибосомного білка рS6 як субстрату. Для цього р60-S6K1 було імунопреципітовано з клітин р60<sup>+</sup>/р70<sup>-</sup>/р85<sup>-</sup> HEK-293. Результати кіназного тесту демонструють, що ізоформа р60-S6K1 виявляє кіназну активність і здатна фосфорилувати рS6 *in vitro* (рис. 6). Таким чином, постає питання щодо відповідності механізмів регуляції активності р60-S6K1 тим, що існують для р70 та р85 ізоформ S6K1 і, в першу чергу, існування mTOR-залежної регуляції.

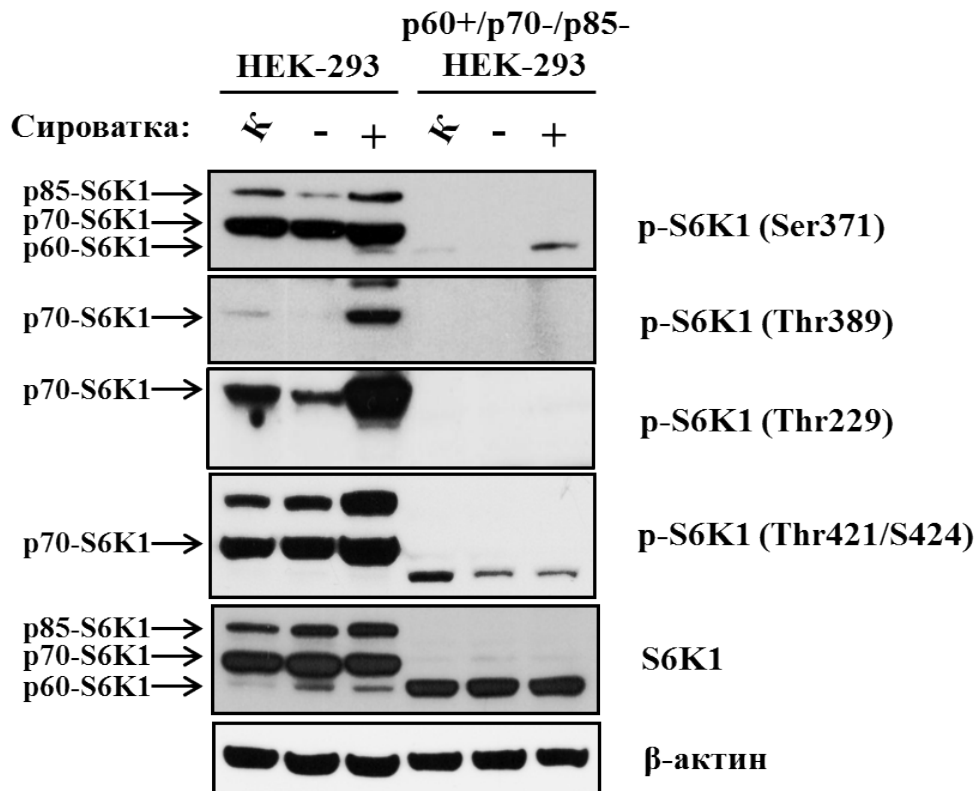


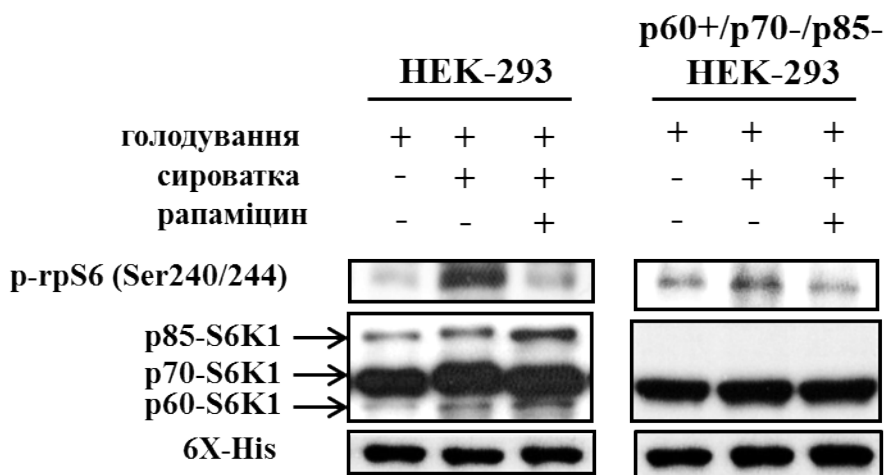
Рис. 7. Стан фосфорилування ізоформи р60-S6K1 за ключовими для активації та кіназної активності сайтами у клітинній лінії HEK-293. Клітини HEK-293 дикого типу та р60<sup>+</sup>/р70<sup>-</sup>/р85<sup>-</sup> HEK-293 підлягали голодуванню у культуральному середовищі без сироватки протягом 24 год. Після цього, клітини були стимульовані 20% сироваткою протягом 1 години. Клітинні лізати аналізували за допомогою вестерн-блоту з використанням зазначених антитіл. Для контролю нанесення аналізували вміст β-актину. Усі зазначені сайти фосфорилування відповідають ізоформі р70-S6K1

