

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГОЦУЛЯК Назарій Ярославович

УДК 577.218+576.322

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук (доктора філософії)

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

_____ Н.Я. Гоцуляк

Науковий керівник: **Хоруженко Антоніна Іванівна,**

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Київ – 2021

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.

Наразі однією з перших причин смертності у світі є онкологічні захворювання. Дослідження етіології новоутворень виявили у пухлинних клітинах порушення регуляції клітинного циклу, апоптозу, зміну рухливості клітин, гіперактивацію систем, які відповідають за передачу сигналу від гормонів та факторів росту, тощо. Саме тому в багатьох випадках компоненти сигнальних систем, що зазнають суттєвих змін у процесі онкогенезу, використовують в сучасній онкології як біомаркери злоякісної трансформації, а також як безпосередні мішені в специфічній хіміо- та імунотерапії онкологічних захворювань. Одним з важливих сигнальних шляхів, порушення у якому призводять до розвитку раку, є mTOR/S6K сигнальний каскад. Він функціонує у всіх типах клітин ссавців та відповідає за передачу сигналу від інсуліну, тиреотропного гормону, естрогену та низки факторів росту та ін. Численні дослідження підтверджують над активацію та над експресію ланок цього сигнального каскаду у багатьох злоякісних новоутвореннях, включаючи карциноми молочної залози.

Важливою ланкою згаданого каскаду є кіназа рибосомного білка S6. Раніше було показано, що активація S6K регулюється фосфорилуванням / дефосфорилуванням у відповідь на різні позаклітинні подразники, включаючи фактори росту, цитокіни та гормони. Існує кілька ізоформ S6K1, утворених за допомогою процесів альтернативного сплайсингу та альтернативного запуску трансляції. Найбільш вивченими на сьогоднішній день є p70S6K та p85S6K, яка

містить є NLS (сигнал ядерної локалізації). Крім того, була виявлена нова ізоформа S6K1 31 кДа (p31S6K1), що є ще одним варіантом сплайсингу мРНК. Хоча, як показано, білок p31S6K1 втрачає кіназний домен, він має онкогенні властивості. Нещодавно було виявлено нову ізоформу p60 S6K1, яка також має значний онкогенний потенціал. Основною класичною мішенню S6K1 є рибосомний білок S6. Проте, наразі ідентифіковано значну кількість білків-мішеней зазначеної кінази, вони залученні до численних внутрішньоклітинних реакцій, і регулюють не лише процес біосинтезу білка, а і проліферацію, міграцію, аутофагію, апоптоз та інші численні внутрішньоклітинні події.

Саме множинність ізоформ S6K1 та її субстратів дещо ускладнюють з'ясування ролі цієї кінази у канцерогенезі.

Численні сучасні дослідження спрямовані на висвітлення ролі мікрооточення пухлини у процесі канцерогенезу. Було виявлено, що в залежності від стадії прогресування пухлини і інших фізіологічних особливостей, строма пухлини може діяти як супресор або активатор розвитку пухлини. Строма пухлини включає фібробласти, макрофаги, гістіоцити, перицити, ендотелій судин (в основному мікросудини), клітини імунної системи, нервові закінчення, позаклітинний матрикс. Згадані клітини чинять як пряму, так і опосередковану, головним чином гуморальну дію на пухлинні клітини. Гетеротипові взаємодії між фібробластами і злоякісними клітинами вважаються найбільш вивченими у системі пухлина-строма.

Таким чином, постає питання чи існує прямий зв'язок між впливом стромальних клітин на пухлинні та активацією mTOR/S6K сигнальної мережі останніх. Дослідження останніх років свідчать про існування такого зв'язку. А саме було виявлено, що пухлино асоційовані фібробласти продукують паракринні чинники, такі як IL6, що ініціюють процеси інвазії та метастазування шляхом активації mTOR/S6K сигнальної мережі. Проте питання, яка із ізоформ S6K1 може бути відповідальною за реалізацію клітиною пухлинного фенотипу під впливом стромальних чинників (а відтак бути мішенню для протипухлинної терапії) залишається відкритим.

Тому представлена дисертаційна робота присвячена вивченню ролі mTOR/S6K сигнальної мережі у реакції пухлинних клітин на регуляторний вплив з боку пухлинної стромы.

У першу чергу, за допомогою Вестерн блот аналізу було підтверджено, що фібробласти дійсно підвищують рівень фосфорилування кіназ p85S6K1 (фосфо-T412), p70S6K1 (фосфо-T389) та mTOR (фосфо-S2448) у клітинах пухлинного походження MCF-7 та HeLa.

Для з'ясування, яка саме із ізоформ кінази S6K1 може бути відповідальною за формування пухлинного фенотипу, було використано стабільні клітинні лінії, отримані на основі MCF-7 клітин з редагованою експресією ізоформ S6K1: F1 (p85-/p70+/p60+), F2 (p85-/p70-/p60+) та F3 (p85-/p70-/p60-) за допомогою CRISPR/Cas9 технології. Вестерн блот аналіз показав зміни у функціонуванні mTOR/S6K сигнального каскаду у отриманих клітинних ліній. Було з'ясовано, що при вибірковій експресії p60S6K1 не відбувається або суттєво знижене фосфорилування мішеней S6K1: eEF2K (фосфо-S366), rpS6 (фосфо-S240/244). Натомість, рівень фосфорилування Акт та раптора зростають. Первинний морфологічний аналіз досліджуваних клітинних ліній виявив, що селективна експресія p60S6K1 призводить до втрати епітеліальної морфології на ранніх термінах після субкультивування. А саме, клітини клону F2 після трипсинізації набували фібробластоподібної форми і могли відновити епітеліоподібні риси лише після близько двох діб культивування. Такого фенотипу набувають малігнізовані епітеліальні клітини, яким властивий високий рівень епітеліально-мезенхімальної пластичності, а відтак, і високий міграційний потенціал. Тому ми проаналізували локомоторні властивості досліджуваних клітин із редагованою експресією ізоформ S6K1 під впливом стромальних клітин у тесті за типом раневої поверхні. Для цього зазначений метод був суттєво оптимізований, що з одного боку значно спростило обчислення, а з іншого – дозволило застосувати модель співкультивування фібробластів та пухлинних клітин у данному тесті. Таким чином було встановлено, що кондиціоноване фібробластами середовище, а

особливо пряме співкультивування із фібробластами суттєво підвищують рухливість пухлинних клітин. Вибіркове пригнічення експресії p85S6K1 знижує локомоторні властивості клітин за відсутності та присутності впливу фібробластів. Натомість, селективна експресія p60S6K1 призводила до підвищення міграційної здатності клітин у 3-4 рази. Слід зазначити, що такі клітини були нечутливими ні до впливу фібробластів, ані до впливу рапаміцину, інгібітора mTOR/S6K1 сигнальної мережі. Нокдаун усіх трьох ізоформ призводив до сповільнення руху клітин, такі клітини теж були малочутливими до модуляції активності досліджуваної мережі.

Клітинні моделі засновані на тривимірному культивуванні вважають ближчими до умов організму ніж моношарові. Тому для визначення рухливості пухлинних клітин була також застосована модель реверсії тривимірного сфероїда у моношарову колонію. Отримані дані переважно підтвердили результати попереднього експерименту за виключенням умови прямого співкультивування пухлинних сфероїдів та моношару фібробластів. За таких обставин фібробласти суттєво сповільнювали міграцію пухлинних клітин.

Для того, щоб з'ясувати, яким саме чином відбувається регуляція локомоторної здатності клітин через S6K1 сигналінг, на наступному етапі було визначено вміст та рівень фосфорильовання білків, залучених до процесу міграції та адгезії, а також цитоскелет у клітинних лініях із редагованою експресією S6K1.

Так було встановлено, що клітини із селективною експресією p60S6K1 містять значно менше бета-актину та цитокератинів ніж контрольні клітини. Натомість, у них з'являється нехарактерний для епітелію віментин, що може свідчити про епітеліально-мезенхімну пластичність цих клітин.

Неочікуваним виявилось спостереження про суттєве зростання вмісту білка щільних контактів епітеліальних клітин Zo-1 у найрухливіших клітинах клону F2 із селективною експресією p60S6K1.

Натомість рівень фосфорилування кінази точок фокальної адгезії при вибірковій експресії p60S6K1 значно зростав. Цікаво, що у контрольних клітинах фібробласти підвищували цей показник міграції, тоді як у клітин клону F2 – знижували.

Окремо слід зазначити, що вміст CD29 (бета 1 інтегрину) та CD44 (глікопротеїн залучений до формування міжклітинних контактів та регуляції клітинної адгезії) у клітинах клону F2 був теж суттєво підвищеним.

Рівень експресії ізоформ S6K1 також відобразився на вмісті низки білків клітинної адгезії. Так, вміст CD326/EPCAM (Epithelial cell adhesion molecule) спадав при нокдауні p85S6K1, фактично нівелювався при додатковому пригніченні p70S6K1, проте зростав при нокдауні усіх трьох ізоформ S6K1. Це може бути пояснено тим, що при повному інгібуванні S6K1, певні її функції може брати на себе S6K2, як це має місце на моделі мишей із редагованою експресією S6K1 та S6K2. Вміст CD227/Muc1 (муцин 1) залишався незмінним при пригніченні p85S6K1, проте достовірно знижувався при селективній експресії p60S6K1 та нокдауні усіх трьох ізоформ. Вміст одного із представників родини раково-ембріональних антигенів CD66e також знижувався при пригніченні експресії згаданих ізоформ кінази S6K1, досягаючи мінімуму у клоні F2 із селективною експресією p60S6K1.

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

Отже, у дисертаційній роботі встановлено, що стромальні клітини, а саме фібробласти, активують процес міграції пухлинних клітин шляхом активації mTOR/S6K сигнальної мережі із подальшим залученням низки білків, відповідальних за клітинну адгезію та міграцію.

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

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях:

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089D>. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A0B>. *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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A15>. *Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, участь у підготуванні 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A25>.
Особистий внесок здобувача – участь у аналізі літературних джерел, культивуванні клітин, проведенні імуноблот аналізу, обробці його результатів та підготованні 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A2E>.
Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, культивування клітин, імуноблот аналіз, вимірювання швидкості міграції клітин, аналіз отриманих результатів, участь у підготованні статті до друку.

Тези наукових доповідей на конференціях:

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: збірник матеріалів наукового з'їзду Quantissue Meeting 2013* (Центр геномної регуляції, Барселона, Іспанія 10-11 квітня 2013 р.). Барселона, 2013. С. 34.
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. *Шевченківська весна 2015: біологія: матеріали XIII Міжнародної наукової конференції молодих науковців* (КНУ імені Тараса Шевченка, Київ, Україна, 1-3 квітня 2015 р.). Київ, 2015. С. 12.
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

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: матеріали Міжнародної конференції Українського товариства клітинної біології* (Інститут клітинної біології НАН України, Львів, Україна, 11-13 жовтня 2015 р.). Львів, 2015. С. 114.
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.)
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*. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: збірник матеріалів II Науково-практичної internet-конференції з міжнародною участю* (НФаУ, МОЗ України, Харків, Україна, 21 листопада 2019 р.). Харків, 2019. С. 23-24.
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*. *Біологія: від молекули до біосфери: збірник тез доповідей XIV Міжнародної конференції молодих науковців* (ХНУ імені В. Н. Каразіна, МОН України, Харків, Україна, 27-29 листопада 2019 р.). Харків, 2019. С. 39-41.

SUMMARY

Hotsuliak N.Ya. The role of mTOR-signal 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.

Currently, one of the leading causes of death in the world is cancer. Studies of the etiology of neoplasms have found in tumor cells disorders of cell cycle regulation, apoptosis, changes in cell motility, hyperactivation of systems responsible for signaling from hormones and growth factors, and so on. That is why in many cases the components of signaling systems that undergo significant changes in the process of oncogenesis are used in modern oncology as biomarkers of malignant transformation, as well as direct targets in specific chemotherapy and immunotherapy of cancer. One of the important signaling pathways in which disorders lead to cancer is the mTOR / S6K signaling cascade. It functions in all types of mammalian cells and is responsible for signaling from insulin, thyroid-stimulating hormone, estrogen and a number of growth factors. Numerous studies confirm the activation and expression of links in this signaling cascade in many malignancies, including breast cancer.

An important link of this cascade is the kinase of the ribosomal protein S6. S6K activation has previously been shown to be regulated by phosphorylation / dephosphorylation in response to various extracellular stimuli, including growth factors, cytokines and hormones. There are several S6K1 isoforms formed by alternative splicing and alternative translation initiation processes. The most studied to date are p70S6K and p85S6K, which contains NLS (nuclear localization signal). In addition, a new isoform of S6K1 31 kDa (p31S6K1) was discovered, which is another variant of mRNA splicing. Although the p31S6K1 protein has been shown to lose its kinase domain, it has oncogenic properties. A new isoform of p60 S6K1 has

recently been discovered, which also has significant oncogenic potential. The main classical target of S6K1 is the ribosomal protein S6. However, a significant number of target kinase target proteins have been identified, are involved in numerous intracellular responses, and regulate not only protein biosynthesis but also proliferation, migration, autophagy, apoptosis, and numerous other cell functions.

It is the multiplicity of S6K1 isoforms and its substrates that makes it somewhat difficult to elucidate the role of this kinase in carcinogenesis.

Numerous recent studies are aimed at elucidating the role of the tumor microenvironment in the process of carcinogenesis. It has been found that, depending on the stage of tumor progression and other physiological features, the tumor stroma may act as a suppressor or activator of tumor development. Tumor stroma includes fibroblasts, macrophages, histiocytes, pericytes, vascular endothelium (mainly microvessels), immune system cells, nerve endings, extracellular matrix. These cells have both direct and indirect, mainly humoral effect on tumor cells. Heterotype interactions between fibroblasts and malignant cells are considered to be the most studied in the tumor-stroma system.

Thus, the question arises as to whether there is a direct link between the effect of stromal cells on the tumor and the activation of the mTOR / S6K signaling network of the latter. Recent research suggests that such a link exists. Namely, it was found that tumor-associated fibroblasts produce paracrine factors such as IL6, which initiate the processes of invasion and metastasis by activating the mTOR / S6K signaling network. However, the question of which of the S6K1 isoforms may be responsible for the realization of a tumor phenotype by a cell under the influence of stromal factors (and thus be a target for antitumor therapy) remains open.

Therefore, the presented dissertation is devoted to the study of the role of mTOR / S6K 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 do increase the level of phosphorylation of p85S6K1 (phospho-T412), p70S6K1 (phospho-T389) and mTOR (phospho-C2448) kinases in tumor cells HeLa and MCF-7.

To determine which of the S6K1 kinase isoforms may be responsible for the formation of the tumor phenotype, stable cell lines derived from MCF-7 cells with edited expression of S6K1 isoforms were used: F1 (p85- / p70 + / p60 +), F2 (p85- / p70- / p60 +) and F3 (p85- / p70- / p60-) using CRISPR / Cas9 technology. Western blot analysis showed changes in the functioning of the mTOR / S6K signaling cascade in the resulting cell lines. It was found that the selective expression of p60S6K1 does not occur or significantly reduced phosphorylation of S6K1 targets: eEF2K (phospho-C366), rpS6 (phospho-C240 / 244). Instead, the level of phosphorylation of Akt and raptor increases. Primary morphological analysis of the studied cell lines revealed that selective expression of p60S6K1 leads to loss of epithelial morphology in the early stages after subculturing. Namely, the cells of clone F2 after trypsinization acquired a fibroblast-like shape and could restore epithelial features only after about two days of cultivation. This phenotype is acquired by malignant epithelial cells, which are characterized by a high level of epithelial-mesenchymal plasticity, and hence a high migration potential. Therefore, we analyzed the locomotor properties of the studied cells with edited expression of S6K1 isoforms under the influence of stromal cells in the wound surface type test. For this purpose, this method 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 in this test. Thus, it was found that the environment conditioned by fibroblasts, and especially direct co-cultivation with fibroblasts significantly increase the motility of tumor cells. Selective inhibition of p85S6K1 expression reduces the locomotor properties of cells in the absence and presence of fibroblast exposure. Instead, selective expression of p60S6K1 led to an increase in cell migration by 3-4 times. It should be noted that such cells were insensitive to the effects of fibroblasts or to the effects of rapamycin, an inhibitor of the mTOR / S6K1 signaling network. Knockdown of all three isoforms led to a

slowdown in cell movement, such cells were also insensitive to modulation of the activity of the studied network.

Cell models based on three-dimensional cultivation are considered closer to the conditions of the organism than monolayer. Therefore, a model of reversal 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.

In order to find out exactly how the locomotor capacity of cells is regulated by S6K1 signaling, the next step was to determine the content and level of phosphorylation of proteins involved in migration and adhesion in S6K1-edited cell lines.

Thus, cells with selective expression of p60S6K1 were found to contain significantly less beta-actin and cytokeratins than control cells. Instead, they develop uncharacteristic vimentin, which may indicate epithelial-mesenchymal plasticity of these cells.

The observation of a significant increase in Zo-1 protein content (tight junction protein) in the most motile cells of clone F2 with selective expression of p60S6K1 was unexpected.

In contrast, the level of phosphorylation of the kinase focal adhesion points with selective expression of p60S6K1 increased significantly. Interestingly, in control cells fibroblasts increased this rate of migration, while in cells of clone F2 - decreased.

It should be noted that the content of CD29 (beta 1 integrin) and CD44 (glycoprotein involved in the formation of intercellular contacts and regulation of cell adhesion) in the cells of clone F2 was also significantly increased.

The expression level of S6K1 isoforms also affected the content of a number of cell adhesion proteins. Thus, the content of CD326 / EPCAM (Epithelial cell

adhesion molecule) decreased when p85S6K1 was knocked down, actually leveled off with additional p70S6K1 inhibition, but increased when all three S6K1 isoforms were knocked down. This may be explained by the fact that with complete inhibition of S6K1, certain of its functions may be assumed by S6K2, as is the case in the model of mice with edited expression of S6K1 and S6K2. The content of CD227 / Muc1 (mucin 1) remained unchanged with the inhibition of p85S6K1, but its content was significantly reduced by selective expression of p60S6K1 and knockdown of all isoforms. The content of one of the members of the family of cancer-embryonic antigens CD66e also decreased with inhibition of the expression of the mentioned isoforms of kinase S6K1, reaching a minimum in clone F2 with selective expression of p60S6K1.

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

Thus, in the dissertation it is established that stromal cells, namely fibroblasts, stimulate the migration of tumor cells by activation of mTOR / S6K signaling network with the subsequent involvement of a number of proteins responsible for cell adhesion and migration.

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

List of scientific publications published on the topic of the dissertation

Articles

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089D>. *Applicant's personal contribution – analysis of literature sources, culturing HeLa cells, measuring the rate of migration of HeLa cells, participation in the development of a modification of*

the "wound surface" model, participation in the analysis of the results, preparation of the article for publication.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A0B>. *Applicant's personal contribution – participation in the analysis of literature sources, cell culture, immunofluorescence reaction, analysis of the results and preparation of the article for publication.*
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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A15>. *Applicant's personal contribution – analysis of literature sources, cell culture, immunoblot analysis, measurement of cell migration rate, analysis of the results, participation in the preparation of the article for publication.*
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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A25>. *Applicant's personal contribution – participation in the analysis of literature sources, cell culture, immunoblot analysis, processing of its results and preparation of the article for publication.*
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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A2E>. *Applicant's personal contribution – analysis of literature sources, cell culture,*

immunoblot analysis, measurement of cell migration rate, analysis of the results, participation in the preparation of the article for publication.

Conference abstracts

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.
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.
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: Abstracts of the Conference-competition of Young Scientists dedicated to the 110th Anniversary of the birth of Academician of the NAS of Ukraine M. F. Guly* (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 23-24 April 2015). Kyiv, 2015. P. 21.
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.

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*. *Oncology*. 2015. Vol. 17. No. 3. P. 223. (*Мінімальна залишкова хвороба при солідних пухлинах: Materials of the Scientific and Practical Conference (R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, 22-23 October 2015)*).
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.
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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	24
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. mTOR-сигналінг у нормі і патології	31
1.1.1. mTOR-сигнальний шлях та mTOR-сигналь на мережа	31
1.1.2. Порухення mTOR-сигналізації	31
1.1.3. Молекулярна характеристика кінази рибосомного білка S6	33
1.1.4. Активність S6K протягом клітинного циклу	35
1.1.5. Молекулярна характеристика кінази mTOR	36
1.1.6. Функції mTOR-сигналінгу	37
1.1.7. mTOR-S6K1-сигнальна ланка	38
1.1.8. Рапаміцин та рапалоги	39
1.2. mTOR-регульована клітинна рухливість	40
1.2.1. Клітинна рухливість і метастатичний каскад	40
1.2.2. Комплекс mTOR-1 і клітинна рухливість	40
1.2.3. Комплекс mTOR-2 і клітинна рухливість	41
1.2.4. mTOR-сигналізація і кератиновий цитоскелет	42
1.2.5. mTOR-сигналізація і кіназа FAK	42
1.3. Фібробласти як основний компонент пухлинної строми	43
1.3.1. Система пухлина-строма	43
1.3.2. Загальна характеристика нормальних та пухлино-асоційованих фібробластів	44
1.3.3. Паракринні фактори ПАФ	45
1.4. Основи моделювання пухлино-стромальної взаємодії та клітинної рухливості	47
1.4.1. Системи співкультивування <i>in vitro</i>	47
1.4.2. Тривимірні культури	47
1.4.3. Модель раневої поверхні	48

	19
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	49
2.1. Матеріали та реактиви	49
2.2. Обладнання	56
2.3. Біологічний матеріал	57
2.4. Приготування розчинів та буферних систем	58
2.5. Виділення дермальних фібробластів людини	58
2.6. Культивування клітин людини	59
2.7. Кріоконсервування клітин	60
2.8. ПЛР-тестування клітинних культур на контамінацію мікоплазмою	61
2.9. Електрофоретичне розділення ДНК	61
2.10. Приготування кондиціонованого середовища	62
2.11. Співкультивування клітинних культур	63
2.12. Вимірювання швидкості міграції клітин на моделі «раневої поверхні»	64
2.13. Формування багатоклітинних сфероїдів	65
2.14. Морфометрична характеристика багатоклітинних сфероїдів	66
2.15. Вимірювання швидкості міграції клітин на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда	66
2.16. Фарбування клітин за Май-Грюнвальдом та Гімзою	67
2.17. Звичайна світлова та конфокальна мікроскопія	67
2.18. Приготування клітинних лізатів	68
2.19. Вимірювання загальної концентрації білків	69
2.20. Електрофоретичне розділення білків	69
2.21. Фарбування білкових гелів	70
2.22. Імуноблот-детектування вибраних білків	71
2.23. Визначення відносного вмісту вибраного білка у клітинному лізаті	73
2.24. Імунофлюоресцентна реакція	74
2.25. Статистичний аналіз експериментальних даних	75
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	77

	20
3.1. Дослідження участі mTOR/S6K1-сигнальної ланки у сприйнятті паракринної сигналізації дермальних фібробластів	77
3.1.1. Первинна культура дермальних фібробластів людини	77
3.1.2. Активація ланки у відповідь на паракринну сигналізацію дермальних фібробластів у клітинах лінії MCF-7	78
3.1.3. Активація ланки у відповідь на паракринну сигналізацію дермальних фібробластів у клітинах лінії HeLa	81
3.2. Застосування та характеристика модельних клітинних ліній MCF-7 з селективним обмеженням експресії ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1	86
3.2.1. Характеристика рівнів експресії ізоформ кінази S6K1 у модельних клітинних лініях	86
3.2.2. Характеристика функціональної активності ізоформ кінази S6K1 та асоційованих елементів PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху у модельних клітинних лініях	89
3.3. Дослідження участі ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у регуляції міграційної активності пухлинних клітин під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів	94
3.3.1. Обґрунтування вибору параметру вимірювання міграційної активності на моделі «раневої поверхні»	95
3.3.2. Участь у регуляції міграційної активності клітин під паракринним впливом дермальних фібробластів у двовимірних умовах	97
3.3.3. Адаптація моделі «раневої поверхні» до вимірювання міграційної активності клітин в умовах співкультивування	101
3.3.4. Участь у регуляції міграційної активності клітин за паракринної взаємодії з дермальними фібробластами у двовимірних умовах	103

	21
3.3.5. Участь у регуляції міграційної активності під паракринним впливом дермальних фібробластів у тривимірних умовах	104
3.3.6. Участь у регуляції міграційної активності за умов фізичної взаємодії з фібробластами у тривимірних умовах	107
3.3.7. Залучення ізоформ кінази S6K1 до визначення стратегії міграції пухлинних клітин	108
3.4. Дослідження участі ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у регуляції експресії вибраних білків асоційованих з забезпеченням міграційної активності клітини	112
3.4.1. Участь у регуляції експресії білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e	113
3.4.2. Участь у регуляції експресії білків клітинної адгезії з механосенсорними функціями CD29 та CD44	115
3.4.3. Участь у регуляції активності кінази точок фокальної адгезії FAK	116
3.4.4. Участь у регуляції експресії білків цитоскелету β актину, цитокератинів та віментину	118
3.4.5. Участь у регуляції експресії білка щільних міжклітинних контактів ZO-1	120
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ	
ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	124
ВИСНОВКИ	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

4E-BP1	–	білок, який приєднується до еукаріотичного фактора ініціації трансляції 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1)
а.з.	–	амінокислотних залишків
БСА	–	бичачий сироватковий альбумін
ЕДТА	–	етилен-діамін-тетраоцтова кислота
ЗН	–	злякисне новоутворення
ІБ	–	імуноблот
ІП	–	імунопреципітація
кДа	–	кілодальтон
ПААГ	–	поліакриламідний гель
РКВ	–	протеїнкіназа В (protein kinase B)
CAF	–	пухлино-асоційовані фібробласти (Cancer Associated Fibroblasts)
CREM	–	модулятор цАМФ чутливого елемента (cAMP Response Element Modulator)
DMEM	–	середовище Ігла, модифіковане Дюльбекко (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
eEF2K	–	кіназа фактора елонгації eEF2 еукаріот (eukaryotic elongation factor 2 kinase)
ФАК	–	кіназа точок фокальної адгезії (Fokal Adhesion Molecule)
IGF-1	–	інсулін-подібний фактор росту 1 (insulin like growth factor 1)
IGF-1R	–	рецептор IGF-1 (insulin-like growth factor 1 receptor)
MMPs	–	матриксні металопротеїнази (matrix metalloproteinases)
mTOR	–	мішень рапаміцину у ссавців (mechanistic target of rapamycin)
mTORC1	–	mTOR комплекс 1 (mTOR Complex 1)
mTORC2	–	mTOR комплекс 2 (mTOR Complex 2)
NLS	–	сигнал ядерної локалізації (nuclear localization signal)

PI3K	–	фосфотидилінозитол - 3- кіназа (phosphoinositide 3-kinase)
PTEN	–	фосфатаза з гомологією до тензину, делетована на хромосомі 10 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)
PP2A	–	фосфатаза 2A (protein phosphatase 2A)
PRAS40	–	пролін-збагачений субстратAkt з молекулярною масою 40кДа (proline-rich Akt substrate of 40 kDa)
Rac1	–	ras-споріднений C3 субстрат (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
Raptor	–	білок, регуляторно асоційований з mTOR (regulatory associated protein of mTOR)
Rictor	–	RPTOR незалежний партнер mTOR комплексу 2 (RPTOR independent companion of MTOR complex 2)
RHEB	–	гомолог білка Ras у мозку (Ras homolog enriched in brain)
rpS6	–	рибосомний протеїн S6 (ribosomal protein S6)
S6K1	–	кіназа 1 рибосомального білка S6 (ribosomal protein S6 kinase1)
SDS	–	додецил сульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)
TSC1/2	–	білки туберозно-склерозного комплексу 1 і 2 (Tuberous sclerosis proteins 1 and 2)

ВСТУП

Актуальність теми. 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 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 злочасних 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, імуофлюоресцентний 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; підтриманні нормальної морфології клітин раку молочної залози; здатності до самоорганізації у просторі у вигляді багатоклітинних сфероїдів та реалізації стратегій клітинної міграції; регуляції активності елементів PI3K/АКТ/mTOR-

сигнального шляху – кіназ АКТ, GSK-3 β та eEF2K; регуляції ступеню фосфорилування білків S6, RAPTOR та білків-мішеней кінази АКТ; експресії білків клітинної адгезії – CD326, CD227 та CD66e; експресії білків клітинної адгезії з функціями механорецепції – CD29 та CD44; активності регулятора ремоделювання адгезиних контактів – кінази FAK; активності експресії білків цитоскелету – β -актину та гістіоспецифічних – цитокератинів і віментину; експресії білка щільних контактів – ZO-1. Розроблено та адаптовано модифікацію моделі «раневої поверхні», що уможлиблює вимірювання з її використанням міграційної активності клітин за умов співкультивування.

Практичне значення одержаних результатів. Ідентифікація нових регуляторних 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 злоякісних новоутворень загалом та раку молочної залози зокрема, а також сприятиме подальшому більш глибокому вивченню 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 та 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. Розроблена та адаптована у даній роботі модифікація моделі «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 для студентів університетів, що навчаються за спеціальностями «Біохімія», «Молекулярна біологія», «Біотехнологія», «Цитологія» 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. mTOR-СИГНАЛІЗАЦІЯ У НОРМІ І ПАТОЛОГІЇ

1.1.1. mTOR-сигнальний шлях та mTOR-сигнальна мережа. mTOR-сигнальний шлях – один з основних регуляторів процесу трансляції білкового синтезу та асоційованих з ним клітинних функцій, сенсор та інтегратор низки зовнішньо- та внутрішньоклітинних сигналів [4]. Ініціація mTOR-сигнального шляху починається з активації мембранних рецепторів ростових факторів та передбачає внутрішньоклітинну каскадну передачу сигналу у напрямку: $PI3K \rightarrow AKT \rightarrow TSC1/2 \rightarrow Rheb \rightarrow mTOR$, що стимулює mTOR-сигналінг та його мішені до позитивної регуляції біосинтезу білка та асоційованих з ним процесів [5]. Сучасний стан досліджень mTOR-сигналінгу демонструє його надзвичайну інтегрованість у загальній регуляції клітинного метаболізму та гомеостазу. Загалом, ідентифіковано понад 964 клітинні об'єкти, зокрема 380 протеїнів, 319 молекулярних комплексів, 87 РНК і ін. у 777 реакціях, які прямо, чи опосередковано залучені до mTOR-сигналінгу. Тому, більш раціональним виявляється розглядати mTOR-сигнальний шлях як основу значно складнішої системи – mTOR-сигнальної мережі [6].

1.1.2. Порушення mTOR-сигналізації. Порушення mTOR-сигналінгу асоціюють з процесами старіння, численними нейродегенеративними, серцево-судинними, нирковими захворюваннями, діабетом, ожирінням, імунними дисфункціями, макулодистрофією і ін. [7].

