

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**МАЗОВ АНДРІЙ ВАЛЕРІЙОВИЧ**

УДК 577.21:577.22

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**Особливості функціональних зв'язків між ізоформами естрогенового  
рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 (S6K1) в  
клітинах карциноми грудної залози людини MCF-7**

09 Біологія  
091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне  
джерело \_\_\_\_\_ А. В. Мазов

Науковий керівник – Філоненко Валерій Вікторович, доктор біологічних наук,  
академік НАН України, заступник директора ІМБГ НАН України з наукової  
роботи

Київ – 2026

## АНОТАЦІЯ

*Мазов А.В.* **Особливості функціональних зв'язків між ізоформами естрогенового рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 (S6K1) в клітинах карциноми грудної залози людини MCF-7**  
Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню взаємозв'язку між функціональною активністю ізоформ естрогенового рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6K1 в клітинах карциноми грудної залози людини MCF7.

У ході дослідження було створено та охарактеризовано поліклональні антитіла миші проти естрогенового рецептора людини ESR1. Як антиген для імунізації тварин використовували два типи рекомбінантних білків, а саме пептид, що містив N-кінцевий фрагмент (1-120 а.к.) ESR1 і повнорозмірний протеїн ESR1. Обидва антигени були експресовані в клітинах бактерій з таговою послідовністю (6xHis), завдяки якій було проведено афінну очистку антигенів. З'ясувалося, що антиген до N-кінцевого фрагмента ESR1 не є імуногенним, натомість імунізація повнорозмірною формою ESR1 дозволила отримати поліклональні антитіла, що ефективно працювали в реакції імунопреципітації.

З використанням створених анти-ESR1 поліклональних антитіл та антитіл проти С-кінцевої ділянки кінази рибосомного білка S6 - S6K1 і з застосуванням методу копреципітації протеїнових комплексів проаналізовано можливість утворення мультиензимного комплексу. Згідно з отриманими даними, такого комплексу не було виявлено.

Для дослідження ролі ізоформ ESR1 в регуляції функціональної активності S6K1 на основі клітин карциноми грудної залози MCF7 з

використанням системи геномного редагування CRISPR/Cas9 було створено сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ ESR1. Для цієї мети було розроблено гайдові РНК, спрямовані на ділянку ДНК першого екзону гена ESR1, які було клоновано в векторну систему pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, який кодує ендонуклеазу Cas9. З використанням селективного антибіотика зеоцину отримано дві сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією ESR1. Для однієї з субліній (MCF7/9) встановлено повне пригнічення експресії головної р66/ESR1 ізоформи ESR1 і часткове збереження експресії мінорної ізоформи р36/ESR1. Для іншої сублінії (MCF7/12) встановлено приблизно 50% пригнічення експресії р66/ESR1 і кількарразове підвищення експресії мінорної р46 ізоформи ESR1, що цілком може бути компенсаторним механізмом у відповідь на втрату повнорозмірної форми. Встановлено, що причина підвищення вмісту р46-ізоформи є підвищення рівня транскрипції мРНК ESR1, про що свідчать дані ПЛР-аналізу в реальному часі.

Завдяки отриманій сублінії клітин MCF-7/9 з повністю пригніченою експресією головної р66/ESR1 ізоформи було перевірено гіпотезу про ключову роль пригнічення експресії ESR1 в ініціації епітеліально-мезенхімного переходу в клітинах MCF-7 виявлену раніше, що ініціюється змінами експресії ізоформ S6K1. Однак аналіз експресії ключових маркерів EMT з використанням ПЛР в реальному часі, а саме генів *CDH1*, *CDH2* та *Vim* в сублінії MCF-7/9, не виявив ознак EMT. Натомість у разі повного пригнічення експресії ESR1 було виявлено зниження активності S6K1, визначене за пригніченням фосфорилування ключового для активації сайту – Ser 389, що за даними вестерн-блоту пов'язано з загальним зменшенням експресії S6K1 на рівні протеїну. ПЛР-аналіз в реальному часі дозволив встановити, що причиною зменшення вмісту S6K1 на рівні протеїну є пригнічення експресії мРНК S6K1. Отримані дані свідчать, що ESR1 є транскрипційним активатором

експресії гена S6K1 і, відповідно, пригнічення експресії ESR1 корелює з пригніченням експресії S6K1 і гальмуванням S6K1-залежного сигналювання.

Подальші дослідження показали, що зниження експресії S6K1 та його загального фосфорилювання у положенні Тре389 у сублінії MCF-7/9 негативно впливає на проліферацію клітин. Водночас зміни в експресії ESR1 негативно впливали на міграцію обох клонів, зі статистично значущою різницею між клітинами MCF-7wt та клітинами сублінії MCF-7/9, що свідчить про причетність p66/ESR1 до цього процесу і, напевно, відбувається завдяки пригніченню S6K1-залежного сигналювання.