Для з'ясування поставленого запитання було перевірено статус фосфорилування р60-S6K1 за низкою сайтів залучених до активації S6K1, серед яких PDK- та mTOR-залежні сайти Thr229 та Thr389, відповідно, необхідні для кінцевої, остаточної активації S6K1. Аналіз рівнів фосфорилування р60-S6K1 в клітинній лінії р60<sup>+</sup>/р70<sup>-</sup>/р85<sup>-</sup> HEK-293 за різних умов росту клітин показав, що р60-S6K1 не підлягає фосфорилуванню за Thr199 та Thr359 сайтами (відповідно Thr229 та Thr389 для р70-S6K1), проте, фосфорилується за Ser341 та С-кінцевими сайтами Thr391/Ser394 (Ser371 та

Thr421/Ser424 для p70-S6K1) (рис. 7). Однак, було встановлено, що динаміка фосфорилування С-кінцевих сайтів Thr391/Ser394 у часі при активації mTORC1 сигналіngu відрізняється від такої для ізоформ p70/p85-S6K1. Таким чином, згідно отриманих даних, кіназна активність p60-S6K1 у клітинах p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>НЕК-293 може регулюватися за допомогою механізмів, які є відмінними від таких для p70/p85-S6K1.

На відміну від представлених вище результатів за даними літератури у клітинній лінії MCF-7 p60-S6K1 фосфорилується за сайтом Thr359 (Thr389 для p70-S6K1) (Kim *et al.*, 2009). При аналізі стану фосфорилування p60-S6K1 в клітинах MCF-7 за різних умов росту клітин, нами так само було виявлено наявність фосфорилування за mTORC1-регульованим сайтом Thr359. Нами також було встановлено, що ізоформа p60-S6K1 в клітинах MCF-7 також фосфорилується за PDK-регульованим сайтом Thr199 (Thr229 для p70-S6K1). Різниця у стані фосфорилування p60-S6K1 в клітинах НЕК-293 та MCF-7 ймовірно полягає у тому, що ізоформа p60-S6K1 підлягає різним способам регуляції активності і можливо виконує різні функції в залежності від типу клітин.

Приймаючи до уваги відсутність фосфорилування p60-S6K1 у клітинах p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>НЕК-293 за ключовими для активності сайтами було зроблено припущення, що ізоформа p60-S6K1 є нечутливою до PI3K/mTORC1-залежного сигналювання, щонайменше в клітинній лінії НЕК-293.



### *in vitro* кіназна реакція

Рис. 8. Кіназна активність ізоформи p60-S6K1 у клітинах НЕК-293 не залежить від активності mTORC1. Клітини вказаних ліній вирощували в середовищі без сироватки протягом 24 год, інкубували у присутності 20 нМ рапаміцину і далі стимулювали 20% сироваткою протягом 1 години. Ізоформи S6K1 були виділені з лізатів методом імунопреципітації з використанням антитіл проти С-кінця S6K1. Імунопреципітована S6K1 і 6X-His-rpS6 як субстрат були використані в *in vitro* кіназній реакції, аналіз якої було проведено за допомогою вестерн-блоту з використанням вказаних антитіл

Тому, надалі ми порівнювали ефект мітогенної стимуляції клітин сироваткою та інгібування mTOR кінази рапаміцином на активність p70/p85-S6K1 та p60-S6K1 в клітинах НЕК-293 дикого типу та p60<sup>+</sup>/p70-/p85-НЕК-293, відповідно. Для визначення активності S6K1 ізоформ використовували *in vitro* кіназну реакцію. Результати експерименту показали, що рівень активності p60-S6K1 суттєво не змінювався як за умов голодування, так і за умови стимуляції сироваткою або ж інгібування mTOR рапаміцином (рис. 8). Навпроти, активність ізоформ p70- та p85-S6K1 зростала у відповідь на мітогенну стимуляцію клітин і пригнічувалася за умови дії рапаміцину, як і очікувалося (рис. 8).