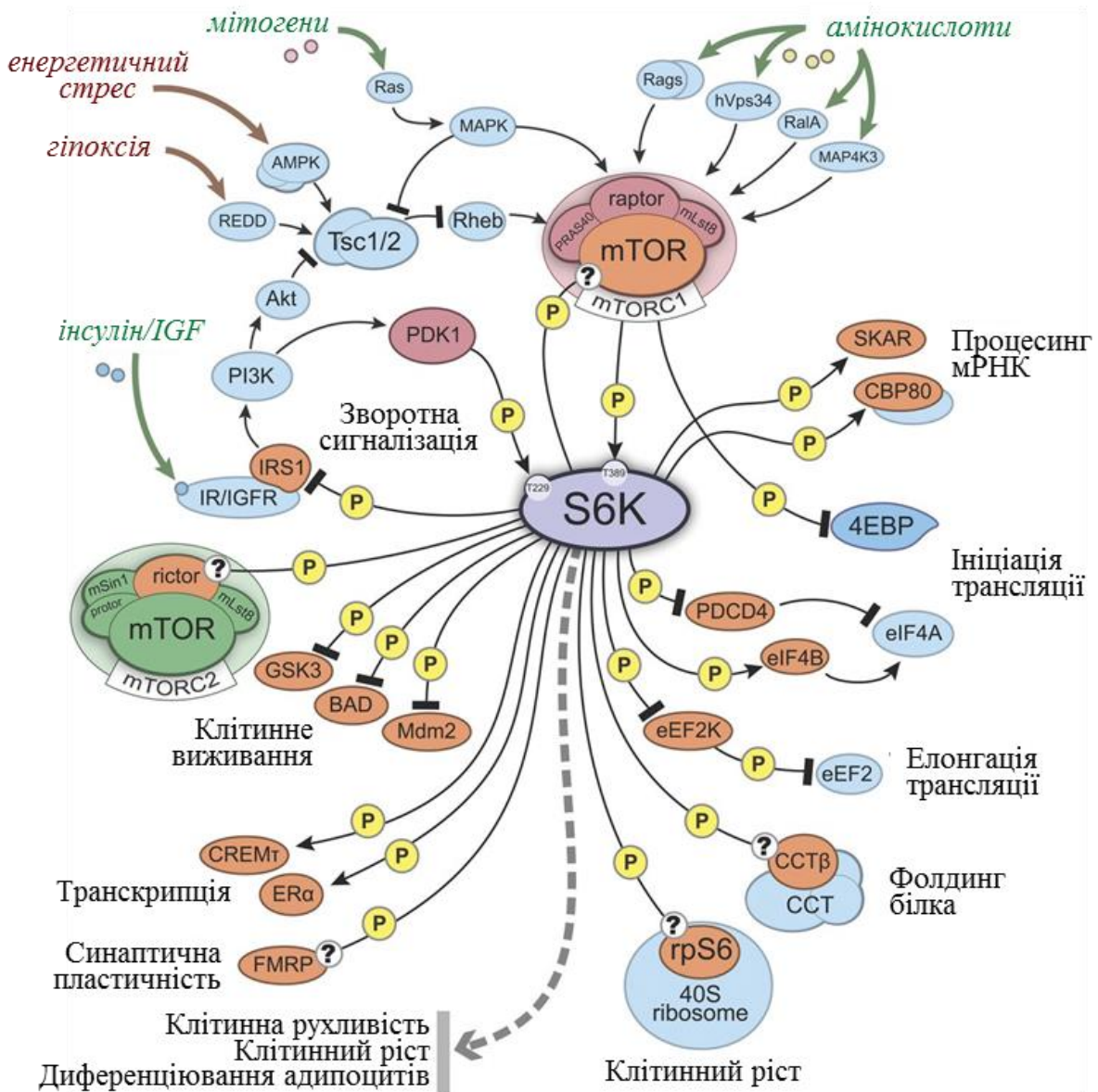


Рис. 1.1. Схематичне зображення передачі сигналу PI3K/АКТ/mTOR-сигнальним шляхом [4, 5, 6]

На особливу увагу заслуговує участь mTOR-сигналіну у розвитку онкологічних захворювань. Зміни генної експресії та активності елементів mTOR-сигнального шляху приписуються низці різновидів раку, зокрема раку молочної залози, легені, печінки, нирки, кишківника, голови і шиї та ін. [1]. Виразно вони проявляються у клітинах пухлин жіночої статеві системи – пухлинах шийки та ендометрію матки, яєчника [8]. Подібні зміни зачіпають в

основному регуляторі кінрази mTOR, серед яких представлені як онкогени, так і онкосупресори, однак ефекти викликані їх гіпер- чи гіпоактивацією опосередковані переважно активацією кінрази mTOR [9]. Це проявляється у тому, що близько 26% пухлин основних типів раку виявляють чутливість до специфічного блокування mTOR-сигналіngu *in vitro* [10]. Крім того, нещодавні дослідження демонструють можливість мутацій самої кінрази mTOR [11].

1.1.3. Молекулярна характеристика кінрази рибосомного білка S6.

Кінза рибосомального білка S6 (rpS6) - S6K1 належить до AGC родини серин/треонін протеїнкіназ, яка в свою чергу включає протеїнкіназу С, протеїнкіназу В, SGKs, та 90 кДа рибосомальну S6 кінразу. Існує дві форми S6 кінрази - S6K1 та S6K2 кожна з яких має цитоплазматичну (S6K1 I та S6K2I) та ядерну (S6K1 II та S6K2 II) форми. S6K1 та S6K2 демонструють значну ідентичність послідовності амінокислот, з найвищим рівнем гомології у кіназному та прилягаючому до нього доменах.

Наразі уточнено, що у клітинах ссавців експресуються декілька ізоформ S6K1, а саме: p85-S6K1, p70-S6K1, p31-S6K1 та майже не досліджена p60-S6K1.

Найбільш вивченою ізоформою S6K1 є p70-S6K1, яка містить у своєму складі 502 амінокислоти. Різні старти трансляції та альтернативний сплайсинг призвели до утворення іншої ізоформи – p85-S6K1, що містить додаткові 23 амінокислоти у своєму N-кінці [51] (Рис.2).

C-кінцева послідовність S6K2 містить специфічну збагачену проліном ділянку, яка відсутня у S6K1 та, можливо, залучена до опосередкування білок-білкових взаємодій з молекулами, що містять SH3 та WW домени. Як було вказано, активація S6K регулюється через фосфорилування/дефосфорилування у відповідь на різні позаклітинні стимули, включаючи ростові фактори, цитокіни та гормони, що тісно корелює з фосфорилуванням S6 білка та ініціацією білкового синтезу. Наразі не виявлені прямі, високо-специфічні

інгібітори S6K. Численні дослідження вказують на те, що PI3K та mTOR сигнальні шляхи є ключовими для повної активації S6K1.



Рис. 1.2 Доменна структура S6K1. Ізоформи можуть мати альтернативні старт-кодони та альтернативні сплайс-варіанти (Y. Abe)

Дані літератури вказують на подібність активації S6K1 α та S6K2 інсуліном, PMA (форбол-12-мірістат-13-ацетат), ембріональною сироваткою. Обидві кінази отримують сигнали від загальних ефекторів PI3 кіназного шляху, включаючи PDK1, протеїнкіназу B, протеїнкіназу C α , Rac, CDC42. Проте, існують і певні відмінності у регуляції S6K $\alpha\alpha$ та S6K β . Порівняльний аналіз обох форм S6K вказує на те, що S6K2 більш чутлива (ніж S6K1 $\alpha\alpha$ до активації міристильованою α протеїнкіназою C α . Крім того, було показано, що С-кінцевий фрагмент S6K2 чинить більш виражений інгібіторний ефект на активність кінази, ніж С-кінцевий фрагмент S6K1.

Як згадувалось вище, S6K1 та S6K2 мають два сплайсингові варіанти із різною внутріклітинною локалізацією. 23- та 13- амінокислотні послідовності на N-кінці S6K α I та S6K α I α містять сигнали ядерної локалізації (NLS), що обумовлює існування цих форм кінази у ядрі. S6K α II або p70 S6K є переважно цитоплазматичною формою S6 кінази, але при дії лептоміцину B вона може акумулюватися у ядрі. Нещодавно з'явилися дані про наявність сигналу ядерної локалізації на С-кінцевому фрагменті обох сплайсингових варіантів S6K α .

Класичним субстратом для S6K вважається рибосомальний протеїн rpS6. Фосфорилування rpS6 каталізоване S6 кіназою призводить до активації вказаного протеїну, що в кінцевому результаті відіграє роль у регуляції розміру клітини, синтезу білків та гомеостазу цукрози. Однак, протягом останніх років було ідентифіковано ще кілька субстратів S6K серед яких, фактор ініціації трансляції еукаріот (eukaryotic translation initiation factor 4B – eIF4B), cAMP-responsive element modulator CREM, 80 kDa subunit of the nuclear Capbinding complex (CBP80), S6K1 Aly/REF-like target (SKAR). Численні ізоформи продукту гену CREM відомі як позитивні та негативні регулятори генної транскрипції у відповідь на цАМФ. За даними De Groot активація S6K1 (p70^{S6K}) *in vitro* факторами сироватки підвищує рівень фосфорилування Ser-117 та транс активацію CREM. Крім того, було показано, що рапаміцин, потенційний інгібітор S6K1 *in vivo* повністю блокує активацію CREM, викликану сироваткою та S6K1. Наразі існує ряд підтверджень того, що активація CREM потребує його попередньої взаємодії з CBP. CREB-зв'язуючий протеїн (CBP) функціонує як транскрипційний коактиватор та інтегратор, що приєднує фактори транскрипції до загального транскрипційного комплексу. Крім того, було показано, що CBP залучений до передачі сигналу трийодтироніну всередину клітини. Дані літератури свідчать, що нещодавно ідентифікований протеїн SKAR (for S6K1 Aly/REF-like target) являється субстратом лише для S6K1 [Richardson 2004]. S6K1 *in vitro* фосфорилує SKAR по сайтах, чутливих до міогенів та рапаміцину *in vivo*. Інгібіторний вплив S6K чинить на субстрат інсулінового рецептора IRS1, IRS2, кіназу фактора елонгації еукаріот eEF2K та BAD. Логічно припустити, що ядерні субстрати S6K відіграють важливу роль у внутрішньоклітинному розподілі S6K1 та S6K2.

Наразі нема однозначного пояснення зміні субклітинної локалізації S6K. Проте раніше було показано, що у пухлинах молочної залози рівень експресії S6K1 та S6K2 підвищений порівняно з нормальною тканиною. Крім

того, S6K2 часто була локалізованою у ядрах клітин аденокарцином, але рідко у ядрах клітин фіброаденом та нормальної тканини молочної залози.

1.1.4 Активність S6K протягом клітинного циклу. Питання про участь S6K1 та S6K2 у проліферації клітин активно обговорюється у літературі. Окрему увагу акцентовано на відмінностях у функціонуванні цих кіназ. Так, було досліджено, що S6K1 залучена до контролю над розміром клітин, тоді як S6K2 не впливала на цей показник [Pende M. 2004]. Відзначені певні відмінності і в активності цих кіназ протягом клітинного циклу. Було показано, що протягом усіх стадій клітинного циклу S6K1 та S6K2 не втрачають своєї активності. Підвищення рівня активності S6K1 зафіксоване у М фазі клітинного циклу, а найвища активність S6K2 спостерігалась у G2 та М фазах [Boyer]. Крім того, показано, що S6K2, на відміну від S6K1, також локалізувалась на центросомі. Центросомна локалізація кінази зберігалась протягом усього циклу. Під час мітозу зафіксований зв'язок S6K2 із веретенем поділу. Проте, було показано, що функція центросомим не залежить від S6K2. Тому було висловлене припущення, що S6K2 мігрує до центросоми з метою отримати певний сигнал від центросомного комплексу. Це може передбачати цитоскелетну регуляцію функції S6K2.

З іншого боку, при стимуляції ендотеліальних клітин людини до проліферації Ангіопоетином I була зафіксована активація S6K1 та MAPK (Shigeru Kanda). Крім того, активація білкового синтезу, опосередкована S6K у клітинах васкулярного ендотелію людини, визначалась як ключовий крок у проходженні клітинного циклу (Vinals). На моделі штучно викликаних (TSHом) пухлин гіпофізу мишей із клітин продукуючих ТТГ показане залучення S6K1 до процесу проліферації та аберантного росту гіпофізу (Ch. Lu).

1.1.5. Молекулярна характеристика кінази mTOR. mTOR – високомолекулярна (2549 АК, ~289 кД), повсюдно експресована, мультиефекторна серин/треонінова протеїнкіназа надродини PIKKs

(phosphatidylinositol-3-kinase-related kinases). mTOR належить роль центральної ланки mTOR-сигнальної мережі, адаптера процесів росту та метаболізму клітини до змін оточуючих її умов. Ген TOR міститься в геномі усіх досліджуваних еукаріот. Структура молекули представлена кількома консервативними структурними доменами [12]. Локалізація mTOR у клітинах ссавців залежить від стадії клітинного циклу. Кіназа виявляється у цитоплазмі, ядрі, стресових гранулах, поруч лізосомальної, плазматичної та мембран ендоплазматичного ретикулюму, що пов'язується з оптимізацією взаємодії з асоційованими протеїнами та різноманітністю виконуваних функцій [13].

mTOR виступає коровим компонентом двох структурно та функціонально відмінних мультибілкових комплексів – mTOR-1 та mTOR-2. Специфічний набір білків-партнерів забезпечує чутливість mTOR до різних регуляторів, різну субстратну специфічність, чутливість/нечутливість до інгібіторів, а головне множинність функцій у клітині [14]. Ідентифікація нових mTOR-асоційованих протеїнів триває і сучасним поступом на цьому шляху є виявлення білків Tti1 та Tel2, що входять до складу обох комплексів та позитивно регулюють їх активність [15].

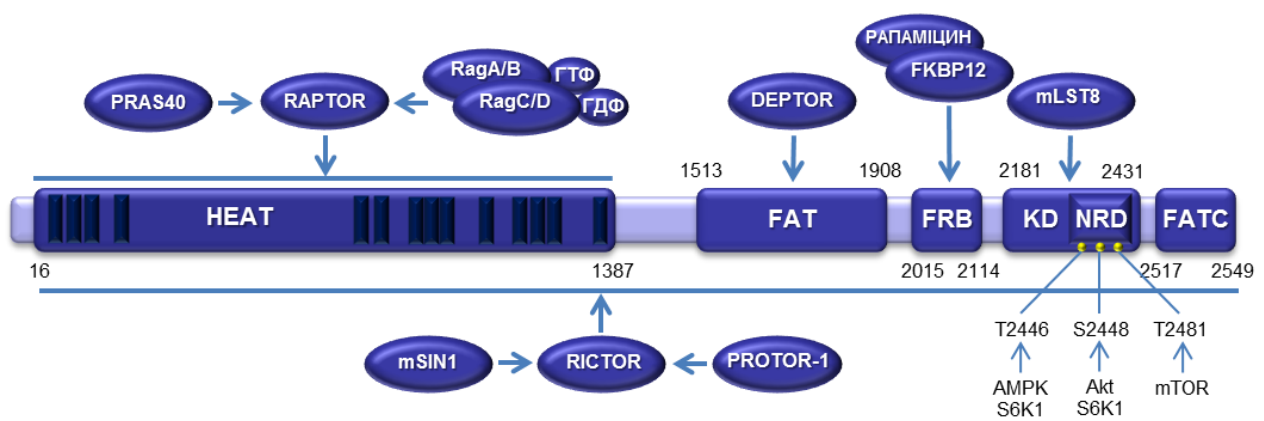


Рис. 1.3. Структура молекули mTOR. Домени mTOR та їх функції: HEAT – білок-білкова взаємодія, мембранна локалізація; FAT – білок-білкова взаємодія, фолдинг кіназного домену; FRB – взаємодія з рапаміцином,

субстратна специфічність; кіназний домен – серин/треонінова протеїнкіназна активність; NRD – негативна регуляція кіназної активності (вказані сайти фосфорилування кіназами AMPK, S6K, Akt та самою mTOR); FATC – фолдинг кіназного домену. Стрілками позначені орієнтовні контакти mTOR з білками-партнерами та рапаміцином [3, 4].

1.1.6. Функції mTOR-сигналізації. Функції mTOR-сигналізації можна об'єднати у дві основні: сенсорну та регуляторну. Сенсорна функція комплексу mTOR-1 полягає у залежності його активності від 5 основних факторів-показників стану внутрішнього та зовнішнього середовища клітини: ростових факторів, генотоксичного стресу, енергетичного статусу, оксигенації та доступності амінокислот [16]. Отриманий сигнал комплекс mTOR-1 трансформує у регуляції низки клітинних процесів, зокрема трансляції білкового синтезу, фосфорилуючи та активуючи S6K1 (S6-kinase 1) та деактивуючи 4E-BP (4E-binding protein) [17], біосинтез ліпідів, контролюючи експресію численних генів залучених до синтезу жирних кислот та холестеролу через транскрипційний фактор SREBP1/2 (sterol regulatory element binding protein 1/2), а також сприяючи експресії та активації PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) – головного регулятора адипогенезу [18]. Комплекс mTOR-1 регулює продукцію АТФ, активуючи транскрипцію та трансляцію HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α) – позитивного регулятора низки гліколітичних генів [19], аутофагію, прямо фосфорилуючи та пригнічуючи функцію кіназного комплексу ULK1/ATG13/FIP200 (unc-51-like kinase 1/mammalian autophagy-related gene 13/focal adhesion kinase family-interacting protein of 200kDa) – ініціатора аутофагії [20]. Також регуляторна функція комплексу залучає рибосомальний біогенез, сприяючи синтезу білків кодovаних мРНК з 5'-піримідиновим трактом – рибосомальних протеїнів, сприяючи синтезу рРНК, процесингу попередників рРНК за невідомим механізмом [21], мембранний транспорт амінокислот, посттрансляційно

регулюючи мембранні транспортери [22], мітохондріальний метаболізм, контролюючи експресію генів мітохондріального фосфопротеому [23] і інші.

Порівняно з відомостями про комплекс mTOR-1, функції комплексу mTOR-2 залишаються малодослідженими. Відомо, що комплекс не чутливий до амінокислот та глюкози, але за нез'ясованим механізмом реагує на вплив факторів росту [24]. Також, виявлено, що комплекс mTOR-2 контролює функції АКТ, що залучає її до регуляції процесів метаболізму, виживання, апоптозу, росту та проліферації [25], активує кіназу SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1) – регулятора іонного транспорту і росту) [26] та PKC- α (protein kinase C- α), що пов'язує mTOR-сигналінг з регуляцією актинового цитоскелету [27].

1.1.7. mTOR-S6K1-сигнальна ланка. Разом з 4E-BP1, кіназа S6K1 – одна з основних та найкраще досліджених ефекторних молекул кінази mTOR. Ступінь фосфорилування S6K1 у експериментах використовується як показник активності mTOR-сигналінгу [28]. Фосфорильована кіназою mTOR, S6K1 скеровує активність низки регуляторів трансляції білкового синтезу (rpS6, eIF4B, Pdc4, eEF2K), ремоделювання цитоскелету (Neurabin, Rac, CDC42), проліферації (hnRNP), сплайсингу (SKAR), виживання (RafB/PKC, MDM2, DAD1), а також, що важливо, зворотній регуляторний зв'язок (через mTOR, Rictor, IRS1) [29]. mTOR-S6K1-сигналінг залучений і до патологічних процесів, зокрема виявлено гіперфосфорилування S6K1 та білка S6 при низці різновидів раку [30].

1.1.8. Рапаміцин та рапалоги. Інгібування mTOR пильно досліджується як основа протипухлинної терапії ряду онкологічних захворювань [31]. Рапаміцин – перший ідентифікований специфічний інгібітор mTOR, що призводить до пригнічення процесів росту, протікання клітинного циклу та клітинної проліферації [32]. Розроблено низку похідних рапаміцину з більш

вигідними для використання в онкології фармакологічними характеристиками [33]. Надходячи до клітини, рапаміцин і рапалоги формують комплекс зі своїм внутрішньоклітинним рецептором FKBP12 (FK506-binding protein 12 kDa), і зрештою зв'язується FRB (FKBP12-rapamycin binding)-послідовністю mTOR – алостерично інгібуючи кіназну активність [34]. Комплекс рапаміцин-FKBP12 не здатен зв'язуватися з комплексом mTOR-2, однак інгібує його активність опосередковано при тривалій обробці клітин, поступово зв'язуючи наявний у вільній формі клітинний mTOR до його входження у комплекс mTOR-2 [35]. Незважаючи на потужний та майже універсальний протираковий ефект на тваринних моделях та клітинних лініях, похідні рапаміцину виявляють незадовільну ефективність у клінічних випробуваннях, за винятком карциноми нирок та деяких інших малопоширених форм раку [2].

1.2 mTOR-РЕГУЛЬОВАНА КЛІТИННА РУХЛИВІСТЬ

1.2.1. Клітинна рухливість і метастатичний каскад. Найбільш різкою та видимою зміною поведінки епітеліальної клітини у процесі канцерогенезу є набуття здатності переміщуватися [36], що уможливорює метастазування – причину 90% смертей від раку [37]. Багатоетапний процес метастазування або метастатичний каскад (рис. 2.1) передбачає здійснення клітинами безлічі скоординованих у часі та просторі функцій, зокрема відкріплення, міграції, інвазії, адаптації, прикріплення і ін. з залученням матриксних металопротеїназ (ММП) та механічних процесів, таких як клітинна адгезія, моторика та генерація сили [38]. Все це забезпечується ефективно узгодженими внутрішньоклітинними процесами, що регулюються низкою сигнальних молекул, зокрема інтегринів, малих ГТФ-аз родини Rho та FAK [39]. Дослідження останніх років ідентифікували додаткові білки та сигнальні шляхи, включно з PI3K/AKT/mTOR/S6K, що необхідні для регуляції рухливості та інвазії пухлинних клітин [40].

1.2.2. Комплекс mTOR-1 і клітинна рухливість. Перспективним сьогодні виявляється дослідження функцій mTOR-сигналіngu у процесах клітинної моторики, інвазії, міграції та загалом у метастазуванні. На низці клітинних ліній показано залучення mTOR-сигналіngu у забезпеченні клітинної рухливості і її послаблення впливом рапаміцину [41]. Однак, молекулярні механізми, що лежать в основі цієї функції mTOR-сигналіngu і сьогодні залишаються в цілому маловідомими. Аналіз наукових публікацій останнього десятиліття демонструє перспективність розгляду mTOR-сигнальної мережі як регулятора клітинної рухливості як за нормальних, так і патологічних умов. Припускається, що і mTOR/S6K1, і mTOR/4E-BP1 сигнальні шляхи залучені до регуляції даної функції [42]. Не лише S6K1, та сама фосфорильована кіназа mTOR, але й інші вищестоящі елементи mTOR-сигнального шляху (AKT1, PDK1, PI3K) виявлені співлокалізованими з актиновими арками – функціональними індикаторами клітинної рухливості. Показано, що блокування рапаміцином mTOR-сигналіngu ускладнює їх утворення (стимульоване ендотеліальним фактором росту (EGF)) [43]. Впливом рапаміцину також вдається інгібувати клітинний хемотаксис та хемокінез, що супроводжується ускладненням полімеризації актину та зниженням ступеня фосфорильовання і ензиматичної активності кінази S6K1 [44]. Експресія ж конститутивно активних форм S6K майже вдвічі мобілізує клітинну рухливість у відповідь на дію гепатоцитарного фактора росту (HGF), що пов'язують з можливим посиленням експресії кінази та протеолітичної активності ММП9 [45]. Розглядаються також механізми регуляції кіназою S6K1 клітинної рухливості, що передбачають участь у реорганізації F-актину (формування ламеліподій), експресії та активності Rho-ГТФ-ази, фосфорильовання білків фокальної адгезії (ФАК, паксиліну і p130Cas), тканинному ремодельованні [46]. Пригнічення функцій S6K1 послаблює стимульовану інсуліноподібним фактором росту (IGF) клітинну рухливість, як і посилення функції 4E-BP1 [42]. Має значення mTOR-сигналінг також і для інших процесів, що складають метастатичний каскад, зокрема для епітеліально-мезенхімального переходу

(EMT). Блокування mTOR-сигналіngu блокує стимульований трансформуючим ростовим фактором β (TGF- β) EMT та набуття інвазивного фенотипу [47]. Остання функція може пояснюватися кооперацією mTOR-сигналіngu з JAK/STAT-сигналіngом [48]. У процесі ангиогенезу, що супроводжує метастазування, функція mTOR пов'язується з ефектами фактора росту ендотелію судин (VEGF) і TGF- β [49].

1.2.3. Комплекс mTOR-2 і клітинна рухливість. Відомостей про роль mTOR у складі комплексу mTOR-2 у клітинній рухливості ще менше. Говорити про його потенціал у регуляції цього процесу дозволяє низка робіт, що пов'язує комплекс mTOR-2 з регуляцією різних елементів цитоскелету, активне ремоделювання якого є необхідним для переміщення клітини. Відомо, що дисфункція mTOR-2, викликана дефектами його складових, може бути причиною порушень клітинної полярності, організації кортикального F-актину [50] та актинової полімеризації загалом [27]. mTOR-2 також може впливати на активність хемотаксису компетентних до нього клітин, впливаючи на фосфорилування міозину-2 [50]. Цікаво, що вимикання функції комплексу веде до різних наслідків у різних клітинах, наприклад у клітинах лінії HeLa спостерігається посилення утворення стресових фібрил [51]. У якості потенційних медіаторів mTOR-2-контрольованих перебудов цитоскелету, розглядаються ГТФ-ази Rho та Rac [27], білки фокальної адгезії (FAK, паксиліну та p130cas) [52] та протеїнкіназа C- α (PKC α), однак механізми їхньої участі не встановлені [53].

1.2.4. mTOR-сигналізація і кератиновий цитоскелет. Жорсткості та водночас динамічності цитоскелету мігруючої епітеліальної клітини надає його кератинова складова. Молекулярні механізми процесу ремоделювання кератинових філаментів та його регуляції на сьогоднішній день малодосліджені. Припускається, що вони можуть залучати елементи mTOR-

сигнальної мережі, зокрема сигналінг кіназ АКТ-1, mTOR, АМФ-активованої проїнкінази (АМРК), мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК). Вважається, що одна з функцій кератинового циклу – формування нових контактів на периферії клітини [54]. Цікавою з цієї точки зору, виявляється характерна компартменталізація деяких кіназ та фосфатаз, зокрема FAK та РКС, що можливо беруть участь у підтримці локальної конфігурації мережі філаментів [55]. Відомо, що експресія цитокератину-17 рекрутує до цитоплазми білок 14-3-3, що стимулює mTOR-сигнальний шлях [56].

1.2.5. mTOR-сигналізація і кіназа FAK. FAK (focal adhesion kinase) – цитоплазматична тирозинова протеїнкіназа, що надекспресується за низки онкологічних захворювань [57]. FAK визначають як найхарактернішу сигнальну молекулу локалізовану біля точок фокальної адгезії [58], а також важливий позитивний регулятор клітинної рухливості [39]. Встановлено участь кінази у субстрат-незалежному рості пухлинних клітин [59]. FAK-один з можливих медіаторів сигналінгу комплексу mTOR-1 через S6K1 [46], комплекс mTOR-2 [52], а також може безпосередньо зв'язуватися з РІЗК, у комплексі з якою позитивно впливає на клітинну рухливість [39].

1.3 ФІБРОБЛАСТИ ЯК ОСНОВНИЙ КОМПОНЕНТ ПУХЛИННОЇ СТРОМИ.

1.3.1. Система пухлина-строма. Набуття пухлинною клітиною здатності активно змінювати своє положення в організмі з наступним метастазуванням – один з наслідків виникнення і накопичення в ній генетичних та епігенетичних змін [60]. Однак, важлива, а можливо й домінуюча, регуляторна роль у метастатичному каскаді належить двосторонній взаємодії з пухлино-асоційованою стромою, що підтверджується постійно зростаючою кількістю експериментальних даних [3]. Механізми такої взаємодії залучають

як ПКМ, так і нетрансформовані клітинні компоненти, зокрема ендотеліоцити, пухлино-асоційовані фібробласти (ПАФ), мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), різноманітні імунні клітини, включаючи лімфоцити та пухлино-асоційовані макрофаги (ПАМ) [61]. Генна експресія представників подібних клітинних популяцій може зазнавати суттєвих змін, що виробляє унікальні для розвитку пухлини умови, не притаманні нормальній тканині [62]. Характер пухлино-стромального діалогу може змінюватися на різних етапах канцерогенезу з переважанням чи то позитивного, чи то негативного впливу на нього [63,64]. Це забезпечується різноманіттям медіаторів взаємодії, що включає, ростові фактори, хемокіни, цитокіни, протеолітичні ензими та низку різних сигнальних молекул [3].

Пухлино-стромальна взаємодія не обмежується елементами, що розташовані безпосередньо у пухлинному утворенні або такими, що фізично контактують з ним. Такі елементи називають внутрішнім пухлинним середовищем і саме до нього прикута увага більшості досліджень стромальної взаємодії *in vitro*. Однак, розрізняють також зовнішнє пухлинне середовище, елементи якого можуть розташовуватися на відстані міліметрів і навіть сантиметрів від пухлини і також здійснюють суттєвий вплив на її розвиток [65]. Дослідження ролі віддалених елементів важливе для повноцінного розуміння взаємодії трансформованих та нетрансформованих клітин в межах організму та розробки ефективних стратегій лікування.

1.3.2. Загальна характеристика нормальних та пухлино-асоційованих фібробластів. Фібробласти складають основний клітинний компонент пухлинної стромы і є найбільш досліджуваним типом її клітин. Велика кількість експериментальних даних демонструє важливу регуляторну їх функцію протягом усіх етапів канцерогенезу, що забезпечується тісною інформаційною взаємодією з пухлинними клітинами [66]. Двобічність цієї взаємодії позначається також і на самих фібробластах. В умовах канцерогенезу ці клітини зазнають активації, що супроводжується посиленням їх метаболічної

активності, зростанням проліферативного індексу, інтенсифікацією секреції компонентів ПКМ та різних сигнальних молекул. Зміни виявляються настільки суттєвими, що виявляється потрібним розглядати окрему фенотипову групу клітин – пухлино-асоційовані фібробласти [67]. Однак, важливо розуміти, що хоча ПАФ і набувають деяких онкоасоційованих змін, вони все ж не є трансформованими клітинами [68] і їхній фенотип, вочевидь є наслідком постійної динамічної взаємодії з інтерактивними пухлинними клітинами [69]. З цієї точки зору, пухлинна клітина може сама ж виступати одним із факторів, що детермінують характер впливу на неї з боку ПАФ [70]. Разом проходженням пухлинною клітиною різних етапів канцерогенезу, розвивається та змінюється і характер взаємодій з ПАФ [71]. ПАФ поширені як у зовнішньому, так і у внутрішньому пухлинному мікросередовищі [36] і іншим важливим фактором виявляється взаємна локалізація партнерів взаємодії. Фібробласти локалізовані у в межах пухлини чи поза нею чи отримані від різних пацієнтів можуть по-різному впливати на ракові клітини [72]. Виявлено відмінні профілі експресії генів, що кодують цитокіни, ростові фактори, ензими та компоненти ПКМ у ПАФ з різною локалізацією. Ці відмінності вважають наслідком перебування ПАФ у різних інформаційних середовищах, а відповідно різного зовнішньо- та внутрішньоклітинного сигналіну [73]. Наявні також дані про присутність епігенетичних змін у геномі ПАФ, а саме у змінах паттерну метилування ДНК [74]. Встановлено, що діалог між раковими клітинами і ПАФ, який забезпечується секрецією сигнальних молекул не вимагає прямого фізичного контакту між цими типами клітин [75], однак його наявність може так модифікувати профілі генної експресії, як це не спостерігається при лише паракринній взаємодії [76]. Інший опосередкований механізм впливу ПАФ на пухлинну клітину – продукція білків ПКМ. Біофізичні властивості ПКМ побудованого ПАФ є фактором рухливості та інвазивності пухлинної клітини, а також стимулятором секреції білків-регуляторів ангіогенезу та тканинного ремоделювання [77]. Показано, що співкультивування клітин лінії MCF-7

(Michigan Cancer Foundation-7) з фібробластами *in vitro* змінює міграційний потенціал цих клітин [78].

1.3.3. Паракринні фактори ПАФ. Фактор TGF- β (transforming growth factor-beta) – виявляє паракринний онкосупресорний ефект на ранніх стадіях канцерогенезу та онкогенний на пізніх [79]. TGF- β /Smad-залежний сигналінг стримує клітинний ріст. TGF- β /Smad-незалежний сигналінг залучає PI3K, MAPK, TRAF6-TAK1 та RhoA-Rock сигнальні шляхи [80]. Виявлено вплив на фенотип міофібробластів за аутокринним механізмом [81]. Підконтрольні біологічні процеси – ЕМП, клітинна рухливість, інвазія, апоптоз. Блокування TGF- β -сигналінгу здатне обмежувати міграційний потенціал [82].

Фактор SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) – залежно від низки асоційованих з ним сигнальних шляхів може виявляти як пригнічуючий, так і сприяючий паракринний ефект на клітинні процеси проліферації, міграції та ангиогенезу [83]. SDF-1 через свій мембранний рецептор CXCR4 може передавати сигнал на кіназу АКТ, що позитивно впливає на канцерогенез, а також нівелює негативний вплив TGF- β на цей процес. Експресія CXCR4 у пренеопластичних клітинах посилюється TGF- β [84].

Фактор VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) – індуктор як фізіологічного, так і пухлинного ангиогенезу. VEGF здатен посилювати сигналінг CXCR-4 та, як наслідок, SDF-1 [85], що має вплив на міграційний потенціал. Також VEGF активує PI3K, яка опосередковано через АКТ індукує експресію HIF-1 та самого VEGF [86], а також активує сигналінг кінази ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) та фактора NF- κ B (nuclear factor kappa-B), що сприяє пухлинному ангиогенезу [87].

Фактор HGF (hepatocyte growth factor) – ліганд рецепторної тирозинової кінази Met, що позитивно паракринно впливає на канцерогенез. Посилена експресія та секреція HGF у фібробластах стимулюється багатьма типами пухлинних клітин [88]. Активована Met може безпосередньо активувати PI3K,

а та в свою чергу – АКТ, що опосередковує основні ефекти HGF – сприяння інвазії, морфогенезу та виживання [89].

Фактори FGFs (fibroblast growth factors) – регулятори низки біологічних процесів, зокрема проліферації, диференціації, міграції, виживання та ангиогенезу у нормі, їх надмірної активації у канцерогенезі, а також хіміо- та радіорезистентності. Надекспресія FGFs 1, 2, 6, 8 у ракових клітинах здійснює як аутокринний ефект, так і паракринно впливає на клітини стромі. Активація рецепторів FGFs на мембранах пухлинних клітин залучає сигналінг численних сигнальних шляхів, зокрема фосфоліпази C- γ , PI3K, MAPK, STAT [90].

ММП – родина ендопептидаз, секреція яких як здійснюється раковими клітинами, так і стимулюється ними у стромі, зокрема фібробластах. Деградуючи низку компонентів ПКМ, сприяючи вивільненню ангиогенних та пептидних ростових факторів, а також регулюючи інтегриновий сигналінг ММП сприяють проліферації, ЕМП, міграції, інвазії та ангиогенезу здійснюваних пухлинними клітинами. Онкосупресорний ефект ММП полягає у здатності до лізису рецепторів ростових факторів [91]. PI3K-сигналінг сприяє функціям ключової для метастазування ММП2 та клітинній рухливості [92].