Вперше досліджено роль окремих ізоформ S6K1 в регуляції активності ESR1 шляхом регуляції фосфорилювання залишків Сер167 та Сер118. Для цього було застосовано раніше створені модельні сублінії клітин MCF-7 з повним пригніченням експресії всіх ізоформ S6K1 і подальшим відновленням експресії окремо кожної з ізоформ. Зазначено, що експресія p70 та p60 ізоформ S6K1 призводить до суттєвого підвищення рівня фосфорилювання ESR1 за Сер167, натомість експресія ізоформи p85 не має впливу. Аналіз фосфорилювання ESR1 за Сер118 виявив, що, навпаки, експресія p85 сприяла його підвищенню, а експресія p60 чи p70 не мала впливу.

Створено мутантні субліній клітин MCF7 з мімікрією сайту фосфорилювання шляхом заміни Сер 167 на аспарагінову кислоту та блокуванням сайту фосфорилювання шляхом заміни Сер 167 на аланін. Вперше встановлено, що фосфорилювання Сер 167 не має регуляторної ролі в активації S6K1.

Вперше визначено особливості експресії ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів. Виявлено підвищення експресії ключових p70 та p85 ізоформ S6K1 в пухлинах люмінальних А- та Б-типів. Натомість в пухлинах потрійно-негативного типу виявлено їхнє пригнічення.

Вперше в пухлинах раку грудної залози всіх молекулярних субтипів виявлено пригнічення експресії мРНК-ізоформи p60S6K1 порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.

Вперше досліджено кореляцію експресії ESR1 та ізоформ S6K1 в пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів і виявлено спільну динаміку змін експресії в усіх досліджуваних типах пухлин.

З огляду на те, що естрогеновий рецептор відіграє надзвичайно важливу роль в патогенезі раку грудної залози і є однією з ключових мішеней в протипухлинній терапії визначення функціональних зв'язків ESR1 з S6K1 відкриває нові можливості для пошуку нових ланок впливу на активність/експресію ESR1 і, відповідно, ESR1-залежних подій в ході терапії раку грудної залози. Крім того, це також є надзвичайно важливим для розуміння молекулярних механізмів набутої резистентності до естрогенової терапії, що пов'язують з активацією mTOR/S6K1-сигнального каскаду і безпосередньо з активацією S6K1. З'ясування особливостей функціональних зв'язків ESR1 з ізоформами S6K1 в цьому контексті є надзвичайно важливим, адже ефективною мішенню для терапії можуть бути не всі ізоформи, а, до прикладу, лише p70 та p60, для яких саме і було показано можливість фосфорилування ESR1 за Ser167. З огляду на відсутність остаточної визначеності ролі сайтів фосфорилування Ser 167 та Ser118 в регуляції активності ESR1 в тому числі і у зв'язку з роллю в прогресії пухлин грудної залози ізоформа p85 також може бути терапевтичною мішенню, адже вона сприяє підвищенню іншого сайту фосфорилування - Ser118 критичного для зв'язування з ДНК і критичного для активності як фактора транскрипції. Низка створених моделей клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ ESR1 буде надалі використовуватися для поглибленого аналізу молекулярних механізмів регуляції ESR1 в клітинах карциноми грудної залози людини.

**Ключові слова:** естрогеновий рецептор, CRISPR/Cas9, кіназа рибосомного білка S6, рак грудної залози, внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, пухлинні тканини, канцерогенез, метастазування, міграція, епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП), клітинна лінія MCF-7, ЕрСAM, онкогени.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у Scopus

1. *A.V. Mazov, I. V. Kroupskaya.* Generation and characterization of polyclonal antibodies specific to human estrogen receptor ER $\alpha$ . *Biotechnologia Acta* T. 17, No. 3, 2024, P. 59-65. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення відділення та очищення білка, обробка результатів, написання статті та підготовка її до друку.*
2. *L. O. Savins'ka, S. A. Kvitchenko, S.S. Palchevskyi, I. V. Kroups'kaya, A. V. Mazov, O. M. Garifulin, V. V. Filonenko.* Generation of the MCF-7 cell sublines with CRIS PR/Cas9 mediated disruption of estrogen receptor alfa (ESR 1) expression. *Ukr. Biochem. J.*, (2024); 96(6):29-35. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису*
3. *L.O. Savinska, S.A. Kvitchenko, M.Ye. Martsyniuk, I.V. Kroupskaya, A.P.Pogribna, A.V. Mazov, O.M. Garifulin, V.V Filonenko.* ESR1 Gene Editing and its Impact on S6K1 Signaling and Cell Behavior. *Biopolymers and Cell.* 2025; 41(3):181. *Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у розробленні схеми досліджень, постановка та виконання експериментів, написання рукопису.*

## Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. *A. V. Mazov* Differential effects of S6K1 isoforms on EMT-related gene expression in MCF-7 cells. Матеріали XVI річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2021). *Biopolymers and Cell*. 2021. Vol. 37. N3.
2. *A.V. Mazov, I.V. Kroupskaya, V.V. Filonenko*. Expression features of S6K1 isoforms at the mRNA level in human breast tumors of different molecular subtypes. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.
3. *A.V.Mazov, L.O., Savinska, S.S., Palchevskii, S.A., Kvitchenko, V.V., Filonenko*. The role of S6K1 isoforms in regulating ESR1 phosphorylation at Ser118 and Ser167 sites crucial for its activity, and the reciprocal effect on S6K1 activity. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.