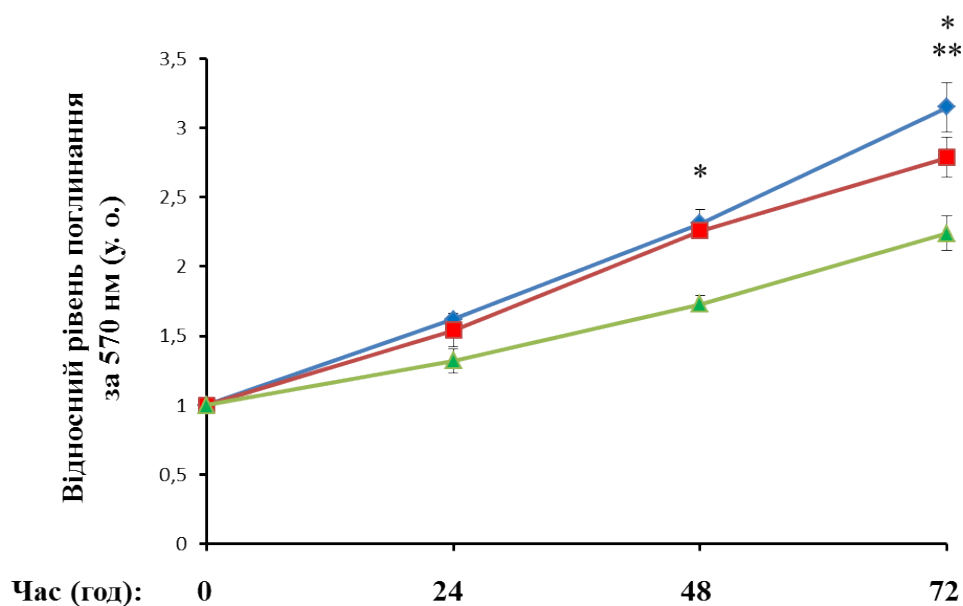
Таким чином, експериментальні дані вказують на те, що ізоформа p60-S6K1 не підлягає регуляції через PI3K/mTORC1 сигнальний шлях в клітинах НЕК-293, що узгоджується з результатами дослідження стану фосфорилування p60-S6K1 за ключовими для активності сайтами.

**Роль ізоформи p60-S6K1 у функціонуванні клітин лінії НЕК-293 у контексті PI3K/mTOR-регульованих клітинних процесів.** Існування розбіжностей в механізмі регуляції активності p85/70 та p60 ізоформ S6K1 вказує на можливі відмінності функціональної ролі ізоформ кіназ. Нами було проаналізовано вплив селективної експресії p60-S6K1 на процеси міграції та проліферації в клітинах p60<sup>+</sup>/p70-/p85-НЕК-293. Ці фундаментальні клітинні процеси, за даними літератури, знаходяться під контролем mTOR/S6K1-залежного сигнального каскаду.

Згідно отриманих даних блокування експресії всіх ізоформ S6K1 призводило до суттєвого зниження рівня проліферації та локомоторних властивостей клітин лінії p60-/p70-/p85-НЕК-293 порівняно з клітинами дикого типу (рис. 9, 10). При цьому експресія p60-S6K1 в клітинах p60<sup>+</sup>/p70-/p85-НЕК-293 мала компенсаторний ефект, оскільки майже повністю відновлювала рівень проліферації та швидкість міграції досліджуваних клітин. Аналіз же рівнів фосфорилування деяких субстратів S6K1, що залучені до регуляції трансляції, а саме фактора трансляції eIF4B, кінази фактора елонгації eEF-2K та рибосомного білка S6, показав, що блокування експресії ізоформ S6K1 не мало суттєвого впливу на фосфорилування зазначених субстратів і, відповідно, на їхню активність як у клітинах p60-/p70-/p85-НЕК-293, так і в p60<sup>+</sup>/p70-/p85-НЕК-293. Можливо це пов'язано з тим, що окрім S6K1, усі досліджувані білки є мішенями для кількох інших AGC кіназ, зокрема RSK та S6K2. Таким чином, відсутність значних змін у рівнях фосфорилування субстратів у досліджуваних клітинах можна пояснити компенсаторним ефектом зі сторони інших кіназ. Цікаво, що аналіз активності за рівнем фосфорилування одного з ключових регуляторів міграції клітин – Akt виявив зниження її фосфорилування, а значить і активності в обох клітинних лініях p60<sup>+</sup>/p70-/p85-НЕК-293 та p60-/p70-/p85-НЕК-293. Однак, у клітинах з вибірковою експресією p60-S6K1 такий ефект спостерігався лише за умови росту за відсутності мітогенних стимулів. Отже, як видно з результатів дослідження, ізоформа p60-S6K1 може бути прямо або опосередковано залученою до регуляції активності Akt.