1.4 ОСНОВИ МОДЕЛЮВАННЯ ПУХЛИНО-СТРОМАЛЬНОЇ ВЗАЄМОДІЇ ТА КЛІТИННОЇ РУХЛИВОСТІ

1.4.1. Системи співкультивування *in vitro*. Дослідження ліній ракових клітин стали підґрунтям більшої частини відомостей про молекулярну організацію раку, однак, не можуть бути достатньо інформативними щодо вияву впливу мікросередовища на ракову прогресію. Вирішенням даної проблеми у сучасних дослідженнях стало застосування систем співкультивування *in vitro*. Вони представляють собою керовані системи, що використовуються для вивчення змін експресії генів та відповідних їм клітинних фенотипів, які розвиваються за умов пухлино-стромальних

взаємодій. Головною перевагою їх застосування є можливість більш деталізованого моделювання біологічної поведінки пухлинних і непухлинних клітин [93].

1.4.2. Тривимірні культури. Тривимірні культури, так само як і двовимірні, мають низку параметрів, змінюючи які можна оптимально налаштувати модель на вивчення досліджуваного фенотипу [69]. Перевага 3D-культур полягає у наданні культурі можливості самоорганізовуватися у просторі і, таким чином, часткової імітації тканинної структури *in vivo* [94]. Відомо, також що профілі генної експресії клітин одного і того ж типу у 3D- та 2D- культурах виявляють суттєві відмінності. Зміни можуть охоплювати і функціонування сигнальних систем, зокрема це показано на PI3K-AKT та RAS-MARK шляхах у всіх досліджуваних клітинних лініях раку молочної залози [95]. Також відомо, що фосфорилування кінази FAK по Тир³⁹⁷ у точках фокальної адгезії практично відсутнє у фібробластах людини за умов їх культивування у 3D культурі, що присутнє при 2D-культивуванні. Це пояснюється залежністю FAK-сигналіngu від характеристик ПКМ та субстрату [96].

Найпопулярніший метод 3D-культивування – формування багатоклітинних сфероїдів. Використання цього методу є оптимальним для дослідження впливу на пухлину як протипухлинних препаратів, так і інших молекулярних агентів. Перевагами дослідження багатоклітинних сфероїдів у якості моделей структури пухлини як більш адекватної до такої *in vivo* вважаються: моделювання 3D-архітектури завдяки самоорганізації клітин та елементів ПКМ у просторі; забезпечення розширених можливостей щодо утворення міжклітинних контактів, зокрема щільних з'єднань; врахування дифузних обмежень щодо доступу розчинних речовин до клітин; забезпечення ефективної гетеро типової міжклітинної взаємодії при формуванні сфероїдів співкультурами з різним кількісним співвідношенням [97].

1.4.3. Модель раневої поверхні. Моделювання раневої поверхні – класичний метод дослідження клітинної рухливості у двовимірних умовах, що полягає у фізичному розділенні конфлюентного моношару клітин і оцінці динаміки заповнення утвореного проміжку мігруючими клітинами [98]. Перевагами цього методу вважаються простота його виконання та аналізу результатів, можливість дослідження у реальному часі, спрямованість клітинного руху, можливість вимірювання швидкості міграції, дешевизна. Головний же недолік цього методу пов'язаний з впливом людського фактора на етапі фізичного розділення клітинного моношару, що ускладнює стандартизацію розмірів раневої поверхні у межах експерименту. Щоразу різне розсікання моношару ставить клітини у неоднакові стартові умови міграції, а це може суттєво спотворювати отриманий результат [99].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та реактиви

Усі використані у роботі матеріали та реактиви відповідали вимогам, прийнятим для застосованих методів.

У роботі використовували наступні матеріали та реактиви:

- компоненти буферних розчинів – трис(гідроксиметил)амінометан (Am-O497-0.5, Helicon Company, Росія), натрій хлорид (31434, Sigma-Aldrich, США), β-гліцерофосфат (35675, Sigma-Aldrich, США), калій хлорид (P9541 Sigma-Aldrich, США), натрій гідрофосфат (S9763 Sigma-Aldrich, США), калій дигідроортофосфат (P9791, Sigma-Aldrich, США), оцтова кислота (A6283, Sigma-Aldrich, США), купрум (II) сульфат (451657, Sigma-Aldrich, США), амоній ацетат (D16656, Helena Biosciences, Велика Британія);
- спирти – етанол (493511, Sigma-Aldrich, США), метанол (322415, Sigma-Aldrich, США), гліцерол (G5516, Sigma-Aldrich, США);
- поживне середовище Ігла, модифіковане Дульбекко «DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine» (21969035, Gibco™, США) та ембріональна бичача сироватка (ЕБС) (SH30070.03, HyClone™, США);
- амінокислоти – глютамін (G3126, Sigma-Aldrich, США), гліцин (G8898, Sigma-Aldrich, США), бичачий сироватковий альбумін (БСА) «Bovine Serum Albumin Fraction V» (10 735 078 001, Roche, Швейцарія);
- молоко сухе знежирене (#1706404XTU, Bio-Rad Laboratories, Inc., США) та желатин (G9391, Sigma-Aldrich, США);
- протеолітичний фермент – трипсин (15050065, Trypsin (0.25%), phenol red, Gibco™, США);

- антибіотики – пеніцилін та стрептоміцин (15140148, Gibco™, США), амфотерицин В (15290026, Gibco™, США), рапаміцин (#9904, Cell Signaling Technology, США);
- хелатоутворюючий агент – етилендіамінтетраоцтова кислота (15575020, Invitrogen™, США);
- кріопротектор – диметилсульфоксид (D8418, Sigma-Aldrich, США);
- набір реагентів для ПЛР-тестування клітинних культур на контамінацію мікоплазмою «ScienCell™ Mycoplasma PCR Detection Kit» (#8208, ScienCell Research Laboratories, США);
- детергенти – Triton™ X-100 (T8787, Sigma-Aldrich, США) та TWEEN® 20 (P9416, Sigma-Aldrich, США);
- денатуруючі агенти – натрій додецилсульфат (L3771, Sigma-Aldrich, США) та α -дитіотреїтол (1.11474, Millipore, США);
- інгібітори протеаз – суміш «cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail» (11 697 498 001, Roche, Швейцарія);
- інгібітори фосфатаз – натрій фторид (201154, Sigma-Aldrich, США), натрій ортованадат (450243, Sigma-Aldrich, США), натрій пірофосфат (P8010, Sigma-Aldrich, США) та суміш «Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets» (A32957, Thermo Scientific™, США);
- фотопротектор 1,4-діазобіцикло[2,2,2]октан (D27802, Sigma-Aldrich, США);
- полімерні основи розподільних гелів – агароза (11400, SERVA Electrophoresis GmbH, Німеччина), акриламід (A3553, Sigma-Aldrich, США) та біс-акриламід (1.01546, Sigma-Aldrich, США);
- каталізатори полімеризації акриламіду – тетраметилетилендіамін (2367.2, Carl Roth GmbH & Co. Kg, Німеччина) та амоній персульфат (17874, Thermo Scientific™, США);
- маркери молекулярних мас «100 bp DNA Ladder» (N3231S, New England Biolabs, США), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (26619, Thermo Scientific™, США);

- моноклональні, поліклональні, кон'юговані та флюоресцентно-мічені антитіла перелічені у таблицях 2.1 та 2.2;

Таблиця 2.1.

**Антитіла застосовані для імуноблот детекції
вибраних білків у клітинних лізатах**

Антитіла	Виробник, каталожний номер	Застосоване розведення
Козячі поліклональні анти-mTOR «mTOR Antibody (N-19): sc-1549»	Santa Cruz Biotechnology, sc-1549	1:1000
Кролячі поліклональні анти-S6K1 (C-кінець)	(Savinska et al., 2001) [M1]	1:3000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-mTOR (Серин-2448) «Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP [®] Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #5536	1:1000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-p70S6K (Треонін-389) «Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #9234	1:1000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-S6 (Серин-235/236) «Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP [®] Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #4858	1:2000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-Raptor (Серин-792) «Phospho-Raptor (Ser792) Antibody»	Cell Signaling Technology, #2083	1:1000

Кролячі поліклональні анти-фосфо-eEF2k (Серин-366) «Phospho-eEF2k (Ser366) Antibody»	Cell Signaling Technology, #3691	1:1000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-Akt (Серин-473) «Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP [®] Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #4060	1:2000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-GSK-3 β (Серин-9) «Phospho-GSK-3 β (Ser9) (D85E12) XP [®] Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #5558	1:1000
Кролячі моноклональні анти-фосфо-субстрат Akt (послідовність Арг-Х-Х-фосфо-Сер/Тре) «Phospho-Akt Substrate (RXXS*/T*) (110B7E) Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #9614	1:1000
Кролячі поліклональні анти-фосфо-ФАК (Тирозин-925) «Phospho-ФАК (Tyr925) Polyclonal Antibody»	Thermo Fisher Scientific, #PA5-17733	1:1000
Кролячі моноклональні анти- β 1 інтегринові «Recombinant Anti-Integrin beta 1 antibody [EPR16895]»	Abcam, ab179471	1:500
Мишачі моноклональні анти-CD44 людини «Purified Mouse Anti-Human CD44»	BD Pharmingen, 550392	1:500
Мишачі моноклональні анти-CD326/ЕрСАМ людини	ІЄПОР НАН України	(5 мкг/мл)
Мишачі моноклональні анти-CD227/MUC1 людини	ІЄПОР НАН України	(5 мкг/мл)
Мишачі моноклональні анти- CD66e/СЕАСАМ5 людини	ІЄПОР НАН України	(5 мкг/мл)

Кролячі моноклональні анти- β -актинові « β -Actin (13E5) Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #4970	1:1000
Мишачі моноклональні анти- β -актинові «Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse clone AC-15»	Sigma-Aldrich, A5441	1:20000
Мишачі моноклональні анти-цитокератинові «Anti-Cytokeratin pan antibody, Mouse monoclonal clone C-11»	Sigma-Aldrich, P2871	1:2000
Мишачі моноклональні анти-віментинові «Anti-Vimentin antibody, Mouse monoclonal clone V9, purified from hybridoma cell culture»	Sigma-Aldrich, V6389	1:1000
Кролячі поліклональні анти-ZO-1 «ZO-1 Polyclonal Antibody»	Invitrogen, 61- 7300	1:1000
Мишачі моноклональні анти-GAPDH «GAPDH (D4C6R) Mouse mAb»	Cell Signaling Technology, #97166	1:1000
Кролячі моноклональні анти- β -тубулінові « β -Tubulin (D2N5G) Rabbit mAb»	Cell Signaling Technology, #15115	1:1000
Козячі поліклональні мічені пероксидазою хрону анти-мишачі IgG «Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)»	Jackson Immuno- Research Labs, 115-035-003	1:10000
Козячі поліклональні мічені пероксидазою хрону анти-мишачі IgG «Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)»	Jackson Immuno- Research Labs, 111-035-003	1:10000

Таблиця 2.2.

Антитіла застосовані для імунофлуоресцентної детекції
вибраних білків у клітинах

Антитіла	Виробник, каталожний номер	Застосоване розведення
Мишачі моноклональні анти-поверхневий антиген фібробластів «Monoclonal Anti-Fibroblast Surface Protein antibody produced in mouse»	Sigma-Aldrich, F4771	1:250
Кролячі поліклональні анти-ZO-1 «ZO-1 Polyclonal Antibody»	Invitrogen, 61-7300	1:1000
Мишачі моноклональні анти-цитокератинові «Anti-Cytokeratin pan antibody, Mouse monoclonal clone C-11»	Sigma-Aldrich, P2871	1:2000
Козячі поліклональні мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом анти-мишачі IgG «Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)»	“Jackson Immuno-Research”, 115-095-146	1:100
Віслучі поліклональні мічені флуоресцеїн ізотіоціанатом анти-кролячі IgG «Fluorescein (FITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)»	“Jackson Immuno-Research”, 711-095-152	1:100

- полімерна детектувальна система «Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer» (TL-060-HL, Thermo Scientific™, США);
- хемілюмінесцентний субстрат для детекції пероксидази хрому – Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (32109, Thermo Scientific™, США);

- фарбники кумасі діамантовий блакитний G-250 у складі реагенту «Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent» (23238, Thermo Scientific™, США), кумасі діамантовий блакитний R-250 «Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye» (20278, Thermo Scientific™, США), етидій бромід (E7637, Sigma-Aldrich, США), 4',6-діамідино-2-феніліндол дигідрохлорид «DAPI» (62247, Thermo Scientific™, США), фарбник Май-Грюнвальда (MG500, Sigma-Aldrich, США), фарбник Гімзи (G5637, Sigma-Aldrich, США), бромфеноловий синій (B0126, Sigma-Aldrich, США), буфер-фарбник для нанесення зразків ДНК «DNA Gel Loading Dye (6X)» (R0611, Thermo Scientific™, США);
- гістологічний фіксатор – 10% розчин формаліну (22050104, Fisher Scientific, США);
- середовище для цитологічних мікропрепаратів – «Mowiol® 4-88» (81381, Sigma-Aldrich, США);
- лабораторний посуд: скляний – «Duran®», «RASOTHERM®», «PYREX®» (DWK Life Sciences, Німеччина), «Simax®» (Kavalierglass, Inc., Чеська Республіка), «Т С» (Т С Scientific Glass Industries, Індія), пластиковий – «CLEARLine®» (Biosigma S.p.A., Італія), стерильний – «TPP®» (TPP Techno Plastic Products AG, Швейцарія);
- криопробірки «Bio-Freezer™ Vials» (XX, Costar corporation, США);
- цитологічне скло (VWR International, Німеччина та Yancheng Tiandi Labware Factory, Китай);
- антибактеріальні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм «Millex-GV Syringe Filter Unit, 0.22 µm, PVDF, 33 mm, gamma sterilized» (SLGV033RS, Millipore, США), клітинні фільтри з діаметром пор 70 та 100 мкм «Falcon® 100 µm Cell Strainer» та «Falcon® 70 µm Cell Strainer» (352350, 352360, Corning, США);
- полівініліденфторидна мембрана «Immobilon-P PVDF Membrane» (IPVH00010, Millipore, США);
- рентгенівська плівка «CP-BU M FILM» (Agfa, Бельгія);
- папір фільтрувальний лабораторний листовий марки «Ф» (ПрАТ «Склоприлад»).

2.2. Обладнання

Роботу виконано з використанням обладнання науково-технічної бази відділу сигнальних систем та приладів загального користування Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

У роботі було використано наступне обладнання: вертикальний ламінарний бокс другого класу захисту з HEPA фільтром «NUAIRE AireGard NU-126-400 Vertical Laminar Airflow Workstation» (NuAire, США), CO₂-інкубатор «New Brunswick™ Galaxy® 170S CO₂ Incubator» (Eppendorf, Німеччина), інвертований мікроскоп «CETI Versus» (CETI, Бельгія), лазерний скануючий конфокальний мікроскоп «Zeiss LSM 510 META Confocal Microscope» (Zeiss AG, Німеччина), цифрова фото/відеокамера-окуляр для мікроскопії «eTREK DCM 320» (eTREK, Китай), камера Горяєва 2-х сіткова (MICROmed, Україна), об'єкт-мікрометр відбитого світла «ОМПУ4.2 0,01 мм» (ЛОМО, СРСР), ампліфікатор «FlexCycler» (Analytik Jena, Німеччина), камера для горизонтального електрофорезу «multiSUB Mini, Mini Horizontal Electrophoresis System» (Clever Scientific, Велика Британія), система для вертикального електрофорезу «omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System CVS10DSYS» та модуль для «мокрого» електроперенесення «omniBLOT Mini Insert» (Clever Scientific, Велика Британія), система гелъ-документування «ChemiDoc™ XRS+ System» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), універсальний автоматичний фотометр «BioTek ELx800» (BioTek Instruments, Inc., США), холодильник «Snaige (soft plus) Class A» (Snaigė, Литва), генератор льоду «NTF SLF 190 A-Q» (N.T.F. S.r.l., Італія), камера уповільненого заморожування «Mr. Frosty™ Freezing Container» (Thermo Scientific™, США), ультранизькотемпературна морозильна камера «Forma™ 88000 Series -86°C Upright Ultra-Low Temperature Freezer» (Thermo Scientific™, США), кріосховище «LS6000» (Taylor-Wharton®, США), термостат електричний сухоповітряний «ТС-1/20 СПУ» (Смоленск СКТБ СПУ, Росія), твердотільний термостат «Терміт» (Helicon Company, Росія), вертикальний паровий стерилізатор «DGM-

200S» (DGM Pharma Apparate, Швейцарія), водяна баня «Grant JB1» (Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Велика Британія), мікрохвильова піч «LG MS1929G» (LG Group, Південна Корея), система очистки води «Milli-Q® Reference Water Purification System» (Merck & Co., Inc., США), цифрова система вимірювання рН «рН «BECKMAN® φ31 рН Meter» (Beckman Instruments, Inc., США), механічні дозатори серії «Proline® Plus» (Biohit™, Фінляндія), центрифуги «Eppendorf MiniSpin®» (Eppendorf, Німеччина) та «Centrifuge 5415 R» (Eppendorf, Німеччина), перемішувачі гойдальний «Mini Rocker-Shaker MR-1» (Biosan, Латвія) та ротаційний «Multi-Rotator Multi Bio RS-24» (Biosan, Латвія) магнітний перемішувач/нагрівач «Corning Hotplate Stirrer PC-351» (Corning Inc., США), аналітичні ваги «KERN® 770-14» (KERN & SOHN GmbH, Німеччина), аспіратор «SUCTION UNIT CA-MI NEW ASPIRET» (CA-MI Srl, Італія), джерело живлення «PowerPac™ Basic Power Supply» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), ноутбук «Acer Aspire 5920G» (Acer Inc., Китай).

2.3. Біологічний матеріал

Роботу побудовано на моделі клітинних ліній. У роботі було використано клітини інвазивної аденокарциноми протоків молочної залози людини лінії MCF-7, клітини аденокарциноми шийки матки людини лінії HeLa та ембріональні фібробласти миші лінії NIH 3T3 надані к.б.н., с.н.с. Хоруженко А. І., генетично модифіковані за допомогою технології CRISPR/Cas9 стабільні клітинні лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) надані к.б.н., м.н.с. Зайцем та к.б.н., м.н.с. Косач, а також дермальних фібробластів людини виділених зі зразків шкіри. Фрагменти шкіри людини у вигляді післяопераційного матеріалу було отримано на основі договору про науково-технічне співробітництво з ПрАТ «Інститут краси». Пацієнтів було проінформовано та отримано їхню письмову згоду на використання післяопераційного матеріалу для наукових досліджень.

2.4. Приготування розчинів та буферних систем

Приготування, зберігання та транспорт розчинів і їхніх компонентів здійснювали з використанням високочистого пластикового та скляного посуду, автоматичних дозаторів, наконечників автоматичних дозаторів та гумових рукавичок одноразового використання сертифікованих для роботи в біологічній лабораторії. Розчини готували на основі води надвисокої очистки отриманої за допомогою сертифікованої системи очистки води «Milli-Q® Reference Water Purification System». Рівень рН приготованих розчинів контролювали за допомогою цифрової вимірювальної системи з комбінованим водневим електродом. Стерилізацію розчинів, які використовувалися у роботі з клітинними культурами виконували шляхом автоклавування під тиском 1,5 атм та температури 128°C протягом 40 хв або фільтруванням крізь антибактеріальні фільтри.

2.5. Виділення дермальних фібробластів людини

Дермальні фібробласти виділяли експлантатним методом зі стимулюванням міграції на желатиновому покритті. Ростову поверхню вкривали стерилізованим теплим водним 0,5%-м розчином желатину у кількості 70-80 мкл/см². Адгезію білків до поверхні проводили протягом 40 хв за температури 37°C, після чого надлишок розчину видаляли. Фрагменти шкіри стерилізували ззовні 70%-м етанолом протягом 5-10 с, промивали розчином антибіотиків (100 од/мл – пеніциліну, 100 мкг/мл – стрептоміцину, 0,5 мкг/мл – амфотерицину В на основі фосфатного буферу) та очищали від волосся, кровоносних судин і підшкірної клітковини. Очищені фрагменти подрібнювали на менші, об'ємом близько 2-3 мм³, додатково промивали розчином антибіотиків та висаджували на желатинове покриття. Прикріплені експлантати покривали свіжим поживним середовищем з підвищеним до 20% вмістом ЕБС

та культивували протягом 10-12 днів. Після міграції фібробластів на ростову поверхню експлантати видаляли, а фібробласти продовжували культивувати у вигляді первинної культури клітин. Відсутність клітин інших типів у культурі перевіряли за допомогою імунофлюоресцентної реакції з детекцією поверхневого антигену фібробластів.

Роботу з післяопераційним матеріалом виконували згідно з правилами експертної комісії з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

2.6. Культивування клітин людини

Культивування клітин проводили з урахуванням рекомендацій організації «American Type Culture Collection (ATCC)». Всі операції пов'язані з культивуванням виконували у стерильних умовах за допомогою використання стерильного одноразового посуду та вертикального ламінарного боксу «NUAIRE AireGard NU-126-400 Vertical Laminar Airflow Workstation». Клітини культивували у поживному середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко та збагаченому 10%-м вмістом ЕБС, 2 мМ – L-глутаміну з додаванням 50 од/мл – пеніциліну та 50 мкг/мл – стрептоміцину. Інкубацію клітин проводили за температури 37°C у вологій атмосфері з 5% вмістом вуглекислого газу у CO₂-інкубаторі «New Brunswick™ Galaxy® 170S CO₂ Incubator». Відповідно поживне середовище, його компоненти та всі розчини, що використовували у роботі з клітинами заздалегідь нагрівали до 37°C на водяній бані. Огляд конфлюентності клітинного моношару та стану поживного середовища проводили щоденно. При досягненні моношаром 90% конфлюентності клітини пасажували з розведенням 1/4 – для MCF-7 і HeLa та 1/2 для дермальних фібробластів. За такого розведення пасажування виконували з періодичністю 1 раз на 3-4 доби. Для відкріплення клітин з ростової поверхні виснажене культуральне середовище видаляли, клітини двічі промивали фосфатним

буфером (140 мМ – натрій хлориду, 2,6 мМ – калій хлориду, 10 мМ – натрій гідрофосфату та 1,8 мМ – калій дигідроортофосфату на основі води, рН 7,4.) та за температури 37°C протягом 3-5 хв піддавали дії протеолітичного розчину (0,25% – трипсину, 0,02% – ЕДТА на основі фосфатного буферу). Дію трипсину зупиняли додаванням поживного середовища і суміш з відкріпленими клітинами ресуспендували. Для видалення залишків розчину суспензію центрифугували при швидкості 1000 об/хв протягом 5 хв, надосадову рідину видаляли, а осад з клітинами ресуспендували у поживному середовищі. Частина очищеної суспензії рівномірно розподіляли на новій ростовій поверхні у свіжому поживному середовищі. Перед залученням до проведення окремих серій експериментів клітини тестували на контамінацію мікоплазмою.

2.7. Кріоконсервування клітин

Поза культивуванням клітини зберігали за допомогою кріоконсервування. Для цього клітини відкріплювали з ростової поверхні, очищали від залишків протеолітичного розчину та ресуспендували у розчині для кріоконсервування – 10%-му розчині диметилсульфоксиду у ЕБС. Суспензію поміщали у кріопробірку, заморожували до -80°C за допомогою камери уповільненого заморожування «Mr. Frosty™ Freezing Container» та зберігали у кріосховищі «LS6000» у рідкому азоті за температури -196°C до потреби.

Для розморожування клітини у кріопробірці нагрівали на водяній бані за температури 37°C протягом 1-2 хв. Розморожену суспензію центрифугували при швидкості 1000 об/хв протягом 5 хв і видаляли надосадову рідину. Для видалення залишків диметилсульфоксиду осад ресуспендували у фосфатному буфері і повторно центрифугували та видаляли надосадову рідину. Відмитий осад з клітинами ресуспендували у свіжому поживному середовищі з підвищеним до 20% вмістом ЕБС і рівномірно розподіляли на новій ростовій поверхні.

2.8. ПЛР-тестування клітинних культур на контамінацію мікоплазмою

Контроль контамінованості клітинних культур мікоплазмою здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та набору реагентів «ScienCell™ Mycoplasma PCR Detection Kit». Реакційну суміш готували згідно рекомендацій виробника шляхом змішування: 19 мкл стерильної води надвисокої очистки, 25 мкл «2×PCR master mix» (суміші буферу для ПЛР, ДНК полімерази та дНТФ), 1 мкл специфічних праймерів до генів прокаріотичної 16S рРНК «Mycoplasma primer set» та 5 мкл КС клітинної культури, стан якої обстежується. Для контролю коректності позитивного результату тестування в окрему суміш замість КС додавали 1 мкл геномної ДНК *M. fermentans* «*M. fermentans* positive control (0.05ng/μl)». Відповідно для контролю коректності негативного результату тестування в іншу суміш замість КС додавали додатковий 1 мкл стерильної води надвисокої очистки. Реакцію ампліфікації ДНК методом ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора «FlexCycler». Програма ПЛР включала: етап попередньої денатурації (30 с, 94°C), етап 40 циклів денатурації (30 с, 94°C), відпалу праймерів (30 с, 55°C) та елонгації (1 хв, 72°C), а також етап завершальної елонгації (5 хв, 72°C).

2.9. Електрофоретичне розділення ДНК

Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофоретичного розділення ДНК у 1,5% агарозному гелі з додаванням етидій броміду. У якості буфера для електрофорезу використовували трис-ацетатний буфер (40 мМ – трису, 20 мМ – оцтової кислоти, 1 мМ – ЕДТА на основі води, рН 8,5). Для приготування гелю агарозу змішували з трис-ацетатним буфером і суміш кип'ятили до повного розчинення агарози. Після охолодження до близько 50°C додавали етидій бромід у концентрації 0,5 мкг/мл і суміш вносили у камеру для

горизонтального електрофорезу «multiSUB Mini, Mini Horizontal Electrophoresis System» з формуванням лунок для зразків. На полімеризацію гелю виділяли 20 хв, після чого змішували по 10 мкл відповідного продукту ПЛР з 2 мкл буферу для нанесення зразків «DNA Gel Loading Dye (6X)» і суміші вносили у лунки гелю. Для можливості визначення розмірів ДНК у продуктах ПЛР проводили суміжне розділення суміші ДНК-маркерів молекулярних мас «100 bp DNA Ladder». Електрофорез ДНК у сумішах ініціювали струмом з фіксованою напругою 120 В. По завершенні процесу розділену за розміром та мічену ДНК візуалізували шляхом опромінення гелю ультрафіолетом за допомогою системи гел-документування «ChemIDoc™ XRS+ System». Наявність у продукті ампліфікованої ДНК розміром 280 пар основ означала позитивний результат тестування. Результати одного з проведених тестів у вигляді електрофореграми зображено на рис. 2.1.

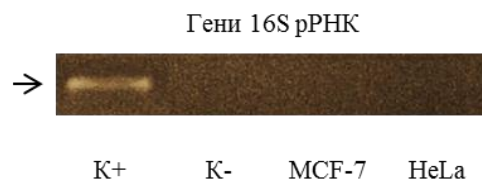


Рис. 2.1. Електрофореграма негативного тесту на контамінацію клітинної культури мікоплазмою. Наявність у продукті ПЛР ампліфікованої ДНК розміром 280 пар основ – ознака контамінації культури мікоплазмою

2.10. Приготування кондиціонованого середовища

Клітини культивували до формування ними моношару конфлюентністю 80%, виснажене культуральне середовище видаляли, клітини двічі промивали фосфатним буфером і покривали свіжоприготованим поживним середовищем. Кондиціонування середовища проводили протягом 24 годин за стандартних умов культивування клітин, після чого його відбирали і очищали від клітинних

решток шляхом центрифугування при швидкості 1000 об/хв протягом 5 хв за кімнатної температури. Кондиціоноване середовище зберігали за температури - 80°C.

2.11. Співкультивування клітинних культур

Клітинні культури співкультивували на моделях «раневої поверхні» та моделі реверсії багатоклітинного сфероїда.

Співкультивування на моделі «раневої поверхні» організовували шляхом почергового висаджування та розмежованого на ростовій поверхні культивування клітин різного типу. Першими на периферію ростової поверхні висаджували дермальні фібробласти у кількості, що відповідала 40000/см² та культивували протягом 3 год для їхнього прикріплення, після чого культуральне середовище видаляли та двічі промивали фібробласти фосфатним буфером. Наступними на центральну частину ростової поверхні висаджували клітини MCF-7 у кількості 80000/см² та співкультивували протягом 48 год з формуванням спільного моношару конфлюентністю 90% та очікуваним зміщенням кількісного співвідношення фібробласти : MCF-7 з вихідного 1 : 2 до 1 : 4 (внаслідок вдвічі повільнішої проліферації фібробластів).

Розробка та впровадження у практику оригінального методу висаджування та співкультивування двох типів клітин, що уможливило вимірювання їхньої міграційної активності на моделі «раневої поверхні» – один з результатів дисертаційної роботи. Запропонований метод та його можливості детально описано у розділі «результати експериментальних досліджень».

Співкультивування на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда організовували безпосередньо в експериментальних умовах шляхом об'єднання заздалегідь сформованих двовимірної культури дермальних фібробластів та тривимірної культури клітин MCF-7. Дермальні фібробласти культивували до формування ними моношару конфлюентністю 90%, культуральне середовище

видаляли та двічі промивали моношар фосфатним буфером, після чого висаджували на нього стандартизовані за розміром багатоклітинні сфероїди клітин MCF-7.

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

Клітини культивували/співкультивували до формування ними моношару конфлюентністю 90%, виснажене поживне середовище видаляли і розсікали моношар з виділенням клітинних фронтів та вільної для міграції ростової поверхні між ними. Розсічений моношар двічі обережно промивали фосфатним буфером та покривали свіжим поживним середовищем з додаванням необхідних експериментальних компонентів (КС фібробластів та/або рапаміцину) чи без додавання (контроль). Позиції клітинних фронтів вздовж усієї вільної поверхні між ними послідовно фотофіксували до та після міграції: вихідні позиції – через 1 годину культивування, яку виділяли для відновлення нормальної адгезії прифронтних груп клітин; остаточні позиції – ще через 24 години культивування та міграції. Відстані між клітинними фронтами на мікрофотографіях вимірювали за допомогою програмного забезпечення «ІСУ 2.1.0.1» (Інститут Пастера, Франція) двома способами: безпосередньо вимірюючи та усереднюючи відстані між множиною протилежних точок на клітинних фронтах та/або вимірюючи площу між ними та довжину цієї площі і перераховуючи їх у середню відстань. Дані з кожної фотографії застосовували у обчисленні швидкості міграції клітин за формулами 2.1 та/або 2.2.

$$V = \frac{m_B - m_0}{2 \times t}, \quad (2.1)$$

$$V = \frac{S_B - S_0}{2 \times L \times t}, \quad (2.2)$$

де V – швидкість міграції клітин (мкм/добу), m_B – середня відстань між клітинними фронтами за вихідної позиції, m_0 – середня відстань між клітинними фронтами за остаточної позиції, 2 – кількість клітинних фронтів, t – тривалість міграції (1 доба), S_B – площа між клітинними фронтами за вихідної позиції, S_0 – площа між клітинними фронтами за остаточної позиції, L – довжина поверхні між клітинними фронтами.

Ефективність отримання результатів обома способами порівнювали у методичній частині роботи. Усі результати отримано з вимірюванням площі між клітинними фронтами, її довжини та використанням формули 2.2, як обґрунтовано більш ефективного способу.

2.13. Формування багатоклітинних сфероїдів

Багатоклітинні сфероїди формували шляхом культивування клітин на неадгезивній ростовій поверхні – 1% агарозному гелі. Агарозу повністю розчиняли у воді за допомогою кип'ятіння, після чого розчин стерилізували та теплим наносили тонким шаром на ростову поверхню, видаляючи надлишок. Полімеризацію агарози проводили протягом 20 хв за кімнатної температури та змочували утворений гель поживним середовищем протягом 10 хв. Клітини наносили на поверхню гелю у кількості 12700/см² та культивували протягом 72 год. Вирощені сфероїди обережно збирали та розділяли за розміром, послідовно фільтруючи суспензію зі сфероїдами крізь два фільтри з діаметром пор відповідно 100 та 70 мкм. Затримані на другому фільтрі сфероїди розміром

70-100 мкм ресуспендували у свіжому поживному середовищі та використовували у експериментах.

2.14. Морфометрична характеристика багатоклітинних сфероїдів

Стандартизовані за розміром багатоклітинні сфероїди висаджували на адгезивну ростову поверхню та культивували протягом 1 год для їхнього прикріплення. Позиції 50-и прикріплених сфероїдів фотофіксували і вимірювали на мікрофотографіях коефіцієнт їхньої сферичності за допомогою програмного забезпечення «ІСУ 2.1.0.1» (Інститут Пастера, Франція).