## SUMMARY

*Mazov A.V.* **Functional relationships between estrogen receptor ESR1 isoforms and ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) isoforms in human MCF-7 breast carcinoma cells**

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

This dissertation investigates the functional relationships between estrogen receptor  $\alpha$  (ESR1) isoforms and ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) isoforms in human MCF-7 breast carcinoma cells.

In the course of the study, mouse polyclonal antibodies against the human estrogen receptor ESR1 were generated and characterized. Two types of recombinant proteins were used as antigens for animal immunization: a peptide containing the N-terminal fragment (1-120 aa) of ESR1 and the full-length ESR1 protein. Both

antigens were expressed in bacterial cells with a 6xHis-tag sequence, facilitating affinity purification. It was found that the antigen for the N-terminal fragment of ESR1 was not immunogenic; however, immunization with the full-length form of ESR1 yielded polyclonal antibodies suitable for immunoprecipitation assays.

Using the newly generated anti-ESR1 polyclonal antibodies and antibodies against the C-terminal region of S6K1, the potential formation of a multienzyme complex was analyzed via co-immunoprecipitation. According to the data obtained, no such complex was detected.

To investigate the role of ESR1 isoforms in the regulation of S6K1 functional activity, MCF7 cell sublines with differential expression of ESR1 isoforms were created using the CRISPR/Cas9 genome editing system. For this purpose, guide RNAs targeting the DNA region of the first exon of the *ESR1* gene were designed and cloned into the pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 vector system, which encodes the Cas9 endonuclease. Using the selective antibiotic Zeocin, two MCF7 sublines with differential ESR1 expression were obtained. In one subline (MCF7/9), complete loss of the major p66/ESR1 isoform and partial preservation of the minor p36/ESR1 isoform were established. In the other subline (MCF7/12), approximately 50% suppression of p66/ESR1 and a several-fold increase in expression of the minor p46/ESR1 isoform were observed, which may serve as a compensatory mechanism in response to the loss of the full-length form. Real-time PCR analysis indicated that the increase in p46 isoform levels resulted from upregulated *ESR1* mRNA transcription.

Utilizing the MCF7/9 subline with completely suppressed p66/ESR1 expression, the hypothesis regarding the key role of ESR1 suppression in initiating the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in MCF7 cells—previously linked to changes in S6K1 isoform expression—was tested. However, real-time PCR analysis of key EMT markers (*CDH1*, *CDH2*, and *Vim*) in the MCF7/9 subline showed no signs of EMT. Instead, complete suppression of ESR1 expression led to a decrease

in S6K1 activity, evidenced by the inhibition of phosphorylation at the key activation site, Ser389. Western blot analysis linked this to an overall reduction in S6K1 protein expression. Real-time PCR established that this reduction in S6K1 protein levels was caused by the suppression of *S6K1* mRNA expression. These findings suggest that ESR1 acts as a transcriptional activator of the *S6K1* gene; consequently, ESR1 suppression correlates with decreased S6K1 expression and the inhibition of S6K1-dependent signaling.

Further studies demonstrated that the reduction in S6K1 expression and its total phosphorylation at Thr389 in the MCF7/9 subline negatively affected cell proliferation. Simultaneously, changes in ESR1 expression reduced the migratory capacity of both clones, with a statistically significant difference between wild-type MCF7 cells and the MCF7/9 subline. This suggests the involvement of p66/ESR1 in this process, likely mediated by the inhibition of S6K1-dependent signaling.

For the first time, the role of individual S6K1 isoforms in regulating ESR1 activity through the phosphorylation of Ser167 and Ser118 residues was investigated. Previously generated MCF7 model sublines with total suppression of all S6K1 isoforms and subsequent restoration of individual isoforms were utilized. It was noted that the expression of p70 and p60 S6K1 isoforms leads to a significant increase in ESR1 phosphorylation at Ser167, whereas p85 expression has no effect. Conversely, phosphorylation analysis of ESR1 at Ser118 revealed that p85 expression promoted its increase, while p60 or p70 expression had no impact. Mutant MCF7 sublines were created with phosphomimetic (Ser167 replaced by aspartic acid) and phospho-blocking (Ser167 replaced by alanine) sites. For the first time, it was demonstrated that phosphorylation of Ser167 has no regulatory impact on the activity of S6K1.

The expression patterns of S6K1 isoforms in human breast tumors of various molecular subtypes were determined for the first time. An increase in the expression of key p70 and p85 S6K1 isoforms was found in luminal A and B type tumors,

whereas suppression was observed in triple-negative tumors. Furthermore, suppression of the p60S6K1 mRNA isoform was detected across all molecular subtypes of breast cancer compared to adjacent non-tumor breast tissue.

The correlation between ESR1 expression and S6K1 isoforms in human breast tumors of different molecular subtypes was investigated for the first time, revealing common expression dynamics across all studied tumor types.

Given that the estrogen receptor