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. Аналіз клітин карциноми молочної залози MCF-7 з фенотипами  $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$  та  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ , що були отримані у відділі сигнальних систем клітини із застосуванням адаптованої для клітин HEK-293 CRISPR/Cas9 технології, свідчить про те, що саме експресія ізоформи  $p60$  позитивно впливає на зазначені показники і, на відміну від клітин HEK-293, має не просто компенсаторний, а стимулюючий ефект, адже швидкість міграції при цьому підвищувалася втричі порівняно з клітинами HEK-293 дикого типу. Крім того, клітини набували фібробластоподібної форми, що є характерною для



**Рис. 9.** Вплив експресії ізоформ S6K1 на проліферативну активність клітин HEK-293. Клітини HEK-293, які вибірково експресують ізоформу  $p60$ -S6K1, майже повністю відновлюють проліферативну активність, що суттєво пригнічена в клітинах  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293. Швидкість проліферації клітинних ліній HEK-293,  $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293 та  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293 визначали за допомогою МТТ тесту. Дані представляють середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення з трьох незалежних експериментів. \*  $p < 0.005$ ,  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293 проти HEK-293 і  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293 проти  $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293, \*\*  $p < 0.05$ ,  $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293 проти HEK-293; —◆— HEK-293, —■—  $p60^{+}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293, —▲—  $p60^{-}/p70^{-}/p85^{-}$ -HEK-293.

мезенхімальних клітин, які мають високий потенціал до міграції та інвазії оточуючих тканин. Таким чином, нами було зроблено припущення, що вибіркова експресія ізоформи  $p60$ -S6K1 з одночасним пригніченням експресії ізоформ  $p70$ - та  $p85$ -S6K1 може ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід в клітинах MCF-7.

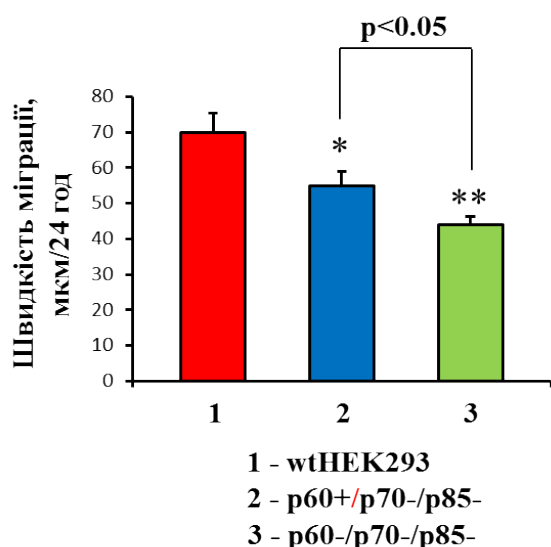


Рис. 10. Аналіз клітинної міграції за допомогою методу “раневої поверхні” виявляє часткове відновлення швидкості міграції клітин p60+/p70-/p85-НЕК-293 у порівнянні з клітинами p60-/p70-/p85-НЕК-293. Конфлюентним клітинам НЕК-293, p60+/p70-/p85-НЕК-293 та p60-/p70-/p85-НЕК-293 робили “подряпину” і фотографували одразу після проведення подряпини та через 24 год. Столбці є середнім значенням  $\pm$  стандартне відхилення для трьох незалежних експериментів. \* ( $p < 0.05$ ) \*\* ( $p < 0.01$ ) проти НЕК-293

Дослідження впливу селективної експресії p60-S6K1 на ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах НЕК-293 та MCF-7. Для перевірки припущення про ініціацію епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах p60+/p70-/p85-MCF-7 із застосуванням ПЛР в реальному часі було досліджено рівень експресії низки маркерних генів, а саме *VIM* (віментину), *CDH1* (Е-кадгерину), *CDH2* (N-кадгерину), транскрипційних факторів TWIST1, SNAI1 та ZEB2 і таким чином підтверджено, що клітини MCF-7 набувають ознак мезенхімального фенотипу за вибіркової експресії ізоформи p60-S6K1 (рис. 11).