2.15. Вимірювання швидкості міграції клітин на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда

Стандартизовані за розміром багатоклітинні сфероїди висаджували на адгезивну ростову поверхню та культивували/співкультивували протягом 1 год для їхнього прикріплення, після чого культуральне середовище обережно видаляли і замінювали на свіже з додаванням необхідних експериментальних компонентів (КС фібробластів та/або рапаміцину) чи без додавання (контроль). Позиції 50-и 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 за допомогою програмного забезпечення «ІСУ 2.1.0.1» (Інститут Пастера, Франція). Дані з фотографій усереднювали і застосовували у обчисленні швидкості міграції/поширення клітин зі сфероїда за формулою 2.3.

$$V = \frac{S_K - S_C}{t}, \quad (2.3)$$

де V – швидкість міграції/поширення клітин зі сфероїда (мкм²/добу), S_C – середня площа зайнята колонією клітин утвореною зі сфероїда, S_K – середня площа зайнята сфероїдом у вихідному стані, t – тривалість міграції (1 доба).

2.16. Фарбування клітин за Май-Грюнвальдом та Гімзою

Клітини культивували до формування ними моношару конфлюентністю 80%, культуральне середовище видаляли, клітини промивали та фіксували метанолом протягом 5 хв. До, після та між фіксацією і фарбуванням клітини тричі промивали фосфатним буфером за кімнатної температури. Фіксовані клітини покривали розчином фарбників за Май-Грюнвальдом та Гімзою (7% – фарбника Май-Грюнвальда, 21% – фарбника Гімзи на основі фосфатного буферу) на 20 хв. Фарбовані клітини візуалізували та фотодокументували за допомогою мікроскопії.

2.17. Звичайна світлова та конфокальна мікроскопія

Моніторинг стану клітинних культур протягом їхнього культивування та в умовах експериментів здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа «CETI Versus». Позичій клітинних фронтів, сфероїдів та моношарових колоній фотофіксували за допомогою цифрової фото/відеокамери-окуляра для мікроскопії «eTREK DCM 320» та програмного забезпечення «TourView 4.11.18081» (Hangzhou TourTek Photonics Co., Ltd., Китай). Масштаб на мікрофотографіях визначали за розмірами об'єкт-мікрометра відбитого світла «ОМПУ4.2 0,01 мм». Імунофлюоресцентну реакцію у мікропрепаратах клітин

візуалізували за допомогою інвертованого лазерного скануючого конфокального мікроскопа «Zeiss LSM 510 META Confocal Microscope».

2.18. Приготування клітинних лізатів

Клітини культивували до формування ними моношару конфлюентністю 80%, після чого культуральне середовище видаляли, моношар промивали фосфатним буфером та покривали свіжим поживним середовищем з додаванням необхідних експериментальних компонентів (КС фібробластів та/або рапаміцину) чи без додавання (контроль). Після 24 годин культивування за забезпечених умов культуральне середовище видаляли, клітини тричі промивали фосфатним буфером та заморожували на ростовій поверхні за температури -20°C протягом щонайменше 1 год. Заморожені на ростовій поверхні клітини поміщали на лід і наносили на них охолоджений адаптований буфер для лізису клітин «Radioimmunoprecipitation assay buffer» (20 мМ – трису, 150 мМ – натрій хлориду, 1% – детергенту «Triton[™] X-100», 5 мМ – ЕДТА, 50 мМ – натрій фториду, 1 мМ – натрій ортованадату, 5% – гліцеролу, 2,5 мМ – натрій пірофосфату, 1 мМ – β -гліцерофосфату, суміші інгібіторів протеаз «cOmplete[™] Protease Inhibitor Cocktail» та інгібіторів фосфатаз «Pierce[™] Phosphatase Inhibitor Mini Tablets» у концентрації відповідній до рекомендацій виробника на основі воді, рН 7,5) [M2] з розрахунку 6-7 мкл/см². Клітини відкріплювали механічно за допомогою культурального шпателя, збирали у вигляді суспензії з буфером та переносили у мікропробірки. Процес лізису проводили з перемішуванням за температури $+4^{\circ}\text{C}$ протягом 20 хв. Нерозчинну фракцію осаджували і видаляли шляхом центрифугування при 13000 об/хв за 4°C протягом 20 хв. Очищений клітинний лізат відділяли від осаду і зберігали за температури -20°C .

2.19. Вимірювання загальної концентрації білків

Концентрацію білка у клітинних лізатах вимірювали за методом Бредфорда [М3] та з використанням реагенту «Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent». Для фарбування білка 3 мкл клітинного лізату змішували зі 100 мкл реагенту та інкубували розчин за кімнатної температури поза доступом світла протягом 10 хв. Оптичне поглинання розчину за довжини хвилі 595 нм, підвищене пропорційно до концентрації в ньому білка, вимірювали за допомогою універсального автоматичного фотометра «BioTek ELx800». Розрахунок концентрації білка у лізаті виконували порівнюючи отримане значення зі значеннями кривої концентрації-поглинання розчину БСА відомої концентрації з використанням формули 2.4.

$$C_L = \frac{E_L \times C_A}{E_A}, \quad (2.4)$$

де C_L – загальна концентрація білка у лізаті, E_L – оптичне поглинання розчину лізату, C_A – загальна концентрація білка у розчині БСА, E_A – оптичне поглинання розчину БСА.

2.20. Електрофоретичне розділення білків

Розділення білків у клітинному лізаті здійснювали за допомогою ступінчастого денатуруючого електрофорезу у поліакриламідному гелі за методом Лемлі [М4] модифікованим Орнстейном та Девісом [М5]. Розділення проводили у системі для вертикального електрофорезу «omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System CVS10DSYS». Компонували двошаровий поліакриламідний гель, що складався з верхнього шару – 5%-го концентрувального гелю (5% – суміші акриlamіду/біс-акриlamіду (29:1),

125 мМ – трису, 0,1% – натрій додецилсульфату, 0,1% – амоній персульфату, 0,1% – тетраметилетилендіаміну на основі води, рН 6,8) та нижнього шару – 8, 10 або 12%-ого розподільчого гелю (8-12% – суміші акриламід/біс-акриламід (29:1), 375 мМ – трису, 0,1% – натрій додецилсульфату, 0,1% – амоній персульфату, 0,06% – тетраметилетилендіаміну на основі води, рН 8,8). Оптимальну концентрацію акриламід у розподільчому гелі обирали відповідно до молекулярної маси досліджуваних білків. Формування двошарового гелю проводили послідовно: у електрофоретичну касету вносили розчин концентрувального гелю об'ємом 5 мл, через 3-5 хв його покривали захисним шар води, після полімеризації гелю воду видаляли і нашаровували розчин розподільчого гелю об'ємом 2 мл з відмежуванням лунок для зразків. Полімеризацію акриламід проводили за кімнатної температури протягом 20 хв. Перед нашаруванням у лунку клітинний лізат змішували з буфером Лемлі для нанесення зразків (0,2 М – трису, 5% – натрій додецилсульфату, 50% – гліцеролу, 0,1% – бромфенолового синього, 0,25 М – дитіотреїтолу на основі води, рН 6,8) та інкубували суміш за температури 95°C протягом 5 хв. Клітинний лізат наносили у об'ємі, що відповідав загальному вмісту білка в ньому – 10 мкг. Електрофорез проводили у трис-гліциновому електродному буфері (25 мМ – трису, 195 мМ – гліцину, 0,1% – натрій додецилсульфату на основі води, рН 8,3) за температури 4°C та за фіксованої напруги: 100 В – у концентрувальному гелі та 150 В – у розподільчому гелі. Суміжно проводили розділення суміші білків-маркерів молекулярних мас «PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder». Електрофоретичне розділення білків вважали завершеним після рівномірного досягнення фронтом з барвником нижнього краю розподільчого гелю.

2.21. Фарбування білкових гелів

Контроль білкового навантаження клітинних лізатів нанесених у гель додатково супроводжували фарбуванням гелю після електрофоретичного

розділення білків. Гель фарбували кип'ятінням у розчині кумасі діамантового блакитного R-250 (0,25% – фарбника «Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye», 25% – етанолу, 25% – оцтової кислоти на основі води). Відмивали гель розчином оцтової кислоти (10% – оцтової кислоти, 10% – етанолу на основі води). Зразок фарбованого білкового гелю продемонстровано на рис. 2.2.

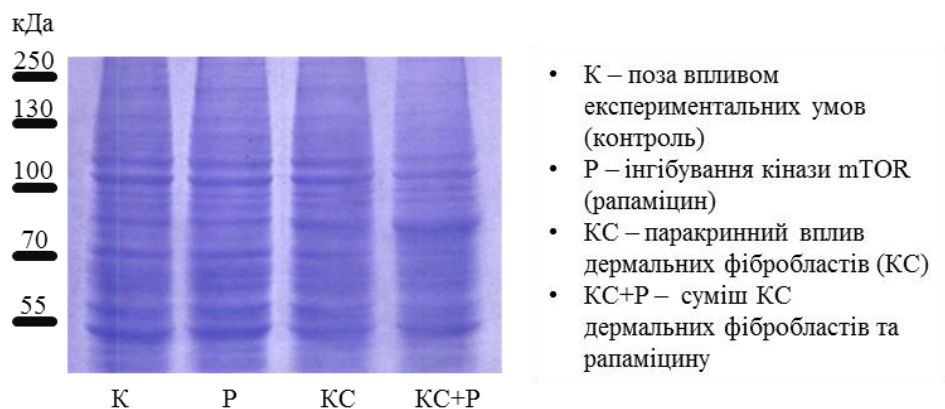


Рис. 2.2. Зразок білкового гелю фарбованого кумасі діамантовим блакитним R-250 (розділення білків у лізатах клітин лінії HeLa, що перебували під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 нМ рапаміцину) та синхронної дії цих факторів (суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином)

2.22. Імуноблот-детектування вибраних білків

Електрофоретичне перенесення білків з поліакриламідного гелю на полівініліденфторидну мембрану «Immobilon-P PVDF Membrane» здійснювали за допомогою камери системи для вертикального електрофорезу «omniPAGE Mini Vertical Protein Electrophoresis System CVS10DSYS» та модуля для «мокрого» електроперенесення «omniBLOT Mini Insert». Камеру заповнювали буфером Тоубіна (25 мМ – трису, 192 мМ – гліцину, 20% – метанолу на основі

води, рН 8,6) [М6] модифікованим додаванням 0,03%-го вмісту натрій додецилсульфату. Для можливості змочування полівініліденфторидної мембрани у буфері її заздалегідь послідовно занурювали у метанол та воду. Перед внесенням у камеру мембрану, гель та фільтрувальний папір змочували у буфері протягом 5 хв. Приклавши гель до мембрани, їх з обох боків огортали 4-ма шарами фільтрувального паперу, видаляли між ними повітря, фіксували у електрофоретичній касеті та поміщали у камеру заповнену буфером. Електроперенесення проводили протягом 12 годин за температури 4°C та за фіксованої напруги – 25 В. Для електроперенесення важкомолекулярних та глікозилізованих форм білків використовували струм напругою 30 В та буфер Тоубіна з підвищеним до 0,06% вмістом натрію додецилсульфату та зниженим до 10% вмістом метанолу.

Блокування, інкубацію з антитілами та промивання мембрани з адсорбованими білками проводили у фосфатному буфері з 0,1%-м вмістом детергенту «TWEEN® 20». Після електроперенесення, мембрану промивали протягом 5 хв. Сайти неспецифічного зв'язування на мембрані блокували протягом 30 хв за кімнатної температури: при дослідженні нефосфорильованих форм білків – 5%-м розчином знежиреного сухого молока; при дослідженні фосфорильованих форм – 5%-м розчином БСА. Після блокування мембрану тричі промивали протягом 5 хв. Інкубацію мембрани з розчином антитіл до вибраних білків (первинних антитіл) проводили протягом 12 год за температури 4°C та тричі промивали протягом 5 хв. Інкубацію мембрани з видоспецифічними антитілами кон'югованими з пероксидазою хрому (вторинними антитілами) здійснювали протягом 1 год за кімнатної температури та тричі промивали протягом 5 хв. За потреби підвищення чутливості методу у якості вторинних антитіл використовували полімерну детектувальну систему «Lab Vision™ UltraVision™ LP Detection System: HRP Polymer». Детальний перелік застосованих первинних та вторинних антитіл подано у таблиці 2.1.

Комплекси специфічного зв'язування «антиген-антитіло-антитіло-мітка» на мембрані детектували за допомогою проведення реакції посиленої

хемілюмінесценції. Мембрану покривали реагентом «Pierce™ ECL Western Blotting Substrate» та інкубували протягом 1 хв. Хемілюмінесцентний сигнал візуалізували за допомогою системи «ChemiDoc™ XRS+ System» або експозицією на рентгенівській плівці та документували у вигляді блотограм.

Спряжено з імунодетекцією вибраного білка у кожному клітинному лізаті та на кожній мембрані виконували імунодетекцію білка-маркера білкового навантаження. Не всі пропоновані у літературі традиційні білки-маркери виявилися придатними до застосування у даній роботі, адже було виявлено залежність експресії деяких із них від функціонування об'єкта дослідження. Оптимальний білок-маркер шукали серед традиційних експериментальним шляхом і його вибір став одним з супутніх результатів роботи у вигляді методичної рекомендації. У якості маркера білкового навантаження використовували рівень експресії β -тубуліну і уникали використання рівня експресії β -актину та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH).

2.23. Визначення відносного вмісту вибраного білка у клітинному лізаті

Характеристику відносного вмісту вибраного білка у клітинному лізаті виконували шляхом вимірювання та порівняльного аналізу інтенсивностей відповідних хемілюмінесцентних сигналів зафіксованих на блотограмах. Інтенсивності сигналів вимірювали за допомогою програмного забезпечення «ImageLab 6.0.1» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) та розцінювали як величини пропорційні до абсолютного вмісту відповідних білків у клітинних лізатах.

Вміст вибраного білка у кожному клітинному лізаті характеризували як відносний щодо вмісту цього білка у лізаті клітин контрольної групи – клітин, що перебували поза впливом будь яких експериментальних факторів, а також з урахуванням вмісту в обох лізатах маркера білкового навантаження. Відповідно відносний вміст у лізаті клітин контрольної групи умовно розглядали як 100%.

Розрахунок відносного вмісту вибраного білка у клітинному лізаті (B_B) виконували за формулою (2.5):

$$B_B = \frac{(B/M)}{(B_K/M_K)} \times 100\%, \quad (2.5)$$

де B – інтенсивність сигналу, що відповідає вмісту вибраного білка у клітинному лізаті; M – інтенсивність сигналу, що відповідає вмісту маркера білкового навантаження у клітинному лізаті; B_K – інтенсивність сигналу, що відповідає вмісту вибраного білка у лізаті клітин контрольної групи; M_K – інтенсивність сигналу, що відповідає вмісту маркера білкового навантаження у лізаті клітин контрольної групи.

2.24. Імунофлюоресцентна реакція

Клітини висаджували на покривне цитологічне скло у кількості $15000/\text{cm}^2$ та культивували протягом 48 год або у вигляді стандартизованих за розміром багатоклітинних сфероїдів та проводили їхню реверсію протягом 24 год культивування. Культуральне середовище видаляли, клітини промивали та фіксували 10%-м розчином формаліну протягом 15 хв. Після видалення культурального середовища та поміж всіх наступних етапів підготовки мікропрепаратів клітини тричі промивали фосфатним буфером. Промивання, фіксацію, пермеабілізацію та пригнічення аутофлюоресценції у клітинах виконували за кімнатної температури. Мембрани фіксованих клітин пермеабілізували 0,2%-м розчином детергента «Triton™ X-100» у фосфатному буфері протягом 10 хв. Пермеабілізовані клітини покривали буфером для пригнічення аутофлюоресценції (10 мМ – купрум (II) сульфату та 50 мМ – амоній ацетату на основі води, рН 5,0) [M7] на 30 хв, при цьому до та після

нанесення буферу клітини тричі додатково промивали водою. Сайти неспецифічного зв'язування у клітинах з пригніченою аутофлюоресценцією блокували 1%-м розчином БСА у фосфатному буфері протягом 1 год у вологій камері за температури 37°C. Інкубацію підготовлених клітин з антитілами до вибраних білків (первинними антитілами) у 1%-му розчині БСА у фосфатному буфері проводили протягом 12 год за температури 4°C. Інкубацію з видоспецифічними (вторинними антитілами) зв'язаними з флюоресцентною міткою (флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом) антитілами у 1% розчині БСА у фосфатному буфері здійснювали протягом 1 год у вологій камері за температури 37°C. Детальний перелік застосованих первинних та вторинних антитіл подано у таблиці 2.2. Після інкубацій з антитілами клітини покривали фосфатним буфером з 0,1%-м вмістом детергенту «TWEEN® 20» на 10 хв та промивали. Мікропрепарат клітин герметизували між покривним та предметним склом у середовищі «Mowiol® 4-88» з 2,5%-м вмістом фотопротектора 1,4-діазобіцикло[2,2,2]октану. Паралельно у клітинах фарбували клітинні ядра, для чого у середовище також вносили 0,5 мг/мл ядерного флюоресцентного барвника 4',6-діамідино-2-феніліндол дигідрохлориду. Флюоресцентний сигнал від комплексів специфічного зв'язування «антиген-антитіло-антитіло-мітка» та барвника у мікропрепаратах візуалізували та документували за допомогою конфокальної мікроскопії.

2.25. Статистичний аналіз експериментальних даних

Кожен експеримент повторювали не менш, ніж тричі. Результати експериментів подано 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 $p < 0,005$. Статистичний аналіз та графічну

візуалізацію його результатів виконували за допомогою програмного забезпечення «Microsoft Office 2016» (Microsoft Corporation, США), «OriginPro 2019b» (OriginLab Corporation, США) та «GraphPad Prism 8.0.0» (GraphPad Software, Inc, США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження участі mTOR/S6K1-сигнальної ланки у сприйнятті паракринної сигналізації дермальних фібробластів

Залучення mTOR/S6K1-сигнальної ланки до сприйняття пухлинними клітинами паракринної сигналізації дермальних фібробластів було виявлено за змінами функціональної активності її компонентів у відповідь на перебування клітин у КС дермальних фібробластів. Зміни активності компонентів ланки було охарактеризовано за змінами вмісту в клітинах їхніх активованих фосфорильованих форм та фосфорильованих ними форм їхніх безпосередніх субстратів. Окрім характеристики реакції ланки у клітинах MCF-7, реакцію ланки на паракринну сигналізацію фібробластів було додатково охарактеризовано у клітинах HeLa, що дало підтвердження виявленому залученню і дозволило порівняння ефектів викликаних у клітинах подібних за епітеліальним фенотипом та особливостями функціонування ланки. Також було описано ефективність протидії між паракринною сигналізацією фібробластів і рапаміцином у впливі на активність mTOR/S6K1-сигнальної ланки.

3.1.1. Первинна культура дермальних фібробластів людини

Для можливості моделювання в експериментальних умовах нормального (не-пухлино-асоційованого) пухлинного мікрооточення було виділено первинну культуру дермальних фібробластів людини. Клітин з негативною імунофлюоресцентною реакцією на поверхневий антиген фібробластів у виділеній культурі виявлено не було (рис. 3.1: а). Морфологія клітин та тип росту виділеної культури відповідали характерним для фібробластів

(рис. 3.1: б). Моделювання впливу нормального пухлинного мікрооточення на пухлинні клітини було виконано в серіях експериментів у вигляді їхнього прямого співкультивування або перебуванням клітин у КС, продукованому фібробластами.

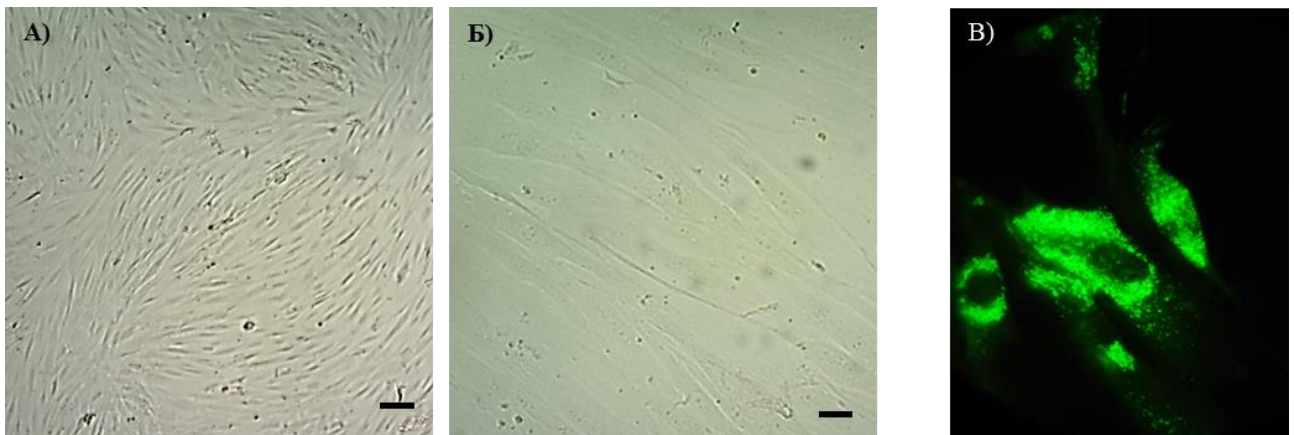


Рис. 3.1. Первинна культура дермальних фібробластів людини отримана з післяопераційного матеріалу: А) та Б) – мікрофотографії за різного збільшення (масштаб – 100 мкм), В) мікрофотографії клітин з імунофлюоресцентною реакцією на поверхневий антиген фібробластів (Об. 100×, Ок. 10×).

3.1.2. Активація ланки у відповідь на паракринну сигналізацію дермальних фібробластів у клітинах лінії MCF-7

Залучення mTOR/S6K1-сигнальної ланки до сприйняття паракринної сигналізації дермальних фібробластів клітинами MCF-7 було ідентифіковано за змінами активності кінази mTOR (регулятора та субстрата S6K1), ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та зростанням рівня фосфорилування білка S6 (субстрата S6K1) викликаних перебуванням клітин у КС дермальних фібробластів.

Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості активованих форм цих білків (рис. 3.2) було виявлено їхню здатність реагувати

у вигляді активації на вплив КС дермальних фібробластів у клітинах MCF-7. ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448) у клітинах MCF-7, що перебували під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів виявлено підвищеним до $159,6 \pm 19,7\%$, ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) – до $194,4 \pm 22\%$, ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) – до $203,1 \pm 22,2\%$, ВВБ фосфо-p60S6K1 (Тре-359) – до $155,5 \pm 18,6\%$, ВВБ фосфо-S6 (Сер-240/244) – до $188,4 \pm 22,8$.

Також показано здатність рапаміцину ефективно нейтралізувати сприйняття виявленого стимулюючого паракринного ефекту фібробластів. ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448), ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) та ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) у клітинах MCF-7, що перебували під впливом суміші 20%-го КС дермальних фібробластів з 10 нМ рапаміцином виявлено на рівні характерному клітинам MCF-7 дикого типу поза впливом на них експериментальних факторів, ВВБ фосфо-p60S6K1 (Тре-359) – підвищеним лише до $118,6 \pm 9,1\%$, ВВБ фосфо-S6 (Сер-240/244) – лише до $120,6 \pm 8,9\%$.

При цьому дія рапаміцину не досягає своєї максимальної ефективності, яку демонструє при окремій дії на клітини. ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448) у клітинах MCF-7, що перебували під окремою дією 10 нМ рапаміцину показано зниженим до $82,4 \pm 10,3\%$, ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) – до $84,7 \pm 5,6\%$, ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) – до $79 \pm 7,2\%$, ВВБ фосфо-p60S6K1 (Тре-359) – до $86,3 \pm 5,7\%$ та ВВБ фосфо-S6 (Сер-240/244) – до $76,7 \pm 10,9\%$.

Супутнє вимірювання рівнів експресії кінази mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та білка S6 на рівні білка не виявило змін викликаних паракринним впливом фібробластів та/або рапаміцином. Виміряний ВВБ кожного з білків у клітинах MCF-7 під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів, 10 нМ рапаміцину або їхньої суміші (рис. 3.3) виявлено на тотожному до ВВБ у клітинах MCF-7 поза впливом на них експериментальних факторів рівні.

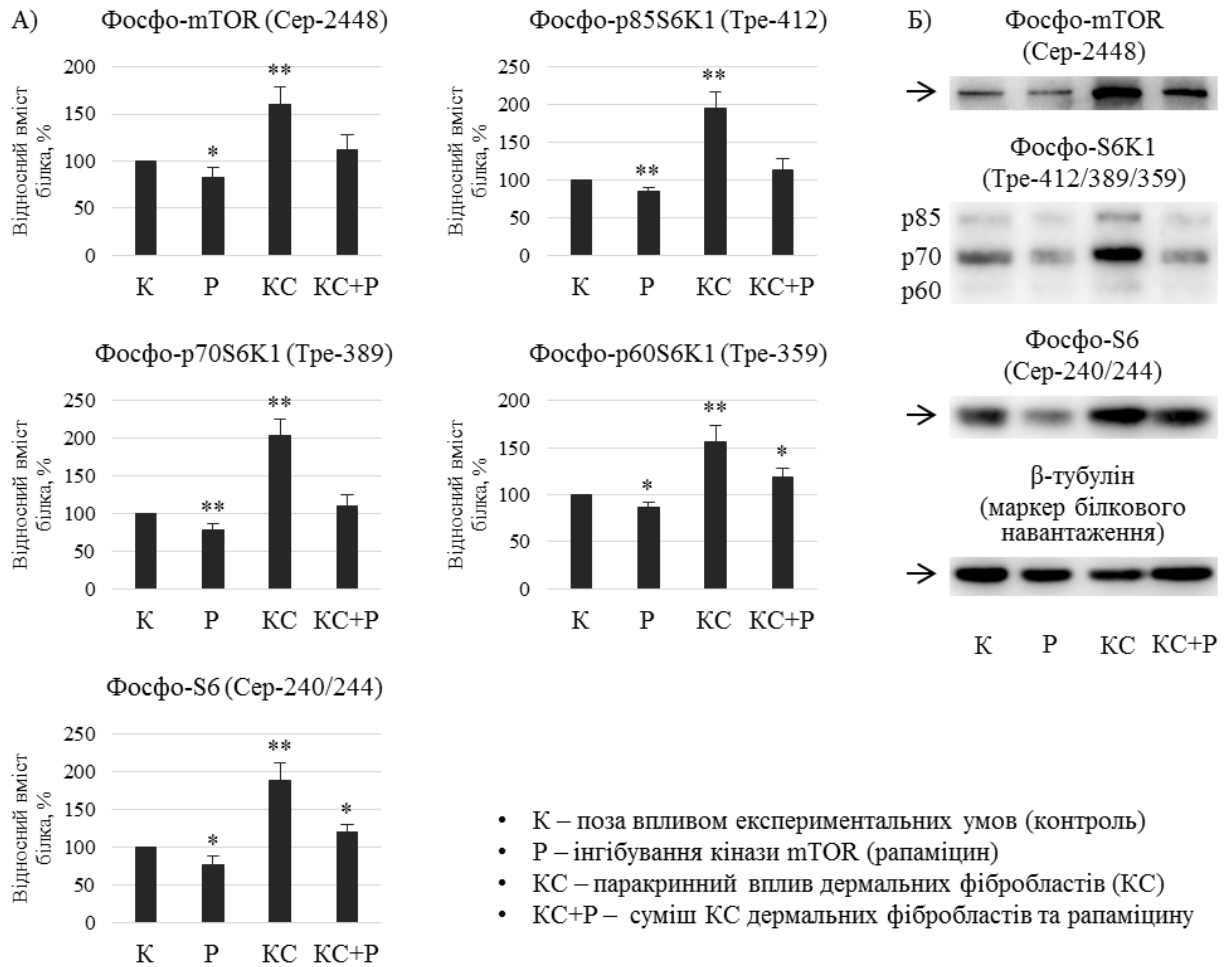


Рис. 3.2. Активність елементів mTOR/S6K1-сигнальної ланки – кінази mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та рибосомального білка S6 – у клітинах лінії MCF-7 під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 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 (контроль): «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$

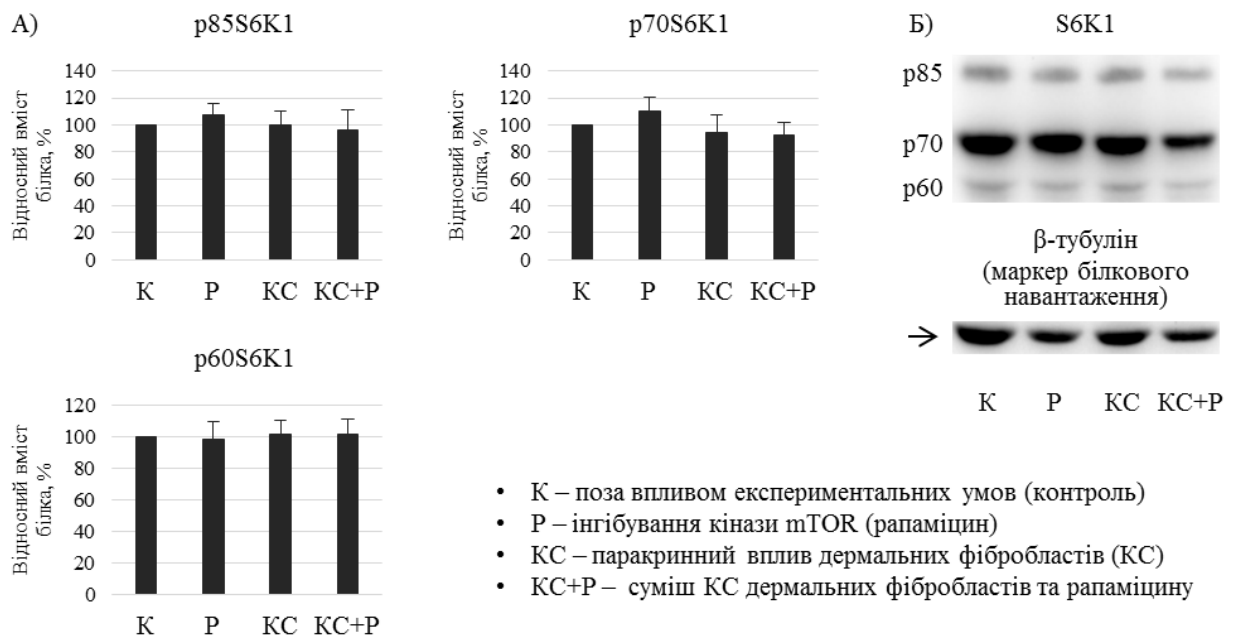


Рис. 3.3. Рівні експресії елементів mTOR/S6K1 сигнальної ланки – кінази mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та рибосомального білка S6 – у клітинах лінії MCF-7 під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 нМ рапаміцину) та синхронної дії цих факторів (суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином) за результатами імуноблот аналізу: А – відносний вміст білків у клітинних лізатах, Б – репрезентативні блотограми

3.1.3. Активація ланки у відповідь на паракринну сигналізацію дермальних фібробластів у клітинах лінії HeLa

Залучення mTOR/S6K1-сигнальної ланки до сприйняття паракринної сигналізації дермальних фібробластів клітинами HeLa було ідентифіковано за змінами активності кінази mTOR (регулятора та субстрата S6K1), ізоформ p85S6K1 та p70S6K1 кінази S6K1 викликаних перебуванням клітин у КС дермальних фібробластів.

Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості активованих форм цих білків у клітинах HeLa (рис. 3.4) було підтверджено здатність mTOR/S6K1-сигнальної ланки реагувати та продемонстровано загалом аналогічний характер її відповіді на вплив КС дермальних фібробластів до того, який було описано у клітинах MCF-7. ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448) у клітинах HeLa, що перебували під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів виявлено підвищеним до $114,9 \pm 10,1\%$, ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) – до $183,2 \pm 18,7\%$, ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) – до $201,3 \pm 16\%$.

Здатність рапаміцину до нейтралізації сприйняття mTOR/S6K1-сигнальної ланки паракринного ефекту фібробластів та його ефективність також підтверджено продемонстрованою поведінкою клітин HeLa.

ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448) та ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) у клітинах HeLa, що перебували під впливом суміші 20%-го КС дермальних фібробластів з 10 нМ рапаміцином було детектовано на рівні характерному клітинам MCF-7 дикого типу поза впливом на них експериментальних факторів, ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) – підвищеним лише до $171,9 \pm 11,6\%$. ВВБ фосфо-mTOR (Сер-2448) у клітинах MCF-7, що перебували під окремою дією 10 нМ рапаміцину виявлено зниженим до $77,6 \pm 4,8\%$, ВВБ фосфо-p85S6K1 (Тре412) – до $74,8 \pm 14,2\%$, ВВБ фосфо-p70S6K1 (Тре-389) – до $68,2 \pm 13,4\%$.

Вимірювання рівнів експресії кінази mTOR, ізоформ p85S6K1 та p70S6K1 кінази S6K1 на рівні білка не виявило змін викликаних паракринним впливом фібробластів та/або рапаміцином. Виміряний ВВБ кожного з білків у клітинах HeLa під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів, 10 нМ рапаміцину або їхньої суміші (рис. 3.5) виявлено на тотожному до ВВБ у клітинах HeLa поза впливом на них експериментальних факторів рівні.