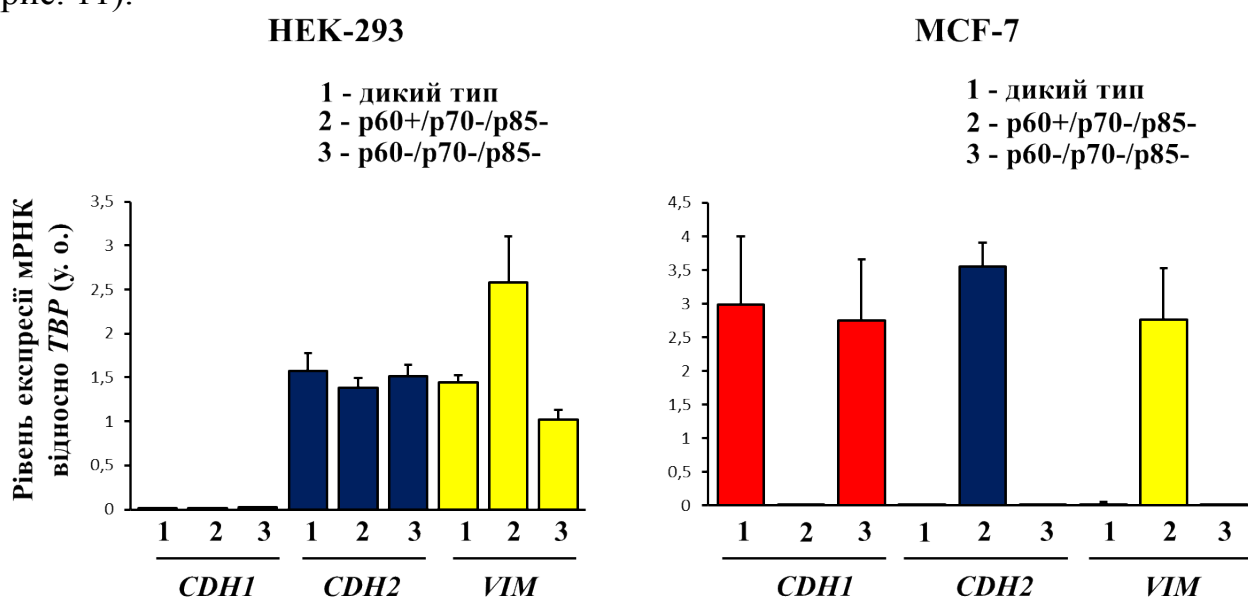
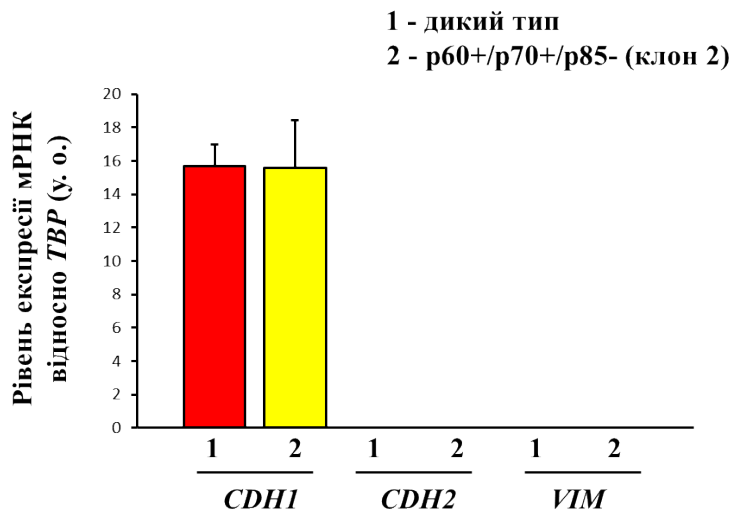


Рис. 11. Кількісний ПЛР аналіз рівнів експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в зазначених клітинних лініях. Як референтний використовували ген *TBP*, відносно якого проводився розрахунок експресії цільових генів. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували  $\Delta C_t$  метод розрахунку. *CDH1* - Е-кадгерин, *CDH2* - N-кадгерин, *VIM* - віментин

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 моделі p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>-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 з'ясування цього питання нами було створено модельну клітинну лінію p60<sup>+</sup>/p70<sup>+</sup>/p85<sup>-</sup>-MCF-7 за допомогою CRISPR/Cas9 системи редагування генів з метою вимкнення експресії 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 (рис. 12).

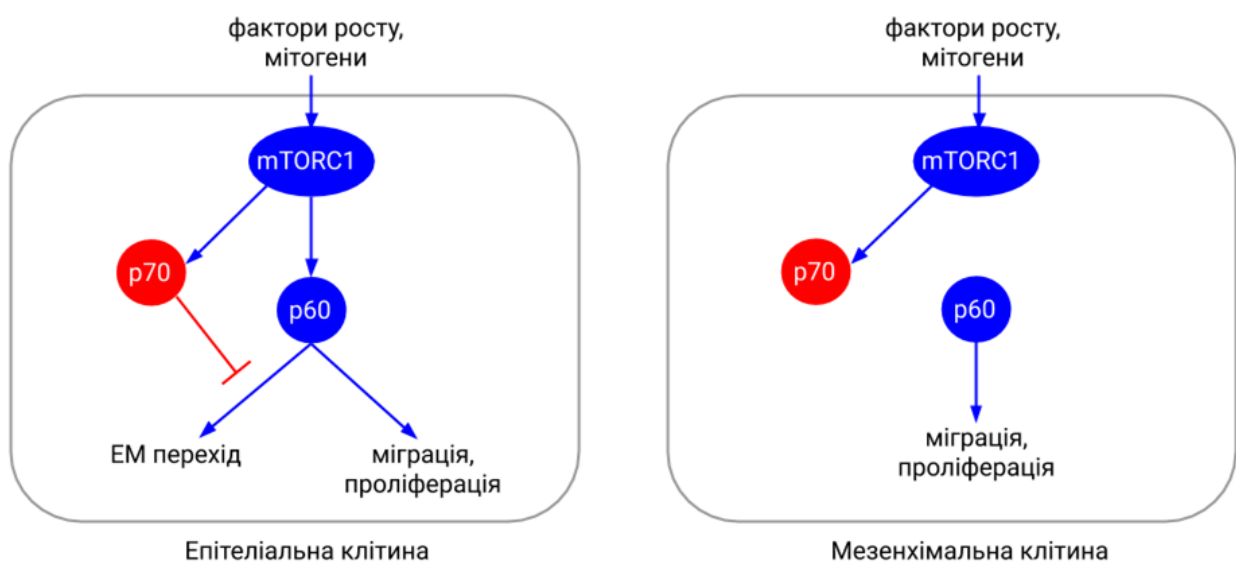


**Рис. 12.** Кількісний ПЛР аналіз рівнів експресії маркерних генів епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах лінії p60<sup>+</sup>/p70<sup>+</sup>/p85<sup>-</sup>-MCF-7. Як референтний використовували ген *TBP*. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували  $\Delta C_t$  метод розрахунку. *CDH1* - E-кадгерин, *CDH2* - N-кадгерин, *VIM* - віментин

Таким чином, можна припустити, що негативний вплив на індукуючу активність p60-S6K1 в клітинах MCF-7 опосередковується ізоформою p70-S6K1, 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. Однак остаточну відповідь на це запитання можна дати дослідивши клітини з вимкненою експресією лише p70-S6K1 ізоформи, що поки є технічно складним завданням.

Як підсумок можна зазначити, що експресія ізоформи p60-S6K1 може відбуватися щонайменше з двох різних транскриптів. У першому випадку, синтез p60-S6K1 здійснюється через альтернативну трансляцію з третього стартового кодону в межах домінантного S6K1 транскрипту. В іншому випадку,

для синтезу p60-S6K1 використовується окремий сплайсовий варіант, який продукує тільки p60-S6K1. В результаті синтезується ізоформа S6K1, яка має кіназну активність, однак механізм регуляції цієї активності залежить від типу клітини (рис. 13). Так, в клітинах НЕК-293 активність ізоформи p60-S6K1 не регулюється через PI3K/mTORC1 сигнальний каскад на відміну від p70/p85-S6K1. В той самий час модуляція активності p60-S6K1 через фосфорилування в клітинній лінії MCF-7 напевно відбувається подібно до ізоформ p70- та p85-S6K1. Функціональний аналіз p60-S6K1 дає підстави вважати, що ця ізоформа може виконувати функції не властиві p70/p85-S6K1 ізоформам, що пов'язані з ініціацією 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 умов 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 у клітині (рис. 13), 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. 13.** Гіпотетична схема функціональної активності ізоформи p60-S6K1 у клітині

Результати досліджень дозволяють припустити, 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 p60 ізоформи S6K1, що полягають у використанні третього альтернативного старту трансляції спільної для p70/p85S6K1 ізоформ мРНК та/чи нової сплайсової мРНК специфічної виключно для p60-S6K1. Встановлено, що в залежності від типу клітини активність p60-S6K1 може бути мітоген-регульованою або, на відміну від відомих p70/p85-S6K1 ізоформ, мітоген-незалежною. На основі аналізу модельних клітинних ліній HEK-293 та MCF-7 із диференційною експресією ізоформ S6K1 показано відмінності її функціональної активності порівняно з p70 та p85 ізоформами кінази. Аналогічно до p70/p85-S6K1, ізоформа p60-S6K1 залучена до регуляції S6K1-залежних клітинних процесів, стимулюючи проліферацію та міграцію клітин, однак в залежності від типу клітин може виконувати унікальну функцію в ініціації програми епітеліально-мезенхімального переходу.

1. Встановлено 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 стартових кодонів, що є специфічними для p70 та p85 ізоформ кінази.
2. Вперше експериментально доведено, що ізоформа p60-S6K1 може експресуватися в результаті трансляції окремого сплайсового варіанту мРНК S6K1. Отримані результати не виключають існування механізму експресії p60-S6K1 шляхом альтернативної трансляції з використанням третього альтернативного стартового кодону у межах домінантного p70/p85-S6K1 транскрипту.
3. Вперше показано, що p60-S6K1 має кіназну активність подібно до p70- та p85-S6K1 ізоформ за умов *in vitro*.
4. Встановлено, що ізоформа p60-S6K1 у клітинах HEK-293 не підлягає фосфорильованню за ключовими для активності p70/p85-S6K1 ізоформ PDK1- та mTORC1-регульованими сайтами, на відміну від клітин MCF-7, у яких таке фосфорильовання спостерігається.