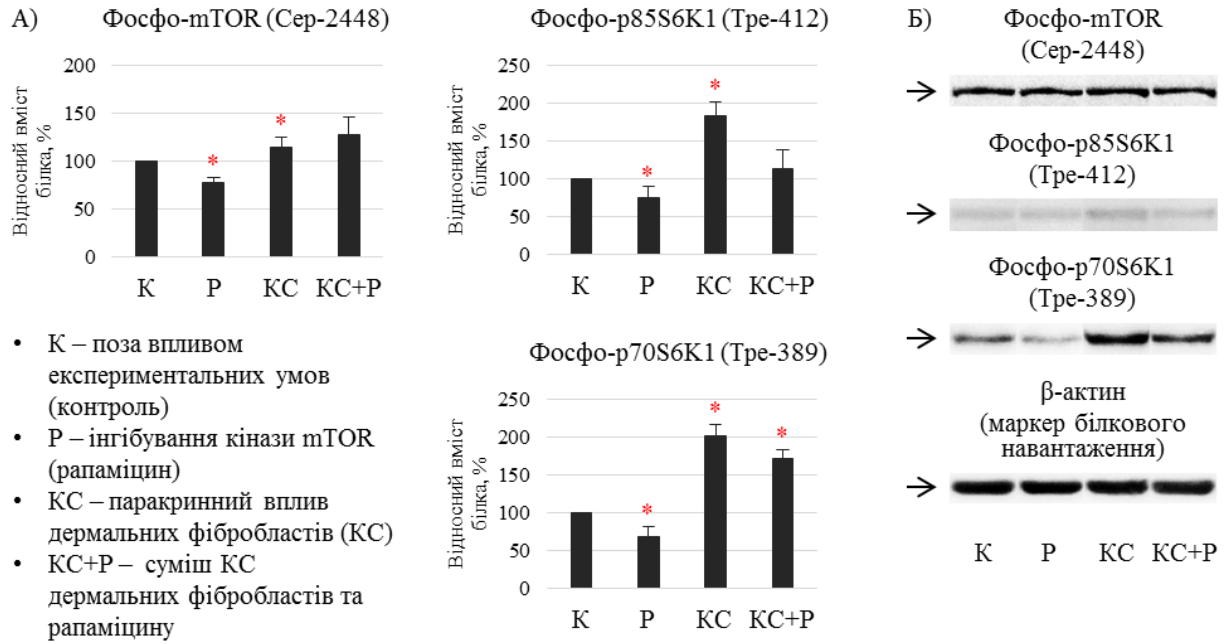


Рис. 3.4. Активність елементів mTOR/S6K1 сигнальної ланки – кінази mTOR, ізоформ p85S6K1 та p70S6K1 кінази S6K1 – у клітинах лінії HeLa під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 нМ рапаміцину) та синхронної дії цих факторів (суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином) за результатами імуноблот аналізу: А – відносний вміст білків у клітинних лізатах, Б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах HeLa поза впливом експериментальних умов (контроль): «*» – $p < 0,05$ та

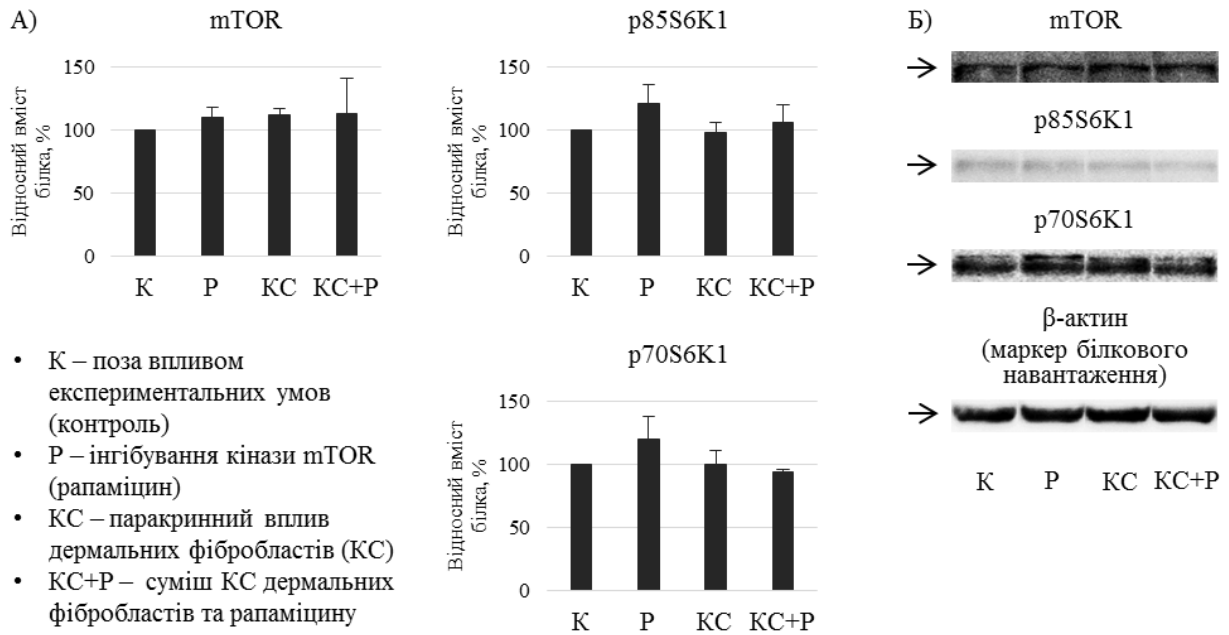


Рис. 3.5. Рівні експресії елементів mTOR/S6K1 сигнальної ланки – кінази mTOR, ізоформ p85S6K1 та p70S6K1 кінази S6K1 – у клітинах лінії HeLa під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (під дією 20% КС), за умови блокування mTOR-сигналізації (під дією 10 нМ рапаміцину) та синхронної дії цих факторів (суміші 20% КС з 10 нМ рапаміцином) за результатами імуноблот аналізу: А – відносний вміст білків у клітинних лізатах, Б – репрезентативні блотограми

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A15>.
2. **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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A2E>.
3. **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.
 4. **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.
 5. **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.
 6. **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.).
 7. **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.

3.2. Застосування та характеристика модельних клітинних ліній MCF-7 з селективним обмеженням експресії ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1

Подальше розмежування функцій ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у дослідженні регуляції міграційної активності клітин було проведено шляхом селективного блокування їхньої експресії (а отже і функціонування) та порівняльного аналізу фенотипових наслідків такого блокування. З цією метою було використано генетично-модифіковані клітини лінії MCF-7, в яких за допомогою технології редагування геному CRISPR/Cas9 є почергово заблокованою експресія транскрипту кінази S6K1, що розпочинається з кожного з трьох відомих альтернативних сайтів ініціації трансляції (рис. 3.6): MCF-7 p85-/p70+/p60+ – з нокдауном ізоформи p85S6K1; MCF-7 p85-/p70-/p60+ – з нокдаунами ізоформ p85S6K1 та p70S6K1; та MCF-7 p85-/p70-/p60- – з нокдаунами ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 [Косач/Заєць]. Ефективність генетичних модифікацій цих клітин та відповідно впливу на функціонування ізоформ S6K1 було підтверджено вимірюваннями в них рівнів експресії та активності ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 в межах PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху.

3.2.1. Характеристика рівнів експресії ізоформ кінази S6K1 у модельних клітинних лініях

Рівень експресії ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у модельних клітинних лініях було охарактеризовано на білковому рівні з

використанням антитіл до С-кінцевої послідовності молекули S6K1, що присутня у структурі усіх трьох ізоформ. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості цих білків було підтверджено практично повне блокування експресії таргетних для CRISPR/Cas9-модифікацій ізоформ S6K1 у клітинах відповідних ліній, а також виявлено супутнє з ними зниження експресії ізоформ, що не були безпосередніми мішенями генетичних модифікацій (рис. 3.7).

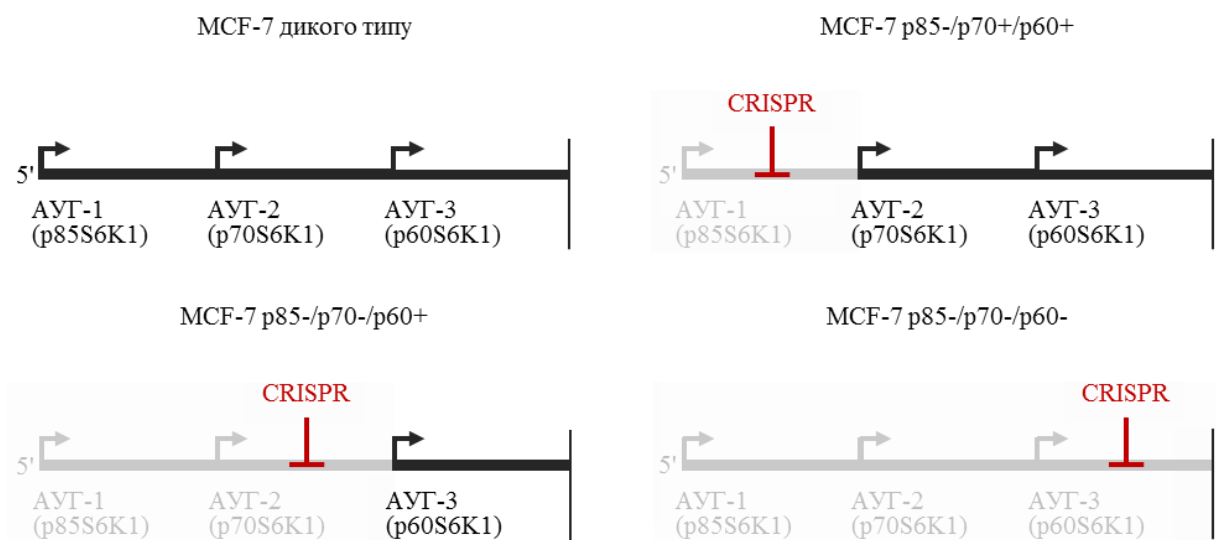


Рис. 3.6. Схематичне зображення 5'-кінців домінантних транскриптів S6K1 у клітинах лінії MCF-7 з селективно обмеженою експресією окремих ізоформ кінрази S6K1 за допомогою технології редагування геному CRISPR/Cas9 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-). Умовно позначено закодовані альтернативні сайти ініціації транляції (АУГ1-3) і ділянки РНК редаговані за допомогою технології CRISPR/Cas9 з метою обмеження експресії p85S6K1 ізоформи; p85S6K1 та p70S6K1 ізоформ; або усіх трьох p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 ізоформ S6K1

Загалом ефективність блокування експресії ізоформ S6K1 за допомогою технології CRISPR/Cas9 у застосованих модельних клітинних лініях було описано наступними змінами ВВБ: у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ ВВБ p85S6K1 – знижений до $4,9 \pm 2\%$, ВВБ p70S6K1 – до $50,8 \pm 12,3\%$, ВВБ p60S6K1 – до $76,4 \pm 13,3\%$; у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ ВВБ p85S6K1 – знижений до $2,5 \pm 0,8\%$, ВВБ p70S6K1 – до $13,8 \pm 6,2\%$, ВВБ p60S6K1 – до $41,9 \pm 9,1\%$; у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- ВВБ p85S6K1 – знижений до $6,2 \pm 0,5\%$, ВВБ p70S6K1 – до $16,7 \pm 5,3\%$, ВВБ p60S6K1 – до $7,1 \pm 2,2\%$.

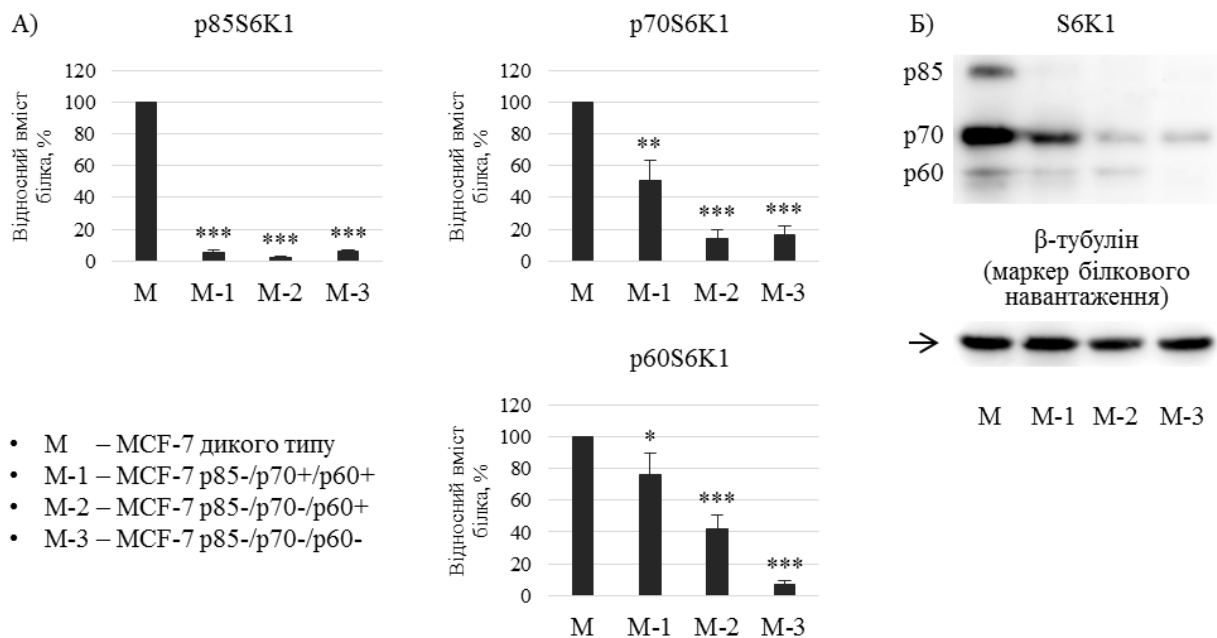


Рис. 3.7. Рівні експресії p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 ізоформ кінази S6K1 у клітинах лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу: А – відносний вміст білків у клітинних лізатах, Б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$ та «***» – $p < 0,001$

3.2.2. Характеристика функціональної активності ізоформ кінази S6K1 та асоційованих елементів PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху у модельних клітинних лініях

Функціональну активність ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 у модельних клітинних лініях було охарактеризовано на трьох рівнях та відповідно за трьома показниками: за рівнями фосфорилування безпосередніх субстратів кінази S6K1 – рибосомального білка S6 та кінази eEF2K; за активністю безпосереднього регулятора S6K1 – білкового комплексу mTORC1; та за активністю кінази АКТ, як одного з центральних елементів PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху, з яким, як і з mTORC1, S6K1 пов'язана зворотним регуляторним зв'язком.

Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості фосфорильованих форм субстратів S6K1, білка S6 за Сер-240/244 та кінази eEF2K за Сер-366, у клітинах MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.8) було підтверджено модифікацію цих клітин і продемонстровано залежність активності S6 та eEF2K від функціонування усіх трьох ізоформ. Згідно характеру виявлених залежностей було підтверджено наявність очікуваних позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p85S6K1 і p70S6K1 та фосфорилуванням S6, негативних – між p85S6K1 і p70S6K1 та eEF2K, а також встановлено наявність відмінного негативного регуляторного зв'язку між p60S6K1 та S6 і позитивного між p60S6K1 та eEF2K.

Нокдаун p85S6K1 викликав зниження рівнів фосфорилування S6 та eEF2K. ВВБ фосфо-S6 (Сер-240/244) у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ було виявлено зниженим до $78,1 \pm 6,9\%$, ВВБ фосфо-eEF2K (Сер-366) – до $67,7 \pm 7,5\%$. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, зумовив додаткове різке зниження рівнів фосфорилування S6 та eEF2K. ВВБ фосфо-S6 (Сер-240/244) у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ детектовано зниженим до $18,9 \pm 4,1\%$, ВВБ фосфо-eEF2K (Сер-366) – до $28,8 \pm 10,7\%$. Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, навпаки, призвів до різкого зростання і часткового відновлення нормальних рівнів фосфорилування S6 та eEF2K. ВВБ

фосфо-S6 (Сер-240/244) у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- спостерігається зниженням лише до $56,8 \pm 10,1\%$, ВВБ фосфо-eEF2K (Сер-366) – до $52 \pm 5,8\%$.

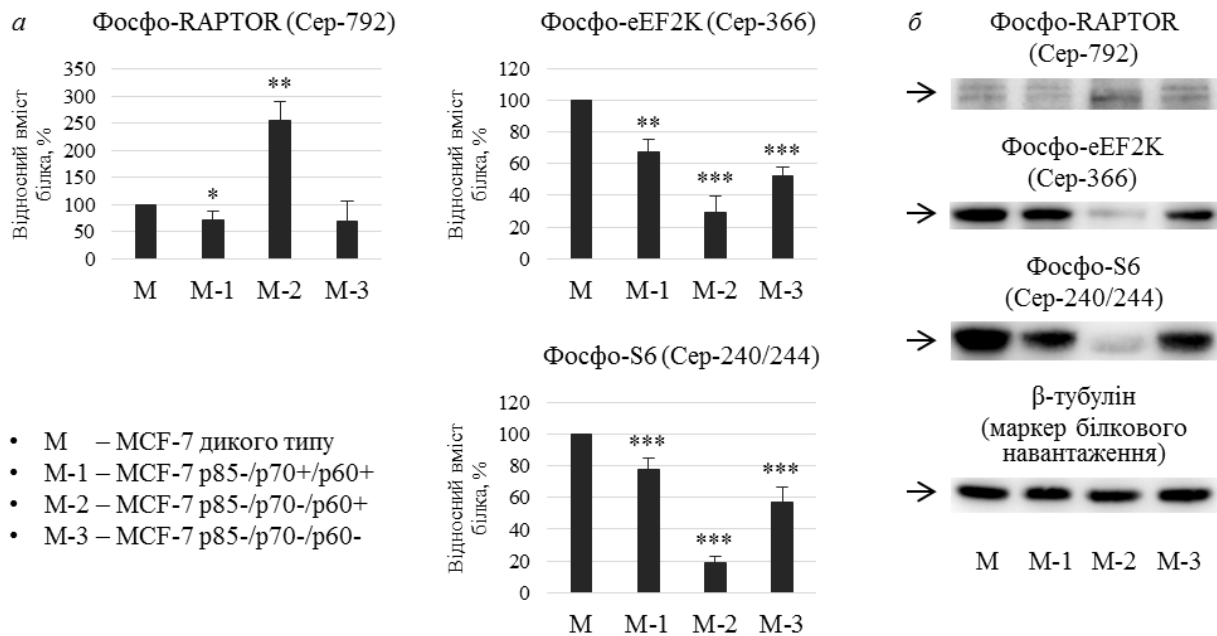


Рис. 3.8. Активність ланок mTOR-сигнальної мережі – білка RAPTOR (субстрат-презентувального компонента комплексу mTORC1), кінази eEF2K та рибосомального білка S6 (субстратів кінази S6K1) у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) 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: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$, «***» – $p < 0,001$

Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості фосфорильованої форми субстрат-репрезентувального білка комплексу mTORC1, білка RAPTOR за Сер-792, у клітинах MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.8) також було підтверджено модифікацію

модельних клітин та ідентифіковано залежність активності mTORC1 від функціонування усіх трьох ізоформ. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p85S6K1 та активністю mTORC1, позитивного – між p70S6K1 та mTORC1, а також негативного – між p60S6K1 та mTORC1.

Нокдаун p85S6K1 спричинив зростання активності mTORC1, нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, зумовив різке її зниження, а нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, став причиною підвищення активності mTORC1 до рівня співставного з викликаним нокдауном p85S6K1. ВВБ фосфо-RAPTOR (Сер-792) у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ спостерігався зниженим до $72,1 \pm 15,1\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ – підвищеним до $255,3 \pm 35,5\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ – зниженим до $68,5 \pm 37,1\%$.

Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості фосфорильованих форм одного з центральних елементів РІЗК/АКТ/mTOR-сигнального шляху, кінази АКТ за Сер-473, безпосереднього субстрату АКТ, кінази GSK-3 β за Сер-9 та з характеристикою патернів фосфорилування субстратів АКТ (білків, що містять послідовність сайту фосфорилування кіназою АКТ – Арг-Х-Х-Сер^Ф/Тре^Ф) у клітинах MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.9) було ще раз підтверджено модифікацію модельних клітин і виявлено складну залежність активності АКТ та загалом РІЗК/АКТ/mTOR-сигнального шляху від функціонування усіх трьох ізоформ. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність позитивного регуляторного зв'язку між функціонуванням p85S6K1 та активністю GSK-3 β , негативного – між p70S6K1 та АКТ і GSK-3 β , негативного – між p60S6K1 та АКТ, а також позитивного між p60S6K1 та GSK-3 β .

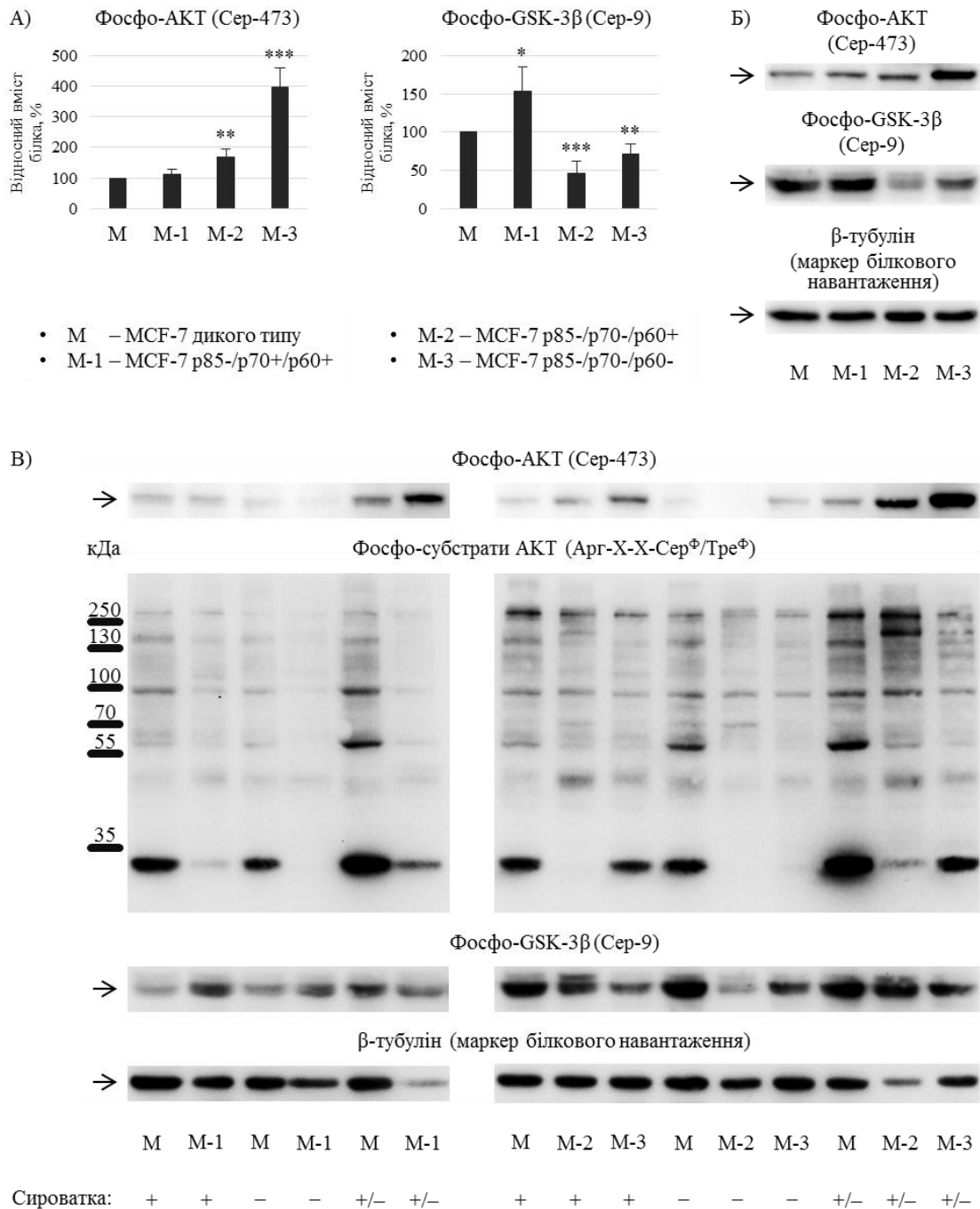


Рис. 3.9. Активність АКТ-сигналізації – кінрази АКТ, її субстратів та зокрема кінрази GSK-3 β – у клітинах лінії MCF-7 з селективно обмеженою експресією окремих ізоформ кінрази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу: А – відносний вміст білків у клітинних лізатах; Б, В – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$ та «***» – $p < 0,001$.

Нокдаун р85S6K1 не вплинув на активність АКТ, але при цьому став причиною зниження активності GSK-3 β . ВВБ фосфо-АКТ (Сер-473) у клітинах MCF-7 р85-/р70+/р60+ залишився незмінним, тоді як ВВБ фосфо-GSK-3 β (Сер-9) виявлено підвищеним до $154 \pm 31,9\%$. Нокдаун р70S6K1, додатковий до р85S6K1, зумовив виразне посилення активності АКТ та невідповідне йому зростання активності GSK-3 β . ВВБ фосфо-АКТ (Сер-473) у клітинах MCF-7 р85-/р70-/р60+ було детектовано підвищеним до $169,6 \pm 26,2\%$, ВВБ фосфо-GSK-3 β (Сер-9) – зниженим до $46,2 \pm 15,4\%$. Нокдаун р60S6K1, додатковий до р85S6K1 та р70S6K1, став причиною потужного додаткового зростання активності АКТ та відповідного йому зниження активності GSK-3 β з частковим відновленням до нормального рівня. ВВБ фосфо-АКТ (Сер-473) у клітинах MCF-7 р85-/р70-/р60+ було виявлено підвищеним аж до $399,1 \pm 61,1\%$, ВВБ фосфо-GSK-3 β (Сер-9) – зниженим до $70,8 \pm 13,4\%$.

Загальна характеристика патернів фосфорилування субстратів кінази АКТ за допомогою імуноблот аналізу у клітинах MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 за різних умов стимуляції клітин ростовими факторами, присутніми у ЕБС, (рис. 3.X) яскраво підкреслила складність та масштабність залежності функціонування PI3K/АКТ/mTOR-сигнального шляху від функціональної активності ізоформ р85S6K1, р70S6K1 та р60S6K1 кінази S6K1, а отже і регуляції процесів контрольованих цією сигнальною системою.

Найбільш виразні відмінності у паттернах фосфорилування субстратів АКТ асоційовані з функціонуванням ізоформ кінази S6K1 спостерігаються на рівнях близьких до 250+, 150, 90, 60, 50, 35- кДа.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A25>.

2. **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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A2E>.

3.3. Дослідження участі ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінрази S6K1 у регуляції міграційної активності пухлинних клітин під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів

Здатність ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінрази S6K1 трансформувати прийнятий паракринний сигнал, генерований дермальними фібробластами, у регуляції рухливості пухлинних клітин було ідентифіковано та охарактеризовано за змінами міграційної активності клітин у відповідь на блокування функцій кожної з ізоформ. Блокування функцій окремих ізоформ було забезпечено нокдаунами їхньої експресії у використаних CRISPR/Cas9-модифікованих клітинах, а пригнічення функцій присутніх у модифікованих клітинах ізоформ – за допомогою інгібування безпосереднього регулятора S6K1 – кінрази mTOR рапаміцином. Моделювання міграції пухлинних клітин та їхньої взаємодії з дермальними фібробластами було виконано з поступовим ускладненням моделі з забезпеченням чотирьох варіантів експериментальних умов: міграція під паракринним впливом у двовимірних умовах, міграція з двосторонньою паракринною взаємодією у двовимірних умовах, міграція під паракринним впливом у тривимірних умовах, міграція з фізичною взаємодією у тривимірних умовах. Послідовне блокування функцій з поступовим ускладненням моделі міграції та міжклітинних взаємодій разом з детальним аналізом змін міграційної активності клітин дозволив доведення участі усіх трьох ізоформ S6K1 у забезпеченні регуляції клітинної міграції як загалом, так і

під впливом мікрооточення, оцінку їхньої важливості за різних аспектів цих процесів, а також виявлення виразних відмінності їхніх функціональних ролей.

3.3.1. Обґрунтування вибору параметру вимірювання міграційної активності на моделі «раневої поверхні»

З метою уточнення результатів роботи у даному дослідженні вимірювання міграційну активність було виміряно за зміною площі між клітинними фронтами після міграції замість класичного вимірювання за зміною відстаней між ними. Підвищену зручність та ефективність вимірювання саме таким способом було обґрунтовано. Поверхню між клітинними фронтами можна сприймати як низку трапецій, що бічними сторонами огортають рельєф клітинних фронтів (рис. 3.10: а). Беручи до уваги середні розміри клітини, нехай висота таких трапецій (h) – 1 мкм. Класична відстань між клітинними фронтами у даній моделі, таким чином, виступає серединною лінією трапеції (m_n). Площа останньої (S_n) вимірюється як добуток довжини серединної лінії на висоту: $S_n = h \times m_n$. Площа ж поверхні між фронтами (S) представляється сумарною площею усіх трапецій, що лежать в її межах. Отримуємо наступні розрахунки, представлені формулами 3.1-3.4:

$$S = S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n; \quad (3.1)$$

$$S = h \times m_1 + h \times m_2 + h \times m_3 + \dots + h \times m_n = h \times (m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_n); \quad (3.2)$$

$$(m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_n) = S/h; \quad (3.3)$$

$$(m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_n)/n = S/hL, \quad (3.4)$$

де L – довжина багатокутника, а n – кількість трапецій. Так як $h = 1$, то $n = L$, а отже $m_{\text{сер}} = S / L$. Враховуючи, що альтернативне класичне вимірювання відстаней між клітинними фронтами з таким же інтервалом у 1 мкм є очевидно дуже затратним щодо часу та праці, ми вважаємо, що вимірювання площі є більш оптимальним.

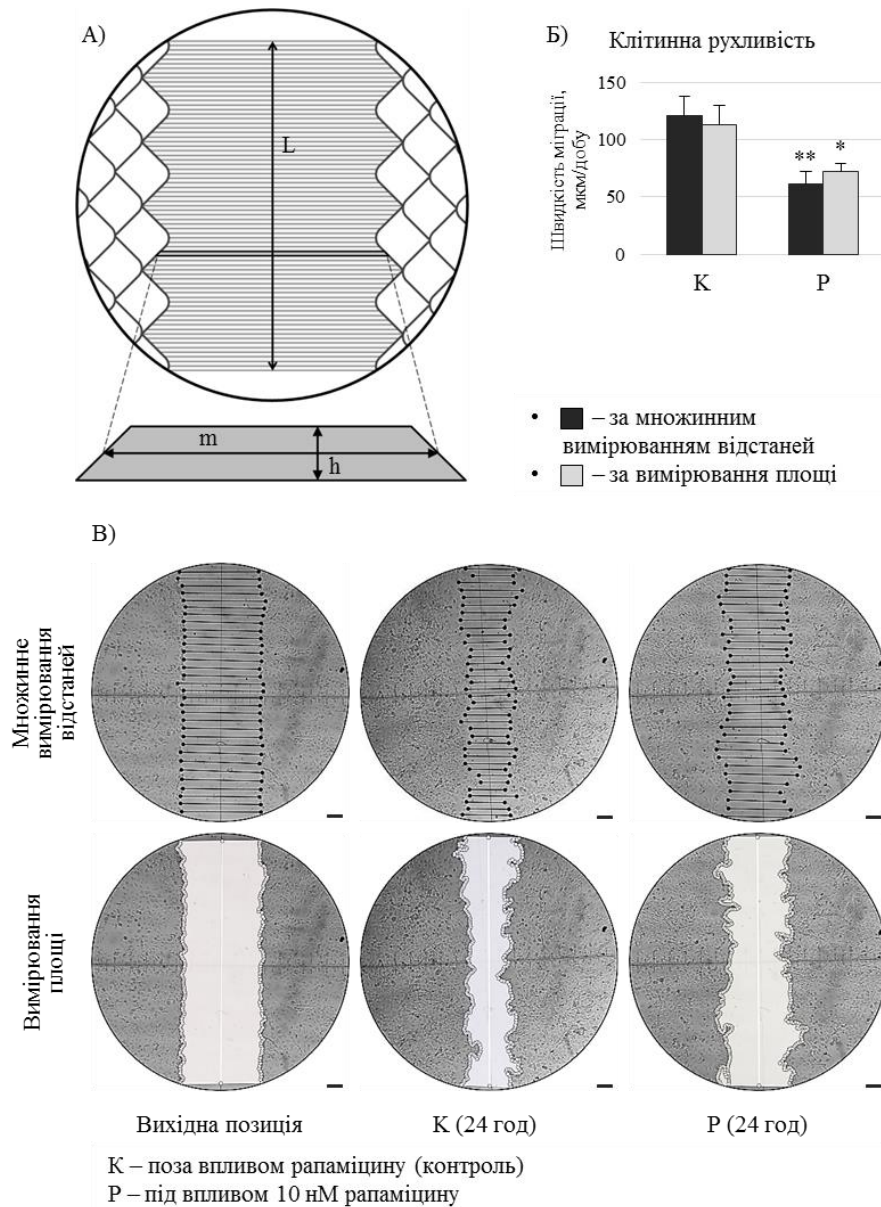


Рис. 3.10. Порівняння вимірювань міграційної активності клітин лінії HeLa на моделі «раневої поверхні» за зміною середньої відстані між клітинними фронтами та за зміною площі між ними: А – схематичне зображення клітинних фронтів та вільної поверхні між ними сформованої множиною уявних трапецій з позначенням вимірюваних параметрів (масштаб не дотримано); Б – швидкість клітин HeLa поза та під дією 10 нМ рапаміцину за результатами вимірювань обома способами (статистично достовірні відмінності позначено як: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$); В – репрезентативні мікрофотографії позицій клітинних фронтів до та після здійснення міграції з вимірюванням відстані між ними обома способами (масштаб – 100 мкм).