5. З'ясовано, що активність p60-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 p60-S6K1 на процеси клітинної міграції та проліферації клітин HEK-293.
7. Показано здатність експресії ізоформи p60-S6K1 за пригніченої експресії домінантних ізоформ p70- та p85-S6K1 ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід у клітинах лінії раку молочної залози людини MCF-7.
8. Встановлено, що вимкнення експресії лише ізоформи p85-S6K1 у клітинах MCF-7 не призводить до епітеліально-мезенхімального переходу.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті:

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. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису)*
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. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису)*
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. *(Особистий внесок здобувача: динаміка міграції MCF-7 клітин з 3D сфероїдів на ростову поверхню)*
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. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису)*

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. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису*)

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. (*Особистий внесок здобувача: участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів*)

#### **Тези:**

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 – XI<sup>th</sup> 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 – XI<sup>th</sup> 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. 15<sup>th</sup> Horizons In Molecular Biology, 10<sup>th</sup> – 13<sup>th</sup> 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.

## АНОТАЦІЯ

**Заєць І.В. Механізм експресії, регуляція активності та функціональне значення у 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.*

Дисертація присвячена вивченню механізмів експресії, особливостей регуляції та функціональної ролі в клітині нової ізоформи S6 кінази 1 – p60-S6K1. В результаті роботи було встановлено, що експресія p60-S6K1 може відбуватися щонайменше з двох різних транскриптів: домінантного S6K1 транскрипту через альтернативну трансляцію з третього стартового кодону та/або транслюватися на основі специфічного p60-S6K1 транскрипту. Було визначено, що ізоформа p60-S6K1 виявляє кіназну активність, активність якої може бути конститутивною або мітоген-регульованою в залежності від типу клітини. Показано, що в клітинах HEK-293, на відміну від клітин MCF-7, p60-S6K1 не підлягає фосфорилуванню за ключовими для кіназної активності сайтами Thr229 та Thr389 і, таким чином, не відповідає на сигнали від mTORC1-залежного сигнального шляху. Показано, що ізоформа p60-S6K1 здатна позитивно регулювати проліферацію та міграцію клітин HEK-293. Виявлено, що в залежності від типу клітин p60-S6K1 здатна виконувати незалежну від S6K1 функцію, виступаючи у ролі ініціатора програми епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах MCF-7. Співвідношення експресії ізоформ S6K1, p60- та p70-S6K1, потенційно може слугувати діагностичним маркером пухлинних клітин, в яких відбувся епітеліально-мезенхімальний перехід.

**Ключові слова:** кіназа 1 рибосомного білка S6, mTORC1-залежний сигнальний шлях, ізоформа p60-S6K1, експресія ізоформ S6K1

## 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.*

The thesis is devoted to the study of mechanisms of expression and regulation, and functional significance in a cell of the novel ribosomal protein S6 kinase 1 isoform - p60-S6K1. It was established that expression of p60-S6K1 can result from at least two different transcripts: the predominant S6K1 transcript via alternative translation using the third in-frame start codon and/or specific p60-S6K1 transcript. The data revealed that the p60-S6K1 isoform possesses kinase activity that can be either constitutive or mitogen-regulated depending on a cell type. Results demonstrated that p60-S6K1 is not subjected to phosphorylation on critical-for-kinase-activity sites Thr229 та Thr389 and, therefore, does not respond to mTORC1-dependent signaling. The p60-S6K1 isoform was shown to be able to exert positive effect on cell proliferation and migration in HEK-293 cells. It was revealed that p60-S6K1 can perform S6K1-independent function of initiation of the epithelial-mesenchymal transition in MCF-7 cells. The ratio of p60- and p70-S6K1 expression can be considered as a prospective diagnostic marker of cancer cells undergone the epithelial-mesenchymal transition.

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

## АННОТАЦИЯ

**Заец И.В. Механизм экспрессии, регуляция активности и функциональное значение в клетке новой изоформы киназы рибосомного белка S6 – p60-S6K1.** - 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 Национальной Академии Наук Украины, ННЦ «Институт биологии и медицины» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, 2019.*

Киназа рибосомного белка S6 (S6K1) является одним из ключевых компонентов PI3K/mTOR/S6K1-зависимого сигнального пути. Под контролем данного сигнального каскада находятся такие клеточные процессы, как трансляция, клеточные рост, выживание, пролиферация и миграция. Нарушения в функционировании mTOR/S6K1 сигнального пути сопровождают множество патологических состояний, включая онкологические, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, метаболические расстройства, гипертрофию органов и др. Ген S6K1 кодирует несколько изоформ, среди которых наиболее изученные p85-S6K1 та p70-S6K1, которые транслируются с единого, доминантного, транскрипта используя соответственно первый и второй стартовый кодоны, а также гипотетическая изоформа p60-S6K1. Функциональные особенности и механизмы регуляции активности p60-S6K1 остаются непонятными. Также неизвестно является ли данная изоформа

продуктом протеолиза изоформ р70/р85-S6K1, или же возникает в результате трансляции мРНК с третьего стартового кодона.