Зміна площі поверхні між клітинними фронтами може бути показником міграційної активності сама по собі, однак, для більш звичного представлення клітинної рухливості її можна легко перерахувати у дистанцію, що долає клітина поділивши цю площу на ширину поля зору або довжину всього клітинного фронту, при цьому вже уникнувши низки ймовірних похибок, які виникли б за прямого вимірювання відстаней між фронтами.

Відмінності у результатах вимірювань обома способами в межах одного експерименту на одних і тих же мікрофотографіях було продемонстровано на прикладі дослідження впливу інгібування кінази mTOR рапаміцином на міграційну активність клітин лінії HeLa (рис. 3.10: б, в).

Швидкість клітин HeLa поза впливом на них рапаміцину виміряна за зміною відстаней – $121,7 \pm 16,9\%$, за зміною площі – $112,8 \pm 17,1\%$. Швидкість клітин HeLa під впливом на них 10 нМ рапаміцину виміряна за зміною відстаней – $61,6 \pm 10,8\%$, за зміною площі – $72 \pm 7,6\%$. Відповідно, вимірювання за зміною відстаней між клітинними фронтами продемонструвало зниження міграційної активності HeLa під впливом рапаміцину на $49,7 \pm 2,7\%$, тоді як вимірювання за зміною площі – на $35,7 \pm 4,2\%$.

Різницю у отриманих результатах, а це близько 15%, було розцінено як ту похибку, яка виникає при вимірюванні міграційної активності за зміною відстаней між клітинними фронтами і якої можна позбутися при використанні у якості критерію вимірювання площі, при цьому виконуючи вимірювання значно зручніше та швидше.

3.3.2. Участь у регуляції міграційної активності клітин під паракринним впливом дермальних фібробластів у двовимірних умовах

Міграцію клітин під паракринним впливом дермальних фібробластів у двовимірних умовах було забезпечено на моделі «раневої поверхні» з культивуванням клітин у КС дермальних фібробластів.

Вимірюванням міграційної активності клітин під впливом КС та рапаміцину було виявлено здатність паракринної сигналізації дермальних фібробластів посилювати рухливість клітин MCF-7, що виразно залежить від функціонування mTOR-сигнальної мережі (рис. 3.11, MCF-7: К, Р, КС, КС+Р).

Швидкість міграції клітин MCF-7 дикого типу поза впливом на них експериментальних факторів – $125,4 \pm 10,1$ мкм/добу. Перебування клітин під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів підвищує їхню швидкість на $26,5 \pm 9,5\%$. Додавання 10 нМ рапаміцину до 20%-го КС дермальних фібробластів повністю нейтралізує стимулюючий ефект КС, знижуючи швидкість міграції і повертаючи її до рівня характерного клітинам поза впливом експериментальних факторів. При цьому рапаміцин, навіть за умов довготривалої дії, не досягає своєї максимальної ефективності у зниженні міграційної активності, яку демонструє за умови окремої дії на клітини, що свідчить про залучення до активації рухливості фібробластами також і mTOR-незалежних механізмів. Швидкість клітин MCF-7 під впливом 10 нМ рапаміцину знижує швидкість на $21,6 \pm 6,4\%$.

Вимірюваннями міграційної активності клітин MCF-7 з нокдаунами ізоформ S6K1 під впливом КС та рапаміцину та характеристикою їхньої чутливості до цих факторів було виявлено суттєві відмінності функціональних ролей ізоформ у регуляції паракринно стимульованої фібробластами клітинної рухливості (рис. 3.11: К, Р, КС, КС+Р).

Нокдаун p85S6K1 знизив рухливість клітин MCF-7 та чутливість до блокування mTOR-сигналізації, однак не порушив чутливості до паракринного впливу фібробластів, що демонструє p85S6K1 як mTOR-залежного позитивного регулятора клітинної міграції та її незалучення або ж вторинність ролі у сприйнятті клітиною впливу фібробластів.

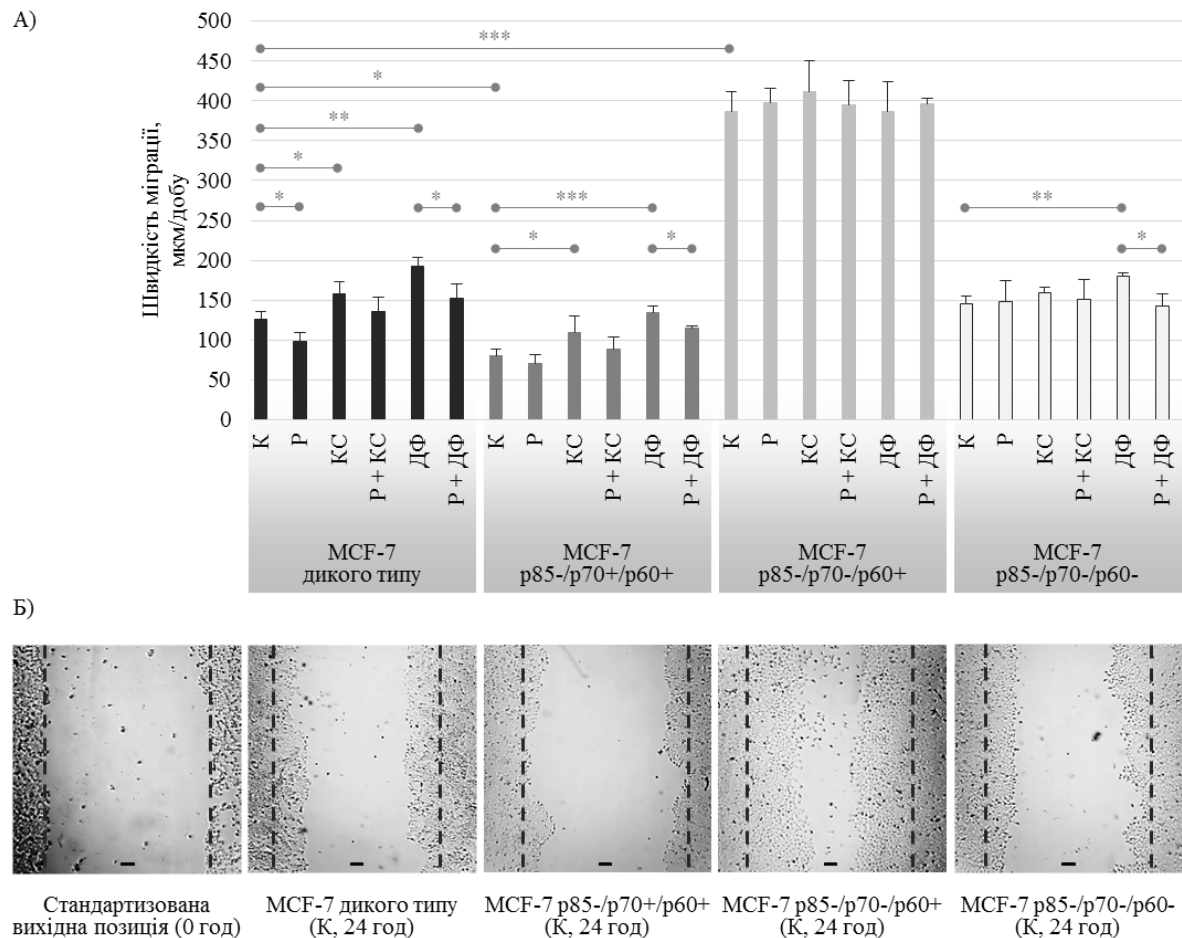


Рис. 3.11. Міграційна активність клітин лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (дія 20% КС) – «КС»; за умови паракринної взаємодії з дермальними фібробластами (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»: А – швидкість міграції клітин, Б – репрезентативні мікрофотографії позицій клітинних фронтів за контрольних умов (поза впливом рапаміцину та фібробластів) – стандартизованої вихідної та після 24 годин міграції (масштаб – 100 мкм). Статистично достовірні відмінності позначено як: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$, «***» – $p < 0,001$

Середня швидкість клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ – лише $80,3 \pm 8,2$ мкм/добу, тобто знижена на $36 \pm 3,9\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 дикого типу. Перебування під впливом 20%-го КС фібробластів посилює швидкість на $36,2 \pm 12,4\%$. Вплив 10 нМ рапаміцину не викликає видимих змін рухливості p85S6K1-нокаутних клітин за умов окремої дії. При цьому рапаміцин все ж знижує рухливість стимульовану фібробластами, повністю нейтралізуючи стимулюючий ефект КС.

Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, різко підвищує рухливість клітин MCF-7 та повністю нівелює чутливість до пригнічення mTOR-сигналізації і паракринного впливу фібробластів, що свідчить про функціонування p70S6K1 як негативного/стримувального регулятора клітинної міграції та її ключову роль у mTOR-опосередкованій регуляції міграційної активності та її стимуляції паракринним впливом фібробластів.

Середня швидкість клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+ – $387,1 \pm 24,3$ мкм/добу, тобто зростає на $210,7 \pm 40,6\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 дикого типу або на $387,8 \pm 80,4\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 p85-/p70+/p60+. Перебування під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів та/або 10 нМ рапаміцину не викликає видимих змін активності їхнього переміщення.

Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, різко знижує активність міграції клітин MCF-7 та залишає незмінною її нечутливість до паракринного впливу фібробластів та пригнічення mTOR-сигналізації, що характеризує p60S6K1 як позитивного регулятора клітинної рухливості та її незалучення або ж вторинність ролі у mTOR-опосередкованій регуляції міграційної активності та її стимуляції паракринним впливом фібробластів.

Середня швидкість клітин MCF-7 p85-/p70-/p60- – $145 \pm 10,6$ мкм/добу, тобто залишається на рівні характерному швидкості MCF-7 дикого типу або ж знижується на $62,6 \pm 0,8\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 p85-/p70-/p60+.

Перебування під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів та/або 10 нМ рапаміцину не викликає видимих змін активності їхнього переміщення.

3.3.3. Адаптація моделі «раневої поверхні» до вимірювання міграційної активності клітин в умовах співкультивування

Модель «раневої поверхні» – класичний та один з найпопулярніших підходів до вимірювання активності клітинної міграції, однак класичний протокол цього методу не передбачає можливості вимірювання активності міграції клітин одного типу в умовах паракринної взаємодії з клітинами іншого типу. Для забезпечення можливості існування у спільній культуральній системі дистанційної сигнальної взаємодії між досліджуваними мігруючими клітинами та клітинами-регуляторами різних типів з їхнім фізичним розмежуванням в умовах моношару модель «раневої поверхні» було модифіковано спеціальним способом зональної висаджування клітин.

Адаптацію способу висаджування та випробування модифікованої моделі було виконано з використанням клітинних ліній HeLa у якості мігруючих клітин та фібробластів NIH 3T3 у якості клітин-регуляторів міграції. Для цього фібробласти NIH 3T3 у невеликому об'ємі поживного середовища висівали на край круглої ростової поверхні (наприклад, культуральної чашки) і поступальними обертальними рухами розподіляли суспензію вздовж її стінок. Суспензія, таким чином, займала периферичне положення і утримувалася в ньому силами поверхневого натягу. Після годинної інкубації більшість клітин осідала та адгезувала до ростової поверхні, решту видаляли промиванням поживним середовищем. Наступне внесення суспензії клітин HeLa у центр чашки заповнювало вільний простір на ростовій поверхні в оточенні периферичного кільця утвореного фібробластами. Таким чином, після досягнення співкультурою конфлюентності та розсікання моношару у системі розмежовуються чотири інтерактивні зони клітин (рис. 3.12): 1 – клітини NIH 3T3 на периферії системи, що не мають фізичного контакту з клітинами

HeLa, які мігрують у складі клітинних фронтів, але обмінюються з ними інформацією паракринно; 2 – клітини HeLa, що займають більшу частину площі у центральній частині системи, активні у паракринній взаємодії з NIH 3T3, але не залучені до міграції; 3 – клітини HeLa, що формують клітинні фронти, здійснюють міграцію та перебувають у паракринній взаємодії з NIH 3T3.

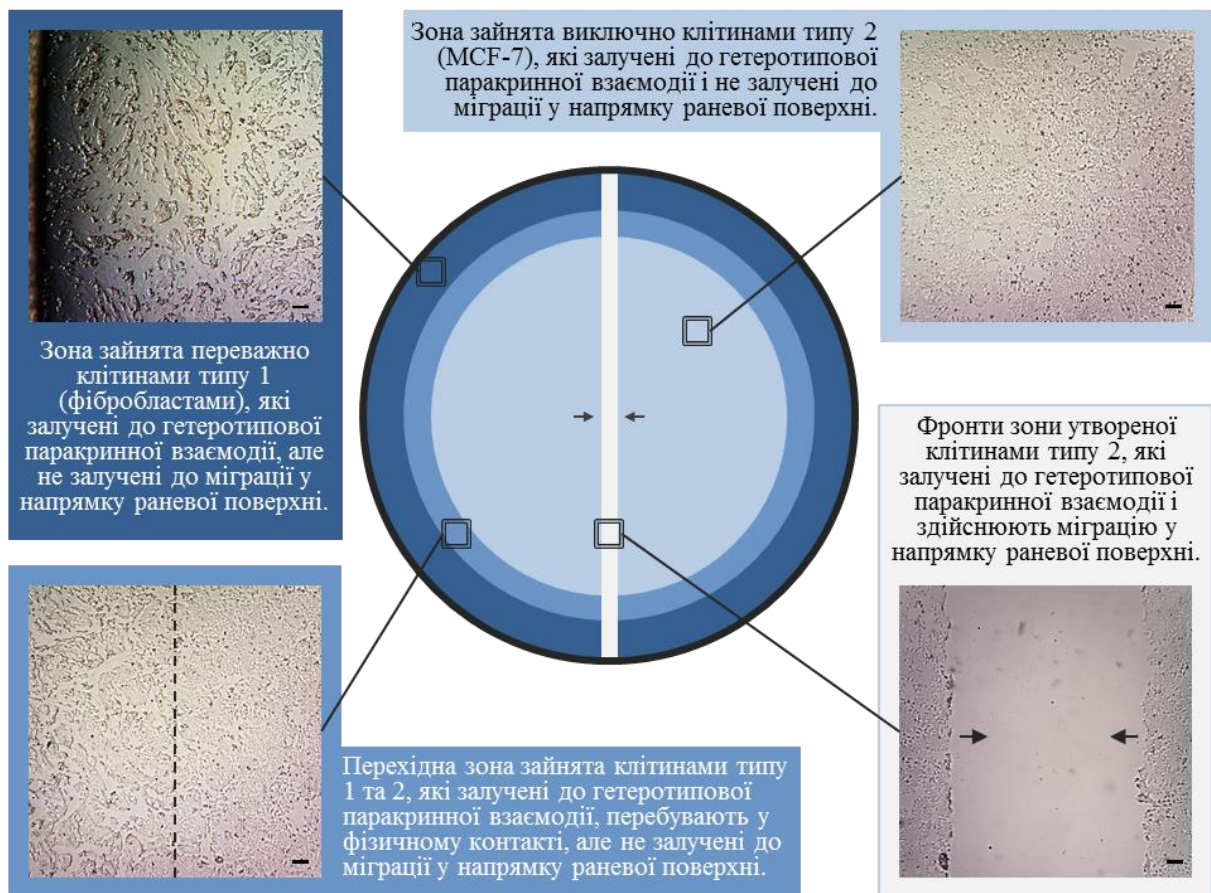


Рис. 3.12. Схематичне зображення моделі «раневої поверхні» модифікованої за допомогою зональної висадки клітин для вимірювання міграційної активності в умовах співкультивування. На схемі позначено функціональні зони моделі, наведено їх опис та репрезентативні мікрофотографії стану співкультури в таких зонах (масштаб – 100 мкм)

В результаті, у системі можлива як фізична взаємодія, так і паракринний двосторонній обмін інформацією, однак гетеротипова фізична взаємодія зводиться у цій моделі до мінімуму, адже представлена лише на периферії відносно незначною кількістю учасників та відсутня у зоні міграції клітин.

3.3.4. Участь у регуляції міграційної активності клітин за паракринної взаємодії з дермальними фібробластами у двовимірних умовах

Міграцію клітин за паракринної взаємодії з дермальними фібробластами у двовимірних умовах було забезпечено на моделі «раневої поверхні» з прямим співкультивуванням клітин з дермальними фібробластами, що було уможливлено розробленою модифікацією моделі.

Вимірюванням міграційної активності клітин MCF-7 дикого типу під впливом паракринної взаємодії з фібробластами та рапаміцину було виявлено ймовірну здатність пухлинних клітин до посилення паракринного стимулюючого впливу фібробластів на свою ж міграційну активність за механізмом зворотного паракринного зв'язку, а також підтверджено залежність цих процесів від функціонування mTOR-сигнальної мережі (рис. 3.11, MCF-7: К, Р, ДФ, ДФ+Р).

Перебування клітин у прямій паракринній взаємодії з дермальними фібробластами підвищує їхню швидкість на $53,9 \pm 9,7\%$. Вплив 10 нМ рапаміцину на співкультуру з дермальними фібробластами нейтралізує посилення швидкості фібробластами, повертаючи її до рівня характерного клітинам поза впливом на них експериментальних факторів.

Вимірюванням міграційної активності клітин MCF-7 з нокдаунами ізоформ S6K1 під впливом паракринної взаємодії з фібробластами та рапаміцину і порівняльною характеристикою їхньої чутливості до цих факторів було підтверджено суттєві відмінності функціональних ролей ізоформ у регуляції паракринно стимульованої фібробластами клітинної рухливості, що була продемонстрована на моделі використання КС (рис. 3.11: К, Р, ДФ, ДФ+Р).

Перебування в умовах паракринної взаємодії з дермальними фібробластами у співкультури посилює швидкість міграції клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ – на $67,7 \pm 8\%$, MCF-7 p85-/p70-/p60- – на $24,3 \pm 6,1\%$ та не викликало видимих змін активності переміщення MCF-7 p85-/p70-/p60+. Вплив 10 нМ рапаміцину на співкультуру з дермальними фібробластами нейтралізував посилення швидкості міграції клітин MCF-7 p85-/p70-/p60-, повернувши її до рівня характерного клітинам поза впливом на них експериментальних факторів, обмежив посилення швидкості міграції клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ – до $43,4 \pm 15\%$ та не викликав видимих змін активності клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+, нечутливої також і до впливу КС дермальних фібробластів та/або рапаміцину.

3.3.5. Участь у регуляції міграційної активності під паракринним впливом дермальних фібробластів у тривимірних умовах

Міграцію клітин під паракринним впливом дермальних фібробластів у тривимірних умовах було забезпечено на моделі реверсії багатоклітинних сфероїдів з культивуванням клітин у КС дермальних фібробластів.

Вимірюванням міграційної активності клітин MCF-7 дикого типу та MCF-7 з нокдаунами ізоформ S6K1 під впливом КС та рапаміцину і характеристикою їхньої чутливості до цих факторів було загалом підтверджено ідентифіковані на моделі міграції клітин у двовимірних умовах ознаки: здатності дермальних фібробластів до паракринної стимуляції клітинної рухливості MCF-7; її залежності від функціонування mTOR-сигнальної мережі та залучення також і mTOR-незалежних механізмів; p85S6K1 як mTOR-залежного позитивного регулятора клітинної міграції та її вторинності у сприйнятті клітиною впливу фібробластів; p70S6K1 як негативного/стримувального регулятора клітинної міграції та її ключову роль у mTOR-опосередкованій регуляції міграційної активності та її стимуляції паракринним впливом фібробластів; p60S6K1 як позитивного регулятора

клітинної рухливості та вторинність ролі у mTOR-опосередкованій регуляції міграційної активності та її стимуляції паракринним впливом фібробластів (Рис. 3.13: К, Р, КС, КС+Р).

Швидкість поширення клітин MCF-7 дикого типу поза впливом на них досліджуваних факторів – $43,4 \pm 4,4$ тис. мкм²/добу. Перебування клітин під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів підвищує їхню швидкість на $32,1 \pm 2,6\%$. Додавання 10 нМ рапаміцину до 20%-го КС дермальних фібробластів повністю нейтралізує стимулюючий ефект КС, знижуючи швидкість міграції і повертаючи її до рівня характерного клітинам поза впливом експериментальних факторів. Окрема дія 10 нМ рапаміцину знижує міграційну активність на $25 \pm 7,5\%$.

Середня швидкість поширення клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ – $23,5 \pm 2,6$ тис. мкм²/добу, тобто знижена на $45,8 \pm 2,4\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 дикого типу. Перебування під впливом 20%-го КС фібробластів посилює швидкість на $52,9 \pm 25,6\%$. Додавання 10 нМ рапаміцину до 20%-го КС дермальних фібробластів обмежує стимулюючий ефект до зростання швидкості на $38,4 \pm 13,4\%$, тоді як окрема дія 10 нМ рапаміцину не викликає видимих змін активності переміщення.

Середня швидкість поширення клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+ – $69,1 \pm 7,1$ тис. мкм²/добу, тобто зростає на $61,6 \pm 33\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 дикого типу або на $199 \pm 67,1\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 p85-/p70+/p60+. Перебування під впливом 20%-го КС дермальних фібробластів та/або 10 нМ рапаміцину не викликає видимих змін активності їхнього переміщення.

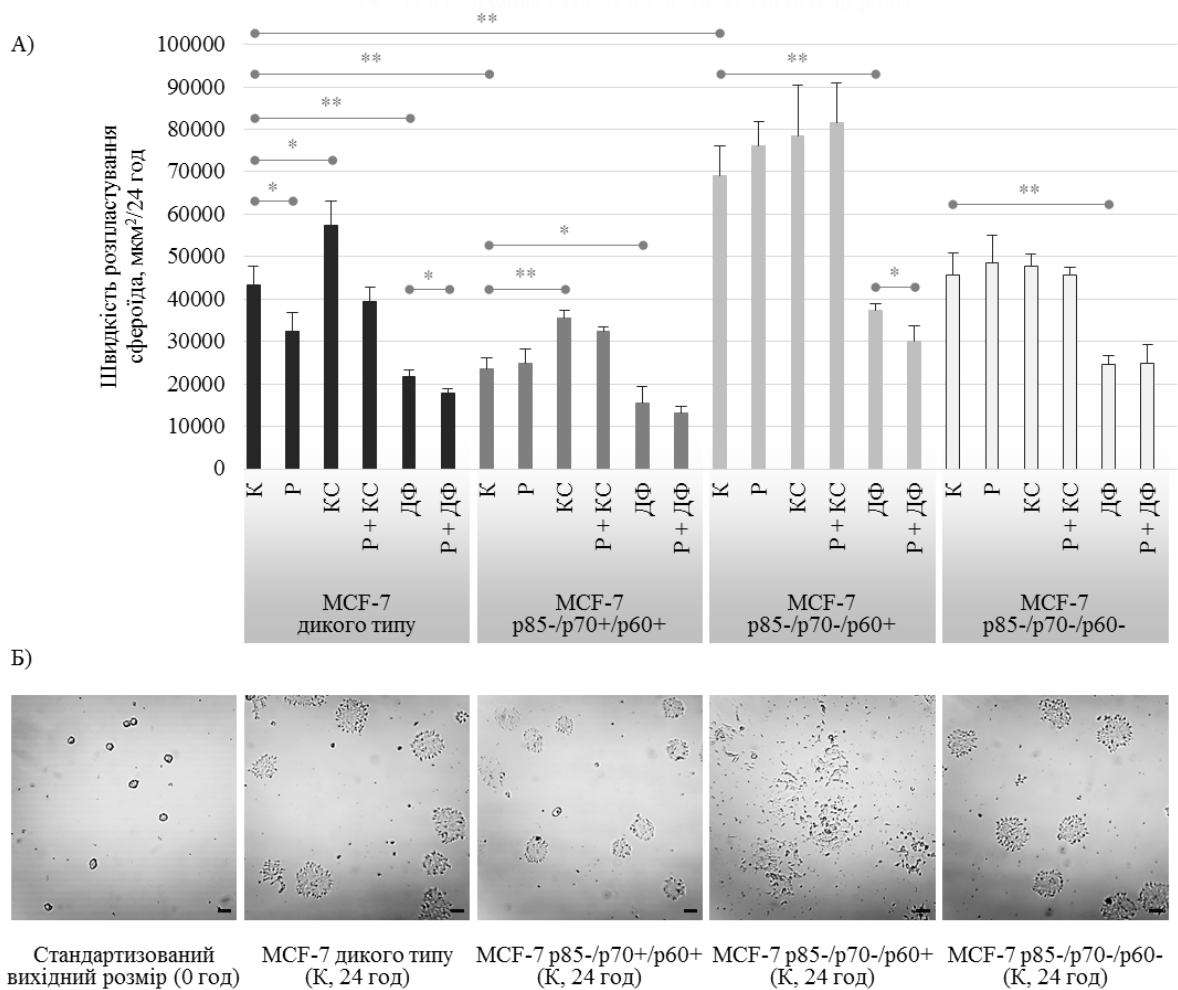


Рис. 3.13. Міграційна активність клітин лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) під впливом паракринної сигналізації дермальних фібробластів (дія 20% КС) – «КС»; за умови фізичної та паракринної взаємодії з дермальними 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 тривиміркову співкультуру «ДФ+Р») на моделі реверсії багатоклітинного сфероїда: А – швидкість міграції клітин, Б – репрезентативні мікрофотографії сфероїдів за контрольних умов (поза впливом рапаміцину та фібробластів) – стандартизованого розміру та розміром після 24 годин міграції клітин (масштаб – 100 мкм). Статистично достовірні відмінності позначено як: «*» – $p < 0,05$ та «**» – $p < 0,01$.

Середня швидкість поширення клітин MCF-7 p85-/p70-/p60- – $45,8 \pm 5,1$ тис. мкм²/добу, тобто залишається на рівні характерному швидкості MCF-7 дикого типу або ж знижується на $32,9 \pm 13,3\%$ порівняно зі швидкістю MCF-7 p85-/p70-/p60+. Як і у випадку MCF-7 p85-/p70-/p60+, активність міграції не піддається видимим змінам у відповідь на вплив 20% КС дермальних фібробластів та/або 10 нМ рапаміцину.

3.3.6. Участь у регуляції міграційної активності за умов фізичної взаємодії з фібробластами у тривимірних умовах

Міграцію клітин за фізичної та паракринної взаємодії з дермальними фібробластами у тривимірних умовах було забезпечено на моделі реверсії багатоклітинних сфероїдів з їхньою реверсією на моношарі дермальних фібробластів.

Вимірюванням міграційної активності клітин MCF-7 дикого типу під впливом фізичної взаємодії з дермальними фібробластами і рапаміцину (рис. 3.13, MCF-7: К, Р, ДФ, ДФ+Р) було показано здатність дермальних фібробластів стримувати рухливість пухлинних клітин, нейтралізуючи продемонстровані ефекти паракринної сигналізації, що залежить від функціонування у клітинах mTOR-сигнальної мережі.

Перебування під впливом фізичної взаємодії з дермальними фібробластами у співкультурі знизило швидкість поширення клітин MCF-7 дикого типу на $49,8 \pm 3\%$. Вплив 10 нМ рапаміцину на співкультуру з дермальними фібробластами посилив зниження швидкості поширення клітин MCF-7 дикого типу до $58,6 \pm 2\%$.

Вимірюванням міграційної активності клітин MCF-7 з нокдаунами ізоформ S6K1 під впливом фізичної взаємодії з дермальними фібробластами і рапаміцину (рис. 3.13: К, Р, ДФ, ДФ+Р) та характеристикою їхньої чутливості до цих факторів було підтверджено залучення та відмінності функціональних

ролей ізоформ у регуляції клітинної рухливості, зокрема і спряженої з фізичними міжклітинними взаємодіями.

Перебування під впливом фізичної взаємодії з дермальними фібробластами у співкультурі знизило швидкість поширення клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ – на $33,9 \pm 15,6\%$, клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+ – на $45,5 \pm 7,5\%$, клітин MCF-7 p85-/p70-/p60- – на $45,7 \pm 11,4\%$. Вплив 10 нМ рапаміцину на співкультуру з дермальними фібробластами посилив зниження швидкості поширення клітин MCF-7 p85-/p70-/p60+ – до $56,1 \pm 8,2\%$, незначно посилив зниження швидкості поширення клітин MCF-7 p85-/p70+/p60+ та не викликав видимих змін зниженої фібробластами активності клітин MCF-7 p85-/p70-/p60-.

3.3.7. 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 було виявлено притаманними клітинам з нокдауном ізоформ p85S6K1 та p70S6K1, тоді як клітини MCF-7 p85-/p70+/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60- 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 (рис. 3.14).

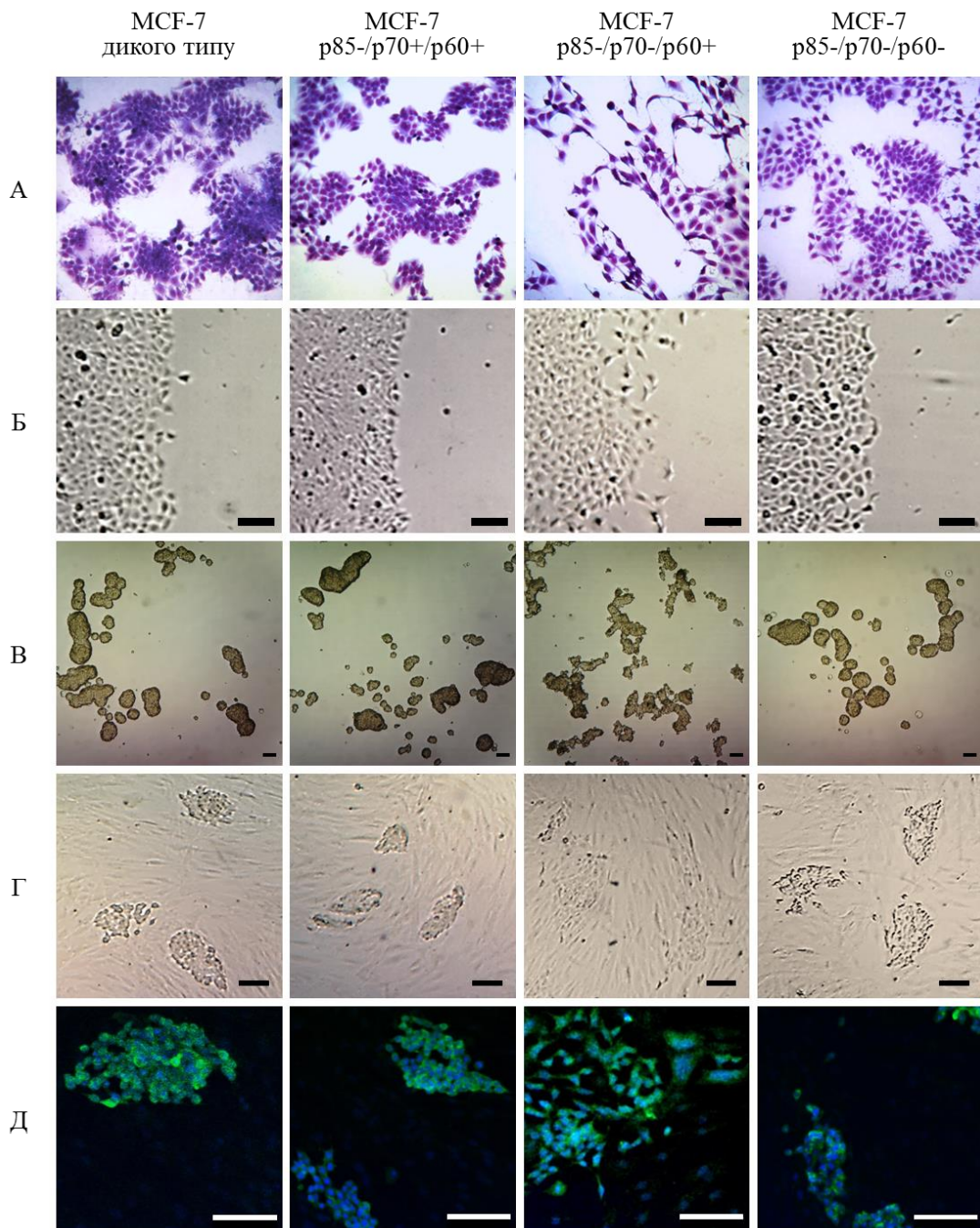


Рис. 3.14. Морфологічна будова клітин лінії MCF-7, MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) та сформованих ними надклітинних утворень, мікрофотографії (масштаб – 100 мкм): А моношарових культур, Б – клітинних фронтів утворених на моделі раневої поверхні під час міграції, В – багатоклітинних сфероїдів у тривимірній культурі, Г та Д – багатоклітинних сфероїдів у процесі реверсії на моношарі дермальних фібробластів та препарати таких сфероїдів з імунофлюоресцентною детекцією цитокератинів та фарбуванням клітинних ядер DAPI

За умов міграції з клітинного фронту або сфероїда клітинам MCF-7 p85-/p70-/p60+ було властиво активно залишати основну групу клітин, поодинокі або ж невеликими групами. У процесі культивування, клітини MCF-7 p85-/p70-/p60+ 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 MCF-7 p85-/p70-/p60+ було значно легше відкріпити від ростової поверхні, що при цьому вимагало особливого поводження з ними при моделюванні та вимірюванні клітинної міграції. При фізичній взаємодії у процесі культивування дрібні багатоклітинні сфероїди утворені такими клітинами не «зросталися» з утворенням більших, а формували «гіллясті» видовжені та складні за формою утворення. У випадку ж висадки сформованих клітинами MCF-7 p85-/p70-/p60+ сфероїдів на моношар дермальних фібробластів, вони, на відміну від інших типів клітин MCF-7 не зосереджувалися фібробластами у вигляді компактної колонії, а легко порушували свою структуру та розподілялися серед фібробластів.