Для подтверждения гипотезы трансляции изоформы р60-S6K1 с третьего стартового кодона была задействована система редактирования генома CRISPR/Cas9. Результаты показали, что редактирование нуклеотидной последовательности в клетках HEK-293 между вторым и третьим стартами трансляции приводило к выключению экспрессии р70/р85-S6K1 изоформ и сохранению экспрессии р60-S6K1. Подобным же образом, редактирование нуклеотидной последовательности после третьего старта трансляции приводило к выключению экспрессии всех трех изоформ. Таким образом, было показано, что изоформа р60-S6K1 может транслироваться с третьего стартового кодона мРНК S6K1 и не является продуктом протеолитического расщепления изоформ р85- и р70-S6K1.

При помощи методов ПЦР анализа и ДНК секвенирования было идентифицировано в клеточной линии MCF-7 новый сплайсовый вариант мРНК S6K1, который отвечает за экспрессию р60-S6K1. Специфическая shRNA, направленная на транскрипт р60-S6K1, приводила к значительному подавлению экспрессии изоформы р60-S6K1 в клетках MCF-7.

Используя *in vitro* киназную реакцию было обнаружено, что изоформа р60-S6K1 имеет киназную активность и способна фосфорилировать *gpS6 in vitro*. Было установлено, что изоформа р60-S6K1 в клетках HEK-293 не подлежит фосфорилированию по ключевым для киназной активности PDK1- и mTORC1-регулируемым сайтам, в отличие от р70/р85-S6K1. В клетках MCF-7, наоборот, наблюдалось фосфорилирование р60-S6K1 по указанным критическим сайтам сравнимое с таким для доминантных изоформ р70/р85-S6K1. Было обнаружено, что активность р60-S6K1 в HEK-293 является нечувствительной к стимуляции митогенами и обработке клеток ингибитором mTOR рапамицином, что предполагает наличие PI3K/mTORC1-независимого механизма регуляции активности изоформы р60-S6K1 в клетках HEK-293.

Для определения роли р60-S6K1 в функциональной активности клеток HEK-293 в контексте PI3K/mTORC1-регулируемых клеточных процессов было проанализировано влияние селективной экспрессии изоформы р60-S6K1 на процессы клеточной пролиферации и миграции, которые являются mTORC1/S6K1-зависимыми. Результаты исследования продемонстрировали, что блокирование экспрессии всех изоформ S6K1 в клетках HEK-293 приводит к снижению уровня пролиферации и скорости миграции. В то же время, выборочная экспрессия р60-S6K1 в HEK-293 имеет компенсаторный эффект на данные процессы, почти полностью восстанавливая скорость пролиферации и миграции.

Было обнаружено, что селективная экспрессия р60-S6K1 при условии подавленной экспрессии изоформ р70/р85-S6K1 в клеточной линии MCF-7 способна инициировать программу эпителиально-мезенхимального перехода. Данное явление было доказано при помощи количественного ПЦР анализа уровней экспрессии маркерных генов эпителиально-мезенхимального перехода,

включая *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *TWIST1*, *SNAIL1* и *ZEB2*. Поскольку в клетках p60<sup>+</sup>/p70<sup>-</sup>/p85<sup>-</sup>MCF-7 отсутствует экспрессия обеих p70- и p85-S6K1 изоформ, то оставалось неясным какая из двух изоформ осуществляет негативное влияние на способность p60-S6K1 индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход. Для решения поставленного вопроса при помощи технологии CRISPR/Cas9 была создана модельная клеточная линия MCF-7 с выключенной экспрессией изоформы p85. Результаты количественного ПЦР анализа маркеров эпителиально-мезенхимального перехода подтвердили, что клетки MCF-7 имеют эпителиальный фенотип, также как и клетки MCF-7 дикого типа.

Таким образом, данная диссертационная работа представляет результаты, которые показывают, что существует как минимум два механизма экспрессии изоформы p60-S6K1: путем альтернативной трансляции с третьего стартового кодона в пределах доминантного S6K1 транскрипта, и посредством трансляции со специфического для p60-S6K1 транскрипта, который образуется путем альтернативного сплайсинга. Изоформа p60-S6K1 имеет киназную активность, которая регулируется независимо от PI3K/mTORC1 сигнального каскада в клетках HEK-293. Роль p60-S6K1 в клеточной физиологии состоит как в положительной регуляции S6K1-зависимых процессов пролиферации и миграции клеток, так и в осуществлении специфической функции инициации эпителиально-мезенхимального перехода при условии подавления экспрессии изоформы p70-S6K1. Соотношение экспрессии p60- та p70-S6K1 может потенциально быть использовано в качестве диагностического маркера инвазивного рака молочной железы.

**Ключевые слова:** киназа 1 рибосомного белка S6, mTORC1-зависимый сигнальный путь, изоформа p60-S6K1, экспрессия изоформ S6K1