Крім того, сфероїди, утворені клітинами MCF-7 p85-/p70-/p60+, особливо вирізнялися своєю «неправильною» формою – ступінь їхньої сферичності виразно поступався сфероїдам, утвореним клітинами дикого типу, MCF-7 p85-/p70+/p60+ чи MCF-7 p85-/p70-/p60- (рис. 3.15).

Ступінь сферичності сфероїдів утворених клітин дикого типу було охарактеризовано на рівні $90,1 \pm 4,3\%$, на такому ж рівні спостерігався ступінь сферичності сфероїдів MCF-7 p85-/p70+/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-, відповідно $90,8 \pm 3,7\%$ та $93,5 \pm 3,5\%$, тоді як сферичність сфероїдів MCF-7 p85-/p70-/p60+ була зниженою до $77,6 \pm 7,3\%$.

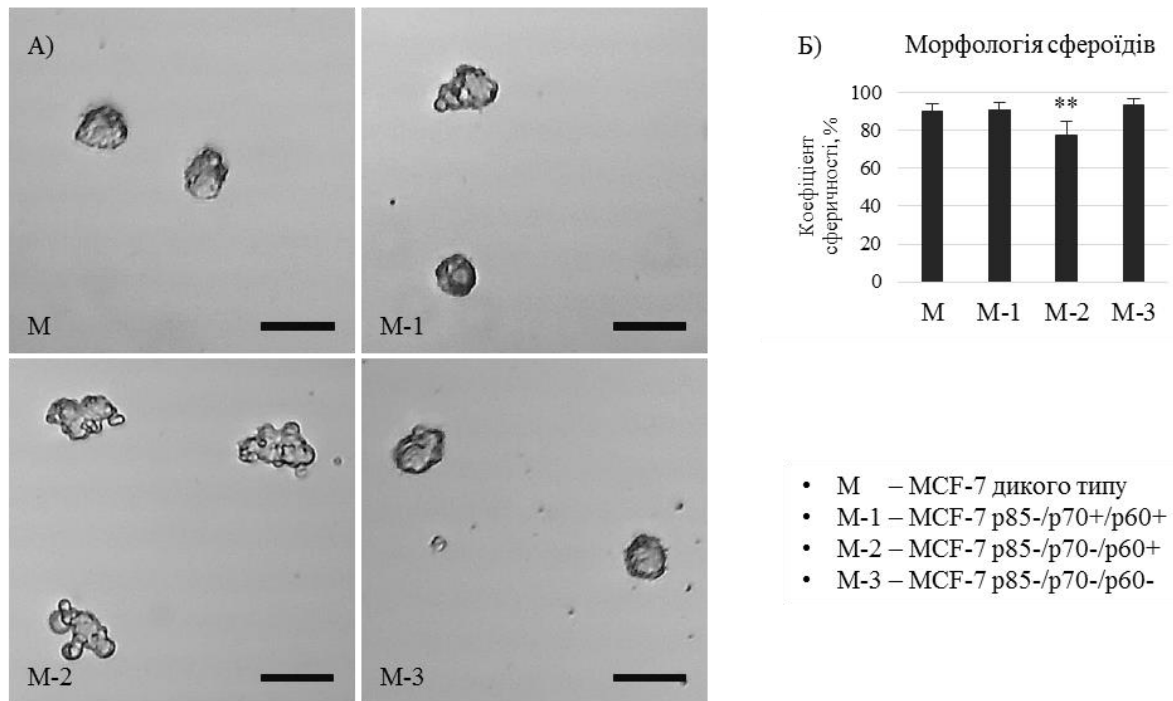


Рис. 3.15. Морфологічна будова стандартизованих за розміром багатоклітинних сфероїдів утворених клітинами лінії МСF-7 та МСF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (МСF-7 p85-/p70+/p60+, МСF-7 p85-/p70-/p60+ та МСF-7 p85-/p70-/p60-): А) репрезентативні мікрофотографії багатоклітинних сфероїдів (масштаб – 100 мкм), Б) морфометрична характеристика багатоклітинних сфероїдів за коефіцієнтом сферичності. Статистично достовірну відмінність від ступеню сферичності сфероїдів МСF-7 дикого типу позначено як: «**» – $p < 0,01$

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089D>.
2. **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.
3. 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.
 4. **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.

3.4. Дослідження участі ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінрази S6K1 у регуляції експресії вибраних білків асоційованих з забезпеченням міграційної активності клітини

Пошук молекулярних механізмів, за якими mTOR/S6K1-сигнальна ланка може здійснювати регуляцію активності клітинної міграції, було зосереджено на дослідженні можливості специфічної регуляції ізоформами кінрази S6K1 експресії вибраних білків, що забезпечують клітинну адгезивність, механорецепцію, формування і реструктурування цитоскелету та міжклітинних контактів. Вибір маркерних білків було виконано з урахуванням наявності у літературі відомостей про їхнє підтверджене або принаймні гіпотетичне залучення до забезпечення процесів клітинної міграції, PI3K/АКТ/mTOR-сигналізації та/або характерність епітеліальному фенотипу. Залучення тієї чи іншої ізоформи S6K1 до регуляції експресії маркерного білка було ідентифіковано та охарактеризовано за зміною активності експресії цього

білка у відповідь на блокування її функціонування. Рівні експресії було охарактеризовано за допомогою імуноблот аналізу, тобто на білковому рівні, а блокування функцій окремих ізоформ було забезпечено нокдаунами їхньої експресії у використаних CRISPR/Cas9-модифікованих клітинах.

3.4.1. Участь у регуляції експресії білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e

Залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до регуляції формування клітинами адгезивних контактів було ідентифіковано за здатністю до регуляції експресії епітеліальних білків клітинної адгезії – CD326, CD227 та CD66e. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості цих білків у клітинах MCF-7 з нокдаунами ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.16) було виявлено залежності експресії CD326 від функціонування p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1, експресії CD227 – від p70S6K1 та експресії CD66e – від p85S6K1 та p70S6K1. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p85S6K1 і експресією CD326 та CD66e, між функціонуванням p70S6K1 і експресією CD326, CD227 та CD66e, а також негативних регуляторного зв'язку між функціонуванням p60S6K1 і експресією CD326.

Нокдаун p85S6K1 призвів до виразного послаблення експресії CD326 та CD66e, але ніяк не вплинув на експресію CD227. ВВБ CD326 у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ було виявлено зниженим до $41,6 \pm 12,6\%$, ВВБ CD66e – до $64,8 \pm 2,2\%$, а ВВБ CD227 – незмінним. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, викликав додаткове послаблення експресії CD326 та CD66e, а також, на відміну від нокдауну p85S6K1, критично послабив експресію CD227. ВВБ CD326 у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ було виявлено зниженим до $3,2 \pm 2,2\%$, ВВБ CD66e – до $5,4 \pm 1,1\%$, а ВВБ CD227 – до $11,7 \pm 7,3\%$, тобто спостерігалось практично повне нівелювання присутності цих білків у

клітинах. Нокдаун р60S6K1, додатковий до р85S6K1 та р70S6K1, призвів до різкого зростання активності експресії CD326 з досягненням нею рівня вищого за нормальний, але не вплинув на експресію CD227 та CD66e. ВББ CD326 у клітинах MCF-7 р85-/р70-/р60- було виявлено підвищеним до $142,3 \pm 31,7\%$, тоді як ВББ CD227 та CD66e виявлено на тотожному до зниженого нокдауном р85S6K1 та р70S6K1 рівні.

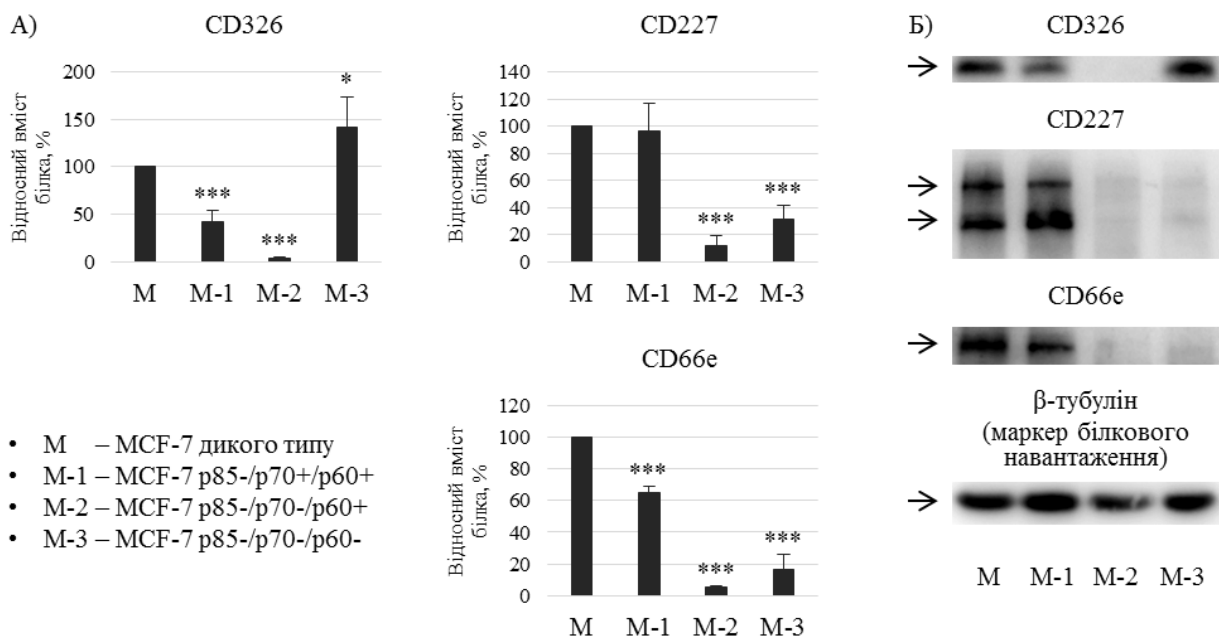


Рис. 3.16. Рівні експресії білків клітинної адгезії CD326, CD227 та CD66e у клітинах лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 р85-/р70+/р60+, MCF-7 р85-/р70-/р60+ та MCF-7 р85-/р70-/р60-) за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$, «***» – $p < 0,001$

3.4.2. Участь у регуляції експресії білків клітинної адгезії з механосенсорними функціями CD29 та CD44

Залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до регуляції механосенсорних функцій клітини та формування клітиною адгезивних контактів було ідентифіковано за здатністю до регуляції експресії білків клітинної адгезії з функціями рецепції елементів ПКМ – CD29 та CD44. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості цих білків у клітинах MCF-7 з нокдаунами ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.17) було виявлено залежності експресії CD29 від функціонування в них p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 та експресії CD44 – від p70S6K1 та p60S6K1. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p85S6K1 і експресією CD29, між функціонуванням p60S6K1 і експресією CD29 та CD44, а також негативні регуляторні зв'язки між функціонуванням p70S6K1 та експресією CD29 та CD44.

Нокдаун p85S6K1 зумовив зниження експресії CD29 та не призвів до змін у експресії CD44. ВВБ CD29 у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ спостерігався зниженим до $78,2 \pm 9,6\%$, тоді як рівень ВВБ CD44 залишився незмінним. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, викликав різке посилення експресії як CD44, так і CD29. ВВБ CD29 у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ детектовано на рівні підвищеному до $154,6 \pm 18\%$, ВВБ CD44 – до $184,7 \pm 23,6\%$. Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, навпаки, став причиною різкого зниження активності експресії обох білків. ВВБ CD29 у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- спостерігався зниженим до $61,8 \pm 8,5\%$, ВВБ CD44 – зниженим з відновленням до нормального рівня.

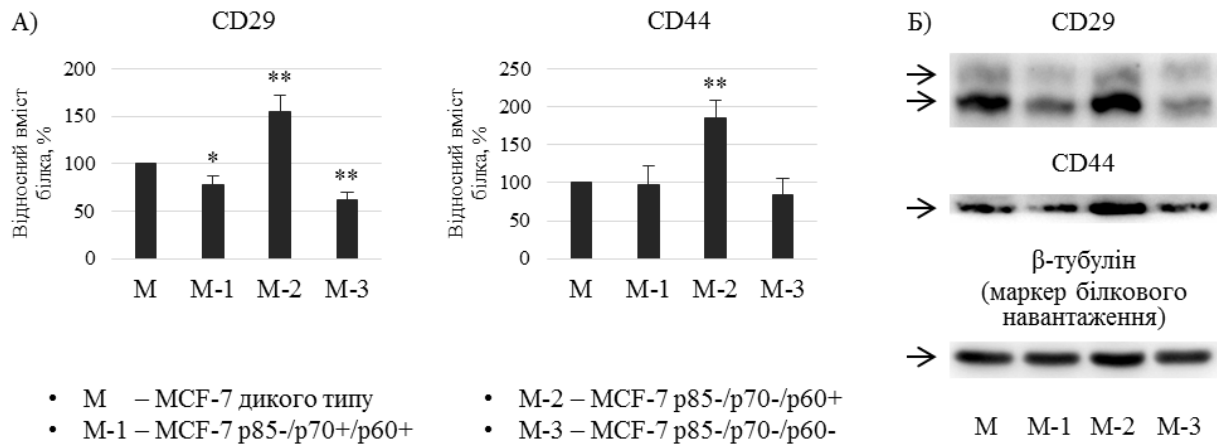


Рис. 3.17. Рівні експресії білків-механорецепторів CD29 та CD44 у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білків у клітинах MCF-7 дикого типу: «*» – $p < 0,05$, «**» – $p < 0,01$

3.4.3. Участь у регуляції активності кінази точок фокальної адгезії FAK

Залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до регуляції активності формування та реструктурування клітинами адгезивних контактів було ідентифіковано за здатністю до регуляції активності кінази точок фокальної адгезії та молекулярного маркера активності клітинної міграції – кінази FAK. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості активованої форми цього білка у клітинах MCF-7 з нокдаунами ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.18) було виявлено залежність активності FAK від функціонування p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p85S6K1 і p60S6K1 та активністю

ФАК, а також негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p70S6K1 та активністю ФАК.

Нокдаун p85S6K1 спричинив виразне послаблення активності ФАК, нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1 – різке її посилення, а нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1 – різко послабив активність кінази до рівня співставного з викликаним нокдауном p85S6K1. ВВБ фосфо-ФАК (Тир-925) у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ виявлено зниженим до $69,6 \pm 10,9\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ – різко підвищеним до $171,4 \pm 25\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- – різко зниженим до $49,9 \pm 24,7\%$.

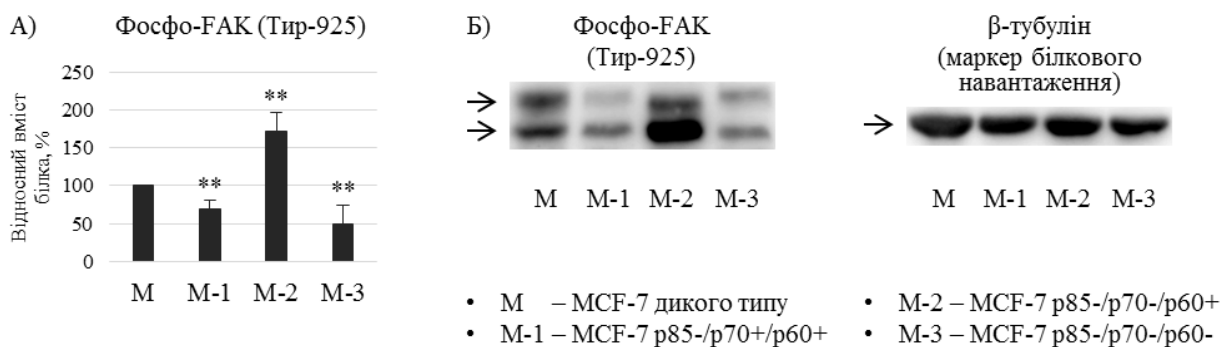


Рис. 3.18. Активність регулятора ремоделювання адгезивних контактів ФАК у клітинах лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу: а – відносний вміст білків у клітинних лізатах, б – репрезентативні блотограми. Статистично достовірні відмінності від вмісту білка у клітинах MCF-7 дикого типу: «**» – $p < 0,01$

3.4.4. Участь у регуляції експресії білків цитоскелету β -актину, цитокератинів та віментину

Залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до регуляції формування клітинами цитоскелету було ідентифіковано за здатністю до регуляції експресії універсальних (β -актин та β -тубулін) та гістіоспецифічних (епітеліальні цитокератини та мезенхімальний віментин) білків цитоскелету. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості цих білків у клітинах MCF-7 з нокдаунами ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.19) було виявлено залежності експресії експресії β -актину та цитокератинів від функціонування p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1, а також віментину – від p70S6K1 та p60S6K1. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p85S6K1 та експресією β -актину, позитивного регуляторного зв'язку між функціонуванням p85S6K1 та експресією цитокератинів, позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p70S6K1 та експресією β -актину і цитокератинів, негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p70S6K1 та експресією віментину, негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p60S6K1 та експресією β -актину і цитокератинів, а також позитивного регуляторного зв'язку між функціонуванням p60S6K1 та експресією віментину.

Відповідно жодних кореляцій між експресією β -тубуліну, p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1, а також віментину та p85S6K1 не було виявлено. З огляду на повну незалежність експресії β -тубуліну від функціонування p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 саме його кількість було використано у якості маркера білкового навантаження у всіх експериментах з імуноблот аналізом лізатів клітин з нокдаунами ізоформ S6K1.

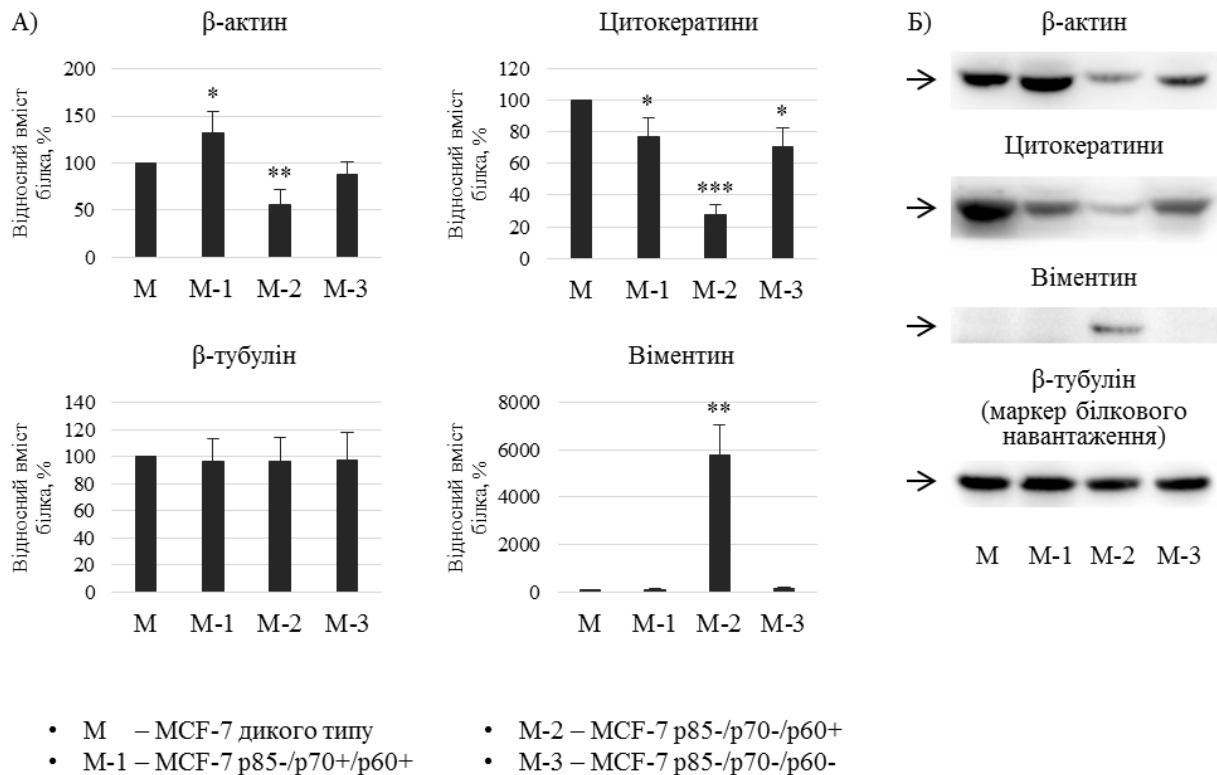


Рис. 3.19. Рівні експресії білків цитоскелету β-актину, β-тубуліну, групи цитокератинів (4, 5, 6, 8, 10, 13 і 18) та віментину у клітинах лінії MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу: а – відносний 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 p85S6K1 призвів до деякого зростання активності експресії β-актину, зниження експресії цитокератинів та ніяк не вплинув на експресію β-тубуліну. ВВБ β-актину у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ спостерігається підвищеним до $131,8 \pm 23,5\%$, ВВБ панцикератинів – зниженим до $76,7 \pm 23,5\%$, ВВБ β-тубуліну – незмінним, ВВБ віментину – відсутнім, як і характерно клітинам MCF-7. Нокдаун p70S6K1, додатковий до p85S6K1, зумовив виразне зниження експресії β-актину, додаткове зниження експресії

цитокератинів і також не мав впливу на експресію β -тубуліну, але при цьому ініціював у клітині експресію віментину. ВВБ β -актину у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ було детектовано зниженим до $55,2 \pm 16\%$, ВВБ цикератинів – зниженим до $27,8 \pm 5,8\%$, ВВБ β -тубуліну – незмінним та ВВБ віментину – наявним. Нокдаун p60S6K1, додатковий до p85S6K1 та p70S6K1, викликав зростання рівня експресії β -актину з відновленням до нормального, зростання рівня експресії цитокератинів до рівня викликаного окремим нокдауном p85S6K1, також, як і у попередніх випадках, не торкнувся експресії β -тубуліну і припинив експресію віментину. ВВБ β -актину у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- було детектовано підвищеним до $87,9 \pm 13,6\%$, ВВБ цикератинів – підвищеним до $70,6 \pm 12,1\%$, ВВБ тубуліну – незмінним, ВВБ віментину – відсутнім.

3.4.5. Участь у регуляції експресії білка щільних міжклітинних контактів ZO-1

Залучення ізоформ p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінази S6K1 до регуляції формування клітинами щільних міжклітинних контактів було ідентифіковано за здатністю до регуляції експресії білка ZO-1. Методом імуноблот аналізу з детекцією та вимірюванням кількості цих білків у клітинах MCF-7 з нокдаунами ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.20: б, в) було виявлено залежність експресії ZO-1 від функціонування p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1. Згідно характеру виявлених залежностей було встановлено наявність позитивних регуляторних зв'язків між функціонуванням p85S6K1 і p60S6K1 та експресією ZO-1, а також негативного регуляторного зв'язку між функціонуванням p70S6K1 та експресією ZO-1.

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. ВВБ ZO-1 у клітинах

MCF-7 p85-/p70+/p60+ виявлено зниженим до $58,8 \pm 8,9\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ – різко підвищеним до $161 \pm 17,2\%$, у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- – різко зниженим до $63 \pm 18,9\%$.

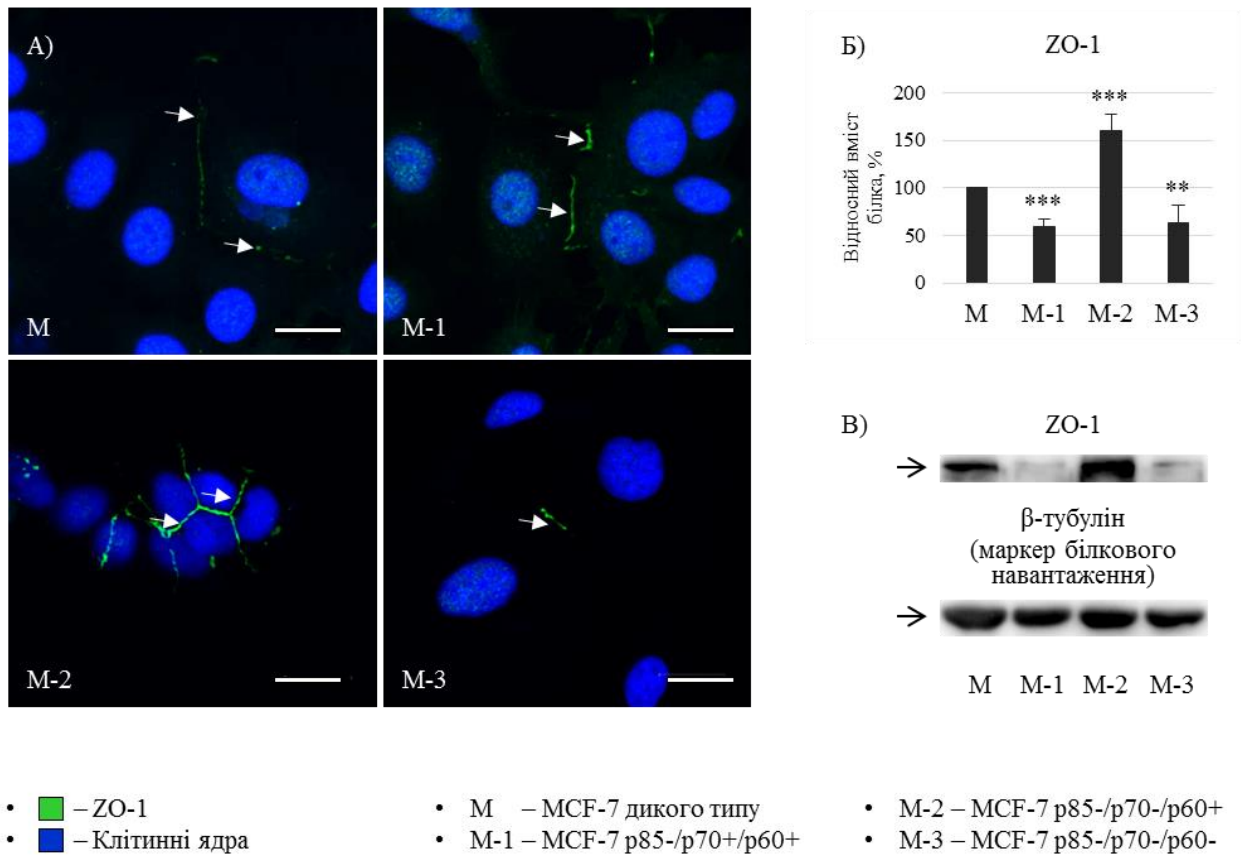


Рис. 3.20. Рівень експресії та локалізація білка щільних міжклітинних контактів ZO-1 у клітинах лінії MCF-7 з нокдауном окремих ізоформ кінази S6K1 (MCF-7 p85-/p70+/p60+, MCF-7 p85-/p70-/p60+ та MCF-7 p85-/p70-/p60-) за результатами імуноблот аналізу та імунофлюоресцентної реакції: а – репрезентативні мікрофотографії препаратів клітин з імунофлюоресцентною 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: «**» – $p < 0,01$, «***» – $p < 0,001$

Методом імунофлюоресцентної реакції з детекцією локалізації ZO-1 у клітинах MCF-7 з нокдаунами окремих ізоформ кінази S6K1 (рис. 3.20: а.) було додатково підтверджено та візуалізовано залежності продемонстровані даними імуноблот аналізу.

Мікропрепарати клітин з нокдауном p85S6K1 демонструють знижений рівень експресії ZO-1 та порушення його функціональної локалізації. Сигнал від білка у клітинах MCF-7 p85-/p70+/p60+ спостерігається менш інтенсивним, більша частина сигналу розпорощена у цитоплазмі, решта ж концентрується у інтерфейсі між меншою кількістю клітин, порівняно з характерним клітинам дикого типу. Мікропрепарати клітин з нокдауном p70S6K1, додатковим до p85S6K1, підтверджують різко підвищений рівень експресії та впорядкованості функціональної локалізації ZO-1. Сигнал від білка у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60+ – високоінтенсивний, сконцентрований у інтерфейсах взаємодій між майже усіма клітинами у групах і майже не виявляється у цитоплазмі. Мікропрепарати клітин з нокдаун p60S6K1, додатковим до p85S6K1 та p70S6K1, подібно до мікропрепарати клітин з нокдауном p85S6K1 характеризуються різко зниженою експресією ZO-1. Сигнал від білка у клітинах MCF-7 p85-/p70-/p60- – найменш інтенсивний, концентрується у інтерфейсах взаємодій між лише окремими клітинами і при цьому майже не детектується у цитоплазмі.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A0B>.
2. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A25>.

3. **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. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A2E>.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Вплив найближчого оточення на поведінку пухлинних клітин виявлено у численних дослідженнях. Було показано, що на злоякісно трансформовані клітини можуть впливати як стромальні клітини, серед них фібробласти, гістіоцити тощо, так і неклітинні компоненти позаклітинного матриксу. Найбільш популярним для таких досліджень об'єктом можна вважати фібробласти сполучної тканини огранів, що зазнали малігнізації. Фібробласти можуть чинити на пухлинні клітини як прямий (безпосередньо контактуючи) так і опосередкований (паракринний, екзосомний) вплив. Причому, як було показано на прикладі карциноми молочної залози, вплив фібробластів може сприяти прогресії, або навпаки, стримуванню пухлинній прогресії. Однак питання про те, які внутрішньоклітинні сигнальні ланцюги пухлинних клітин задіяні у сприйнятті ефектів фібробластів варто продовжувати ретельно досліджувати. Оскільки відомо, що функціонування mTOR/S6K сигнальної мережі зазнає значних змін при карциномах молочної залози, було проаналізовано, чи можуть чинники, продуковані фібробластами модулювати активність ланок зазначеної мережі. Так, нам вдалось з'ясувати, що інкубація клітин лінії MCF-7 із середовищем, кондиціонованим дермальними фібробластами викликає статистично достовірне зростання рівнів фосфорилування mTOR, p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1, rpS6. З іншого боку, важливо було з'ясувати, чи існує прямий зв'язок між активацією mTOR/S6K сигналіngu пухлинних клітин та власне відповіддю пухлинних клітин на вплив фібробластів. Ми підтвердили активуючий ефект фібробластів на локомоторні властивості пухлинних клітин. Інгібуючий вплив рапаміцину на рухливість пухлинних клітин означав залучення mTOR/S6K сигналіngu до регуляції процесу міграції. Водночас додавання кондиціонованого фібробластами

середовища мало антагоністичний ефект та повністю анулювало вплив рапаміцину, повертаючи міграційний потенціал клітин до рівня контролю. Цікаво, що зазначений ефект мав місце при паракринній взаємодії пухлинних клітин та фібробластів, натомість рух пухлинних клітин безпосередньо по моношару фібробластів був значно сповільненим у порівнянні із рухом по культуральному пластику. Незважаючи на численні дослідження прямої взаємодії фібробластів та пухлинних клітин наразі відомо, що вона реалізується із залученням Hedgehog сигнального шляху, проте молекулярні механізми цієї взаємодії досліджені недостатньо.

З метою визначення ізоформ S6K1, залучених до трансформації сигналу фібробластів у поведінку пухлинних клітин, було застосовано низку клітинних ліній зі зміненою експресією S6K1, отриманих на основі клітин лінії MCF-7 за допомогою CRISPR/Cas9 технології. Це дозволило встановити критичну необхідність mTOR/S6K1-сигнальних ланок, а саме p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 для повноцінного сприйняття паракринних сигналів, що надходять з мікрооточення та їхньої реалізації клітиною у регуляції рухливості. Нами було показано, що вимкнення p85S6K1 обмежило рухливість пухлинних клітин MCF-7 (p85-/p70+/p60+), а сумісне пригнічення p85S6K1 та p70S6K1 MCF-7 (p85-/p70-/p60+) повністю нейтралізувало чутливість до впливу фібробластів. Однак слід зазначити, що клітинни (p85-/p70-/p60+) втрачали також чутливість і до рапаміцину, але при цьому швидкість їхньої міграції перевищувала контрольні клітини у 3,5 рази. Дещо неочікувані результати були отримані при визначенні міграційного потенціалу клітин із пригніченими усіма ізоформами S6K1. Як на моделі скретч тесту, так і при трансформації багатоклітинних сфероїдів у моношарову колонію клітин, їхня рухливість була близькою і статистично достовірно не відрізнялась від клітин контрольних. Таким чином, можна висловити гіпотезу, про активацію кінази, яка може компенсувати усунення S6K1. Логічно припустити, що ці ферменти повинні мати принаймні частину спільних мішеней. Такою кіназою може бути S6K2. На моделі генетично модифікованих мишей було показано, що при повному нокауті S6K1

особини не втрачали життєздатності, хоч і були меншими за розміром, а функції S6K1 повністю перебирала на себе S6K2. Така ж гіпотеза могла б пояснити і отримані нами результати.

З метою виявлення молекулярних механізмів рухливості клітин, пов'язаних із S6K1 у першу чергу було проаналізовано статус mTOR/S6K1 сигнального ланцюга у клітинах із порушеним балансом експресії ізоформ S6K1. Так було виявлено, що рівень фосфорилювання двох основних мішеней S6K1 - eEF2K та pS6 суттєво знижується при зсуві експресії ізоформ у бік p60S6K, що може свідчити, що їх ефektорами можуть бути p85S6K1 та p70S6K1, але не p60S6K1. При цьому у лінії із даунрегульованою експресією усіх ізоформ рівень фосфорилювання зазначених молекул хоч і нижчий, ніж у контролі, проте зростає порівняно із M2, що може свідчити про компенсаторне підвищення активності S6K2, як було зазначено вище. Натомість, рівень фосфорилювання раптора, білка-компонента mTOR комплексу 1, суттєво зростає саме у лінії M2, що свідчить про інактивацію цього комплексу. Окрім того, ще одна ланка досліджуваного каскаду Akt суттєвим чином залучена до регуляції рухливості клітин. Розбалансування експресії ізоформ S6K1 також драматичним чином позначилось на активності цієї кінази. Рівень її фосфорилювання достовірно зріс при зсуві експресії S6K1 у бік p60S6K1, при даунрегуляції усіх трьох ізоформ рівень фосфорилювання зріс іще більше, як і змінився рівень фосфорилювання мішеней Akt.

Окрім того, нами вперше показано залучення ізоформ S6K1 до регуляції експресії низки генів асоційованих з реалізацією клітинної рухливості, а саме цитокератинів, віментину, бета-актину, ZO-1, CD44, CD29, CD326, CD66e, CD227. Оскільки були зареєстровані різючі зміни у морфології клітин, а саме ознаки епітеліально-мезенхімної пластичності клітин лінії із вибірковою експресією p60S6K1, був ретельно проаналізований вміст білків цитоскелету. Так було виявлено, що зсув експресії ізоформ S6K1 у бік p60S6K1 викликає зниження вмісту актину. Більш того, зазначені зміни призводять до зниження вмісту білків проміжних філаментів епітеліальних клітин, а саме цитокератинів.

Натомість, у згаданих клітинах MCF-7 (p85-/p70-/p60+) з'явився білок проміжних філаментів клітин мезенхімного походження – віментин, який у нормі не властивий епітеліальним клітинам. Його появу пов'язують із набуттям пухлинними клітинами епітеліально-мезенхімної пластичності, що підтверджувалось морфологією згаданих клітин.

Білок Zo-1 – компонент щільних контактів епітеліальних клітин, розташований на апікальній поверхні клітин. У різних органах він залучений до підтримки інтегрованості епітеліальних тканин та виконання ними власних специфічних функцій. Первинна гіпотеза стосовно Zo-1 у клітинах із редагваною експресією ізоформ S6K1 полягала у тому, що клітини, які не втратили міжклітинних контактів у складі великого пласта будуть рухатись повільніше, стримуючи одна одну. Натомість, лінія клітин із вибірковою експресією p60S6K1, що характеризувалась найвищим міграційним потенціалом продемонструвала і найвищий вміст білка Zo-1. Подальший імунофлюоресцентний аналіз виявив яскраву позитивну реакцію міжклітинних контактів у невеликих групах клітин MCF-7 (p85-/p70-/p60+), тоді як реакція у клітинах дикого типу та інших двох клонів не була настільки яскравою і спостерігалась не між усіма клітинами, а лише деякими. Отримані результати спонукали нас до аналізу шляхів поширення пухлинних клітин у оточуючі тканини. Було з'ясовано, що інвазія оточуючих тканин маленькими групами клітин властива агресивним пухлинам. Натомість, розростання великого новоутворення без втрати міжклітинних контактів не має над агресивного характеру. Отже, зсув експресії ізоформ S6K1 у бік p60S6K1 корелює із складним процесом часткової втрати міжклітинних контактів, проте збереження міцного зв'язку всередині дрібних груп клітин і посиленою їх рухливістю, що в кінцевому результаті забезпечує більш ефективну колонізацію зазначеними клітинами оточуючого простору.

Оскільки кіназа точок фокальної адгезії FAK виступає показником локомоторної активності клітин в цілому, рівень її фосфорилування також оцінювали у клітинах із редагваною експресією ізоформ S6K1. Так, за умови

вибіркового пригнічення p85S6K1 активність кінази падала, як і за даун регуляції усіх трьох ізоформ. Натомість, при вибірковій експресії p60S6K1 активність зазначеної кінази суттєво зростала, як і локомоторний потенціал клітин. При дії кондиціонованого фібробластами середовища на клітини дикого типу, рівень фосфорилування FAK очікувано зріс, як і рухливість клітин. Проте, вплив кондиціонованого фібробластами середовища на клітини MCF-7 (p85-/p70-/p60+) призвів до помітного зниження фосфорилування FAK, в одночас не чинячи ніякого впливу на міграційну здатність клітин. Пояснити такий ефект можна залученням різних, не пов'язаних між собою механізмів регуляції клітинної міграції. Оскільки у ході міграції клітин FAK функціонує скоординовано із бета 1 інтегрином, вміст останнього оцінили у клітинах зі зміненою експресією S6K1 методом Вестерн блот аналізу. Так, даунрегуляція p85S6K1 призводила до зниження вмісту бета 1 інтегрину, як і пригнічення експресії усіх ізоформ, але водночас зсув експресії ізоформ S6K1 у бік p60S6K1 викликав значне підвищення його вмісту. Подібна ситуація спостерігалася для CD44, глікопротеїну, який бере участь у формуванні міжклітинних контактів та регуляції адгезії клітин. Протилежний ефект спостерігався при дослідженні вмісту молекул адгезії включаючи CD326, CD227 та CD66e, їх рівень у клітинах M2 був достовірно нижчим ніж у MCF-7. Муцин 1 MUC1 (CD227) - дуже великий, поліморфний і високо глікозильований муцин. Роль муцинів насамперед це зволоження і змащування епітеліальних шарів, але ці білки також беруть участь як у передачі сигналів факторів росту, так і адгезії клітин. Причому, з одного боку, експресія MUC1 на поверхні клітин пухлини може знижувати клітинну адгезію та сприяти розповсюдженню клітин. Але з іншого боку, MUC1 може зіграти свою роль у ініціації прикріплення клітин пухлини молочної залози до тканини на віддалених ділянках, сприяючи встановленню метастатичних сайтів. За умови даунрегуляції найдовшої ізоформи S6K1 вміст MUC1 не змінюється відносно контролю. Але додаткове пригнічення експресії і p70S6K1 драматичним чином відображається на вмісті MUC1, знижуючи його вміст на 90 %. Пригнічення усіх трьох ізоформ S6K1 також викликало суттєве

падіння вмісту MUC1. Також був проаналізований вміст у зазначених клітинних лініях іншої молекули, залученої до реалізації процесу адгезії, а саме EPCAM – молекули адгезії епітеліальних клітин. Численні дослідження вказують на надекспресію цієї молекули при канцерогенезі низки тканин, особливо при раку молочної залози. У літературі зазначається, що надекспресія EPCAM корелює із проліферацією, міграцією, інвазією пухлинних клітин. Отримані нами результати свідчать про багатофакторність процесу міграції, оскільки найрухливіші клітини MCF-7 (p85-/p70-/p60+) містили найменшу кількість EPCAM, відтак процес локомоції цих клітин залежав від інших молекул, як, наприклад FAK, бета 1 інтегрин, CD44, проте даунрегуляція усіх трьох ізоформ S6K1 викликала статистично достовірне зростання вмісту EPCAM. Зниження рівня експресії спостерігалось і при аналізі вмісту одного із білків родини раково-ембріональних антигенів CD66e, також залучених до пронесу клітинної адгезії. Як і попереднього разу, найрухливішим клітинам MCF-7 (p85-/p70-/p60+) був властивий найнижчий вміст CD66e. Таким чином, розбалансування експресії ізоформ S6K1 призводить до суттєвого зсуву рівнів експресії білків, відповідальних за процеси міграції та адгезії, що значною мірою відображається на локомоторних властивостях пухлинних клітин.

Використані нами клітинні моделі із редагваною експресією S6K1 M1 p85-/p70+/p60+, M2 p85-/p70-/p60+ та M3 p85-/p70-/p60- надали нам унікальну можливість оцінити на просто функцію ізоформ у клітині, а дослідити ефект від зміни балансу досліджуваних ізоформ. Наприклад, найвищий рівень фосфорилування FAK був виявлений у клітинах клону M2 (p85-/p70-/p60+) з селективною експресією p60S6K1, однак ця ізоформа експресується разом з p70S6K1 в клітинах клону M1 (p85-/p70+/p60+), але рівень фосфорилування FAK у M1 клітинах значно нижчий. Більше того, у клітинах дикого типу, які експресують всі досліджувані ізоформи, рівень фосфорилування FAK вищий, ніж у F1, але нижчий, ніж у F2. Отже, якщо p60S6K1 має прямий або опосередкований позитивний вплив на фосфорилування FAK, то можна припустити, що p70S6K1 відмінняє цей ефект,

очевидно, пригнічуючи p70S6K1. Такі самі аналогії можна провести щодо аналізу вмісту білка Zo-1 у клітинах із диференційованою експресією ізоформ S6K1. Окрім того, можна висловити припущення, що зміна балансу ізоформ S6K1 у клітині має стосунок до ініціації епітеліально-мезенхімальної пластичності, як ми спостерігали у клінах лінії із пригніченими p85S6K1, p70S6K1 та селективно експресованою p60S6K1.

Окремо слід зазначити, що, відповідно до наших даних, p60S6K1 відіграє важливу роль у пухлинній прогресії раку молочної залози на моделі культури клітин. З одного боку, селективна експресія цієї ізоформи призводить до надмірної рухливості пухлинних клітин. З іншого боку, селективно експресована ця ізоформа володіє резистентністю як до чинників найближчого стромального оточення пухлини, так і до специфічного інгібування mTOR/S6K. З нашої точки зору, p60S6K1 може бути перспективною мішенню для протипухлинної терапії, особливо у випадках зі зниженою експресією p85S6K1 та p70S6K1.

Щодо методичних висновків нашої роботи, слід вказати, що для оцінки відповіді пухлинних клітин на інгібітори канцерогенезу до модельних систем конче необхідно вводити клітини пухлинного мікрооточення, оскільки вони можуть анулювати ефект лікарського засобу, як це мало місце у нашій роботі. Запропонована нами модель співкультивування пухлинних клітин і фібробластів виявилась зручним і дієвим засобом для аналізу локомоторних властивостей клітин у скретч тесті.

Окрім того, ми показали, що у дослідженнях пов'язаних з mTOR/S6K1 сигналізацією варто уникати використання b-актину як маркера білкового навантаження у імуноблот аналізі, яке є традиційним і поширеним у інших дослідженнях. Оскільки вміст b-актину може суттєво змінюватись при розбалансуванні функціонування mTOR/S6K1 сигнального каскаду у пухлинних клітинах.

Таким чином, як підсумок було запропоновано гіпотезу, яка полягає у тому, що зміна балансу ізоформ S6K1 у пухлинних клітинах призводить до зсуву експресії білків, залучених до процесів міграції та адгезії, що, у свою чергу, значно модулює локомоторні властивості пухлинних клітин. Найбільш виразний ефект спостерігався у клітинах лінії із пригніченою експресією p85S6K1 та p70S6K1 та вибірковою експресією p60S6K1, які до того ж втратили чутливість і до ростових чинників, і до рапаміцину (Рис.4.1).

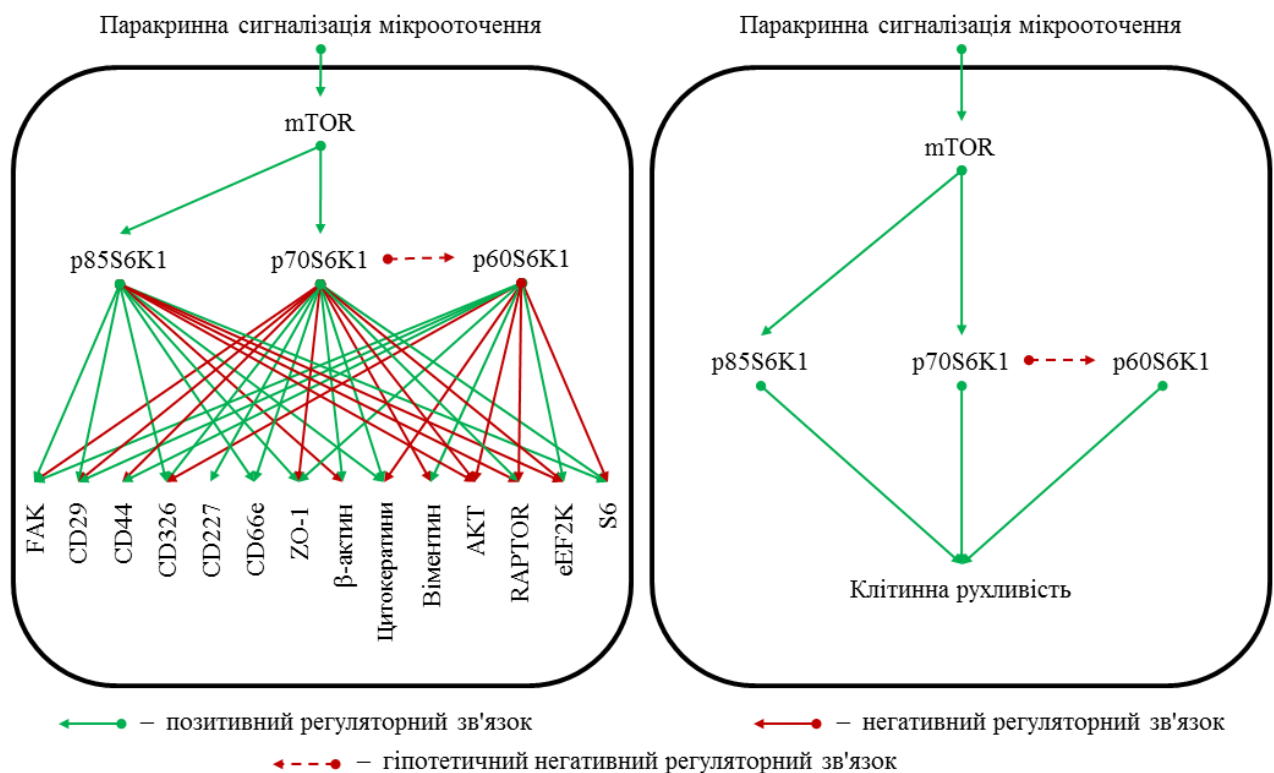


Рис. 4.1. Схематичне зображення встановлених та підтверджених регуляторних зв'язків між ізоформами p85S6K1, p70S6K1 та p60S6K1 кінрази S6K1, паракриною сигналізацією мікрооточення, ланками mTOR-сигнальної мережі та білками залученими до регуляції міграційного циклу

У представленій роботі встановлено низку нових фактів, які розширюють наші уявлення про функціонування у пухлинних клітинах mTOR/S6K сигнального ланцюга, його залучення до передачі сигналу від стромальних клітин до пухлинних. Також у роботі запропоновано низку методичних підходів до оцінки рухливості пухлинних клітин, що, до певної міри, наближають умови експерименту до умов організму.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що mTOR-сигнальна мережа активно 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 кінази mTOR, ізоформ p85S6K1, p70S6K1, p60S6K1 кінази S6K1 та рибосомального білка S6. Паракринний вплив фібробластів здатен нейтралізувати дію рапаміцину на функціональну активність цих білків.
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 демонструють ознаки залучення до формування петель негативного зворотного зв'язку, що ефективно обмежує активність кінази АКТ, однак разом з цим патерни фосфорилування субстратів кінази зазнають 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 зумовлює 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 β -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. Найвиразніші S6K1-асоційовані ефекти було виявлено за умови одночасного функціонування у клітині ізоформи p60S6K1 та нокдауну ізоформи p70S6K1, що свідчить про наявність між ними вираженого антагонізму та критичну важливість регуляції співвідношення функціональних активностей ізоформ для життєдіяльності клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Dobashi Y., et al. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2011. – Vol. 4. – N 5. – P. 476-495.
2. Dowling R., Topisirovic I., et al. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – 1804. – N 3. – P. 433-439.
3. Ungefroren H., Sebens S. et al. Interaction of tumor cells with the microenvironment // *Cell Commun. Signal.* – 2011. – Vol. 9. – N 18.
4. Altomare D., Khaled A. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 19. – N 22. – P. 3748-3762.
5. Zoncu R., Efeyan A., et al. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 12. – N 1. – P. 21-35.
6. Caron E., Ghosh S. A comprehensive map of the mTOR signaling network // *Mol. Syst. Biol.* – 2010. – Vol. 6. – N 453. – P. 1-15.
7. Kaeberlein M. mTOR Inhibition: From Aging to Autism and Beyond // *Scientifica.* – 2013. – ID 849186. – P. 1-17.
8. Husseinzadeh N., Husseinzadeh H. mTOR inhibitors and their clinical application in cervical, endometrial and ovarian cancers: A critical review // *Gynecol. Oncol.* – 2014. – [публікація до друку].
9. Blagosklonny M. Molecular damage in cancer: an argument for mTOR-driven aging // *Aging.* – 2011. – Vol. 3. – N 12. – P. 1130-1141.
10. Xu G., et al. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors // *Int. J. Onc.* – 2004. – Vol. 24.–N 4.–P.893-900.
11. Hardt M., Chantaravisoot N. Activating mutations of TOR (target of rapamycin) // *Genes Cells.* – 2011. – Vol. 16. – N 2. – P. 141-151.
12. Populo H., Lopes J., et al. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13. – N 2. – P. 1886-1918.

13. Betz C., Hall M. Where is mTOR and what is it doing there? // *J. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 203. – N 4. P. 563-574
14. Zhou H., Huang S. The complexes of mammalian target of rapamycin // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2010. – Vol. 11. – N 6. – P. 409-424.
15. Kaizuka T., et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – N 26. – P. 20109-16.
16. Laplante M., Sabatini D. mTOR Signaling // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4. – N 2. – P. 1-3.
17. Ma X., Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol 10. – N 5. – P. 307–318.
18. Laplante M., Sabatini D. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis // *Curr. Biol.* – 2009. – Vol. 19. – N 22. – P. 1046-1052.
19. Duvel K., et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1 // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 39. – N 2. – P. 171-183.
20. Ganley I., et al. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – N 18. – P. 12297-305.
21. Iadevaia V., Huo Y., et al. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – Vol. 40. – N 1. – P. 168-172.
22. Rosario F., Kanai Y., et al. Mammalian target of rapamycin signalling modulates amino acid uptake by regulating transporter cell surface abundance in primary human trophoblast cells // *J. Physiol.* – 2013. – Vol. 591. – N 3. – P. 609-625.
23. Chen C., Liu Y., et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205. – N 10, P. 2397-2408.
24. Zinzalla V., Stracka D. et al. Activation of mTORC2 by association with the ribosome // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – N 5. – P. 757-768.

25. Sarbassov D., et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex // *Science*. – 2005. – Vol. – 307. – N 5712. – P. 1098-1101.
26. García-Martínez J., Alessi D. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1) // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 416. – N 3. – P. 375-385.
27. Jacinto E., et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 6. – N 11. – P. 1122-1128.
28. Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR // *Genes Dev.* – 2004. – Vol. 18. – N 16. – P. 1926-1945.
29. Fenton T., Gout I. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 43. – N 1. – P. 47-59.
30. Robb V., Karbowniczek M., et al. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma // *J. Urol.* – 2007. – Vol. 177. – N 1. – P. 346-352.
31. Garber K. Targeting mTOR: something old, something new // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2009. – Vol. 101. – N 5. – P. 288–290.
32. Loewith R., Jacinto E., et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control // *Mol. Cell*. – 2002. – Vol. 10. – N 3. – P 457-468.
33. Rizzieri D., Feldman E., et al. A phase 2 clinical trial of deforolimus (AP23573, MK-8669), a novel mammalian target of rapamycin inhibitor, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – N 9. – P. 2756-2762.
34. Gaali S., Gopalakrishnan R., et al. The chemical biology of immunophilin ligands // *Curr. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 18. – N 35. – P. 5355-5379.
35. Sarbassov D., Ali S., et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB // *Mol. Cell*. – 2006. – Vol. 22. – N 2. – P. 159-168.
36. Hanahan D, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. 2011. – Vol. 144. – N 5. – P. 646-674.

37. Mehlen P., Puisieux A. Metastasis: a question of life or death // *Nat. Rev. Cancer.* – 2006. – Vol. 6. – N 6. – P. 449-458.
38. Brabek J., Mierke C., et al. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion // *Cell. Commun. Signal.* – 2010. – Vol. 8. – N 22. – P. 1-8.
39. Mitra S., Hanson D., et al. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – N 1. – P. 56-68.
40. Chen J., Wang Q., et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9 // *Hepatol. Res.* – 2009. – Vol. 39. – N 2. – P. 177-186.
41. Zhou H., Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2011. – Vol. 12. – N 1. – P. 30-42.
42. Liu L., et al. Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways // *Oncogene.* – Vol. 25. – N 53. – P. 7029-7040.
43. Berven L., et al. Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration // *Exp. Cell Res.* – 2004. – Vol. 296. – N 2. – P. 183-195.
44. Gomez-Cambronero J. Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol. 550. – N 1-3. – P. 94-100.
45. Zhou H., Wong A. Activation of p70S6K induces expression of matrix metalloproteinase 9 associated with hepatocyte growth factor-mediated invasion in human ovarian cancer cells // *Endocrinology.* – 2006. – Vol. 147. – N 5. – P. 2557-66.
46. Liu L., Parent C. TOR kinase complexes and cell migration // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 194. – N 6. – P. 815-824.
47. Lamouille S., Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway // *J. Cell Biol.* – Vol. 178. – N 3. – P. 437-451.

48. Busch S., Renaud S., et al. mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3 // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315. – N 10. – P.1724-33.
49. Kobayashi S., Kishimoto T., et al. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98. – N 5. – P. 726-733.
50. Liu L., Das S., et al. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion // *Dev. Cell.* – 2010. – Vol. 19. – N 6. – P. 845-857.
51. Sarbassov D., Ali S., et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton // *Curr. Biol.* – 2004. – Vol. 14. – N 14. – P. 1296-1302.
52. Liu L, et al. Rapamycin inhibits F-actin reorganization and phosphorylation of focal adhesion proteins // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – N 37. – P. 4998-5010.
53. Masri J, Bernath A., et al. mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – N 24. – P. 11712-11720.
54. Windoffer R., et al. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia // *J. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 194. – N 5. – P. 669-678.
55. Osmanagic-Myers S., Gregor M., et al. Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration // *J. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 174. – N 4. – P. 557-568.
56. Kim S., Wong P., et al. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth // *Nature.* – 2006. – Vol. 441. – N 7091. – P. 362-365.
57. Golubovskaya V., Kweh F., et al. Focal adhesion kinase and cancer // *Histol. Histopathol.* – 2009. – Vol. 24. – N 4. – P. 503-510.
58. Cohen L., Guan J. Mechanisms of focal adhesion kinase regulation // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2005. – Vol. 5. – N 8. – P. 629–643.

59. Golubovskaya V., Cance W. Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells // *Int. Rev. Cytol.* – 2007. – Vol. 263. – P. 103-153.
60. Zhao X., Guan J. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis // *Adv. Drug Deliv. Rev.* –2011.–Vol.63.–N 8.–P.610-15.
61. Calorini L., Bianchini F. Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions // *Cell Commun. Signal.* – 2010. – Vol. – 8. – N 24.
62. Allinen M., Beroukhi R., et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 6. – N 1. – P. 17-32.
63. Bissell M., Hines W. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression // *Nature Medicine.* –2011. – Vol. 17. – N 3. – P. 320-329.
64. Poczobutt J., et al. Benign mammary epithelial cells enhance the transformed phenotype of human breast cancer cells // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol. 10. – N 373.
65. Trujillo K., Heaphy C., et al. Markers of fibrosis and epithelial to mesenchymal transition demonstrate field cancerization in histologically normal tissue adjacent to breast tumors // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 129. – N 6. – P. 1310-1321.
66. Aboussekhra A. Role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer development and prognosis // *Int. J. Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 55. – N 7-9. – P. 841-9.
67. Polyak K., et al. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer // *Cold. Spr. Harb. Persp. Biol.* –2010.–Vol.2.–N 11.–P.1-14.
68. Orimo A., Gupta P., et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion // *Cell.* – 2005. – Vol. 121. – N 3. – P. 335-348.
69. Camp J., Elloumi F., et al. Interactions with fibroblasts are distinct in basal-like and luminal breast cancers // *Mol. Canc. Res.* – 2011. – Vol. 9. – N 1. – P. 3-13.

70. Santos R., Benvenuti T., et al. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression // *Tumor Biology*. – 2010. – Vol. 32. – N 1. – P. 145-157.
71. McDonald L., LaRue A. Hematopoietic stem cell derived carcinoma-associated fibroblasts: a novel origin // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* –2012. – Vol. 5.–N 9.–P.863-73.
72. Wadlow R., Wittner B., et al. Systems-level modeling of cancer-fibroblast interaction // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – N 9. – ID e6888.
73. Dakhova O., Ozen M., et al. Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – N 12. – P. 3979-3989.
74. Jiang L., Gonda T., et al. Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – N 23. – P. 9900-9908.
75. Casey T., Bond J., et al. Molecular signatures suggest a major role for stromal cells in development of invasive breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – Vol. 114. – N 1. – P. 47-62.
76. Hayashi S., Yamaguchi Y. Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 109. – N 3-5. – P. 201-206.
77. Magzoub M., Jin S., et al. Enhanced macromolecule diffusion deep in tumors after enzymatic digestion of extracellular matrix collagen and its associated proteoglycan decorin // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – N 1. – P. 276-284.
78. Tobar N., Guerrero J., et al. NOX4-dependent ROS production by stromal mammary cells modulates epithelial MCF-7 cell migration // *British Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 103. – N 7. – P. 1040-1047.
79. Padua D., Massague J. Roles of TGF β in metastasis // *Cell Res.* – 2009. – Vol. 19. – N 1. – P. 89-102.
80. Derynck R., Zhang Y. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – N 6958. – P. 577-584.

81. Kojima Y., et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2010. – Vol. 107. –N 46.–P.20009-14.
82. Giampieri S., et al. Intravital imaging illuminates transforming growth factor beta signaling switches during metastasis // *Cancer Res.* – 2010. – Vol.70.–N 9.–P.3435-9.
83. Teicher B., Fricker S. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16. – N 11. – P. 2927-2931.
84. Ao M., Franco O., et al. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – N 9. – P. 4244-4253.
85. Bachelder R., Wendt M., et al. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4 // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62. – N 24. – P. 7203-7206.
86. Jiang B., Liu L. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis // *Adv. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 102. – P. 19-65.
87. Amiri K., Richmond A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma // *Cancer Metastasis* – 2005. – Vol. 24. – N 2. – P. 301-313.
88. Matsumoto K., et al. Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions // *Int. J. Cancer* – 2006. – Vol. 119. – N 3. – P.477-483.
89. Zeng Q., et al. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NF-kappa // *B. J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – N 28. – P. 25203-8.
90. Kwabi-Addo B., et al. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer // *Endocr. Relat. Cancer* – 2004. – Vol. 11. – N 4. – P. 709-724.
91. Fink K., Boratynski J. The role of metalloproteinases in modification of extracellular matrix in invasive tumor growth, metastasis and angiogenesis // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2012. – Vol. 66. – P. 609-628.

92. Furuya F., Hanover J., et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2006. – Vol. 103. – N 6. – P. 1780-1785.
93. Casbas-Hernandez P., Fleming J. Gene expression analysis of in vitro cocultures to study interactions between breast epithelium and stroma // J. Biomed. Biotech. – 2011. – ID. 520987. – P. 1-12.
94. Hebner C., et al. Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures // Annu. Rev. Pathol. – 2008. – Vol. 3. – P. 313-39.
95. Weigelt B., et al. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment // Breast Cancer Res. Treat. – 2010. – Vol. 122. – N 1. – P. 35-43.
96. Cukierman E., Pankov R., et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension // Science. – 2001. – Vol. 294. – N 5547. – P. 1708-12.
97. Mehta G., Hsiao A., et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy // J. Control Release. – 2012. – Vol. 164. – N 2. – P. 192-204.
98. Liang C., et al. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro // Nat. Protoc. – 2007. – Vol. 2. – N 2. – P. 329-33.
99. A.Vogt. Advances in two-dimensional cell migration assay technologies // Eur. Pharm. Rev. – 2010. – Vol. 5. – P. 26-29.
100. Shkarina K., Cherednyk O. et al. In vitro model for study the interaction between tumor and stromal cells //Biopolym.Cell.– 2013.– Vol. 29. – N 1. – P. 79-82.
101. Dussurget O., Roulland-Dussoix D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – N 3. – P. 953-959.
102. Gudkova D., Panasyuk G., et al. PI3K/mTOR-dependent signaling pathway as a possible regulator of processing body assembly // Biopolym. Cell. – 2011. – Vol. 27. – N 5. – P. 369-372.

111. Gotsulyak N., Kosach V., et al. Optimization of cell motility evaluation in scratch assay // *Biopolymers & Cell.* – 2014. – Vol. 30 – N 3. – P. 223-228.
112. Vici P., Mariani L. Emerging Biological Treatments for Uterine Cervical Carcinoma // *J. Cancer.* – 2014. – Vol. 5. – N 2. – P. 86-97.
113. Kirui J., Xie Y., et al. G β γ signaling promotes breast cancer cell migration and invasion // *J. Pharm. Exp. Ther.* – 2010. – Vol. 333. – N 2. – P. 393-403.
114. Young L., Sung J., et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures // *Nat. Protoc.* – 2010. – Vol. 5. – N 5. – P. 929-934.
115. Rozenchan P., Carraro D., et al. Reciprocal changes in gene expression profiles of cocultured breast epithelial cells and primary fibroblasts // *Int. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 125. – N 12. – P. 2767-77.
116. Taylor S., Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – ID 361590. – P. 1-9.
117. Dennis P., Pullen N., et al. The principal rapamycin-sensitive p70(S6K) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases // *Mol. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 16. – N. 11. – P. 6242-51.
118. Fingar D., et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – N 12. P. 1472-87.
119. Salas P. Insoluble γ -tubulin-containing structures are anchored to the apical network of intermediate filaments in polarized CACO-2 epithelial cells // *Cell Biol.* – 1999. – Vol. – 146. – N 3. – P. 645-58.
120. Hulkower K., Herber R. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery // *Pharmaceutics.* – 2011. – Vol. 3. – N 1. – P. 107-124.
121. Гоцуляк Н. Я., Хоруженко А. І. Вплив стромальних елементів на локомоторні властивості пухлинних клітин, керовані mtor-сигнальною мережею // Матер. міжнарод. конфер. «Молодь і поступ біології». – Львів, 2013. – P. 367-368.

122. Khoruzhenko A., Gotsulyak N., et al. Application of image analysis tools to study the locomotor properties of HeLa cells under mTOR signalling inhibition and the presence of stromal cells // Materials of International Scientific Conference "Computational approaches to networks, cells and tissues". – Barcelona, 2013. – P. 34.
123. Lambert CM Ngoka. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers // Proteome Science. – 2008. – Vol. 6. – N 30.
124. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry – 1976. – Vol. 72. – N 1-2). – P. 248-254.
125. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
126. Williams, Donald E. & Reisfeld, Ralph A. DISC Electrophoresis in polyacrylamide gels // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1964. – Vol. 121. – N 2. – P. 372–381.
127. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1979. – Vol. 76. – N 9. – P. 4350-4354.
128. Schnell S., Staines W., Wessendorf M. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue // J Histochem Cytochem. – 1999. – Vol. 47. – N 6. – P. 719-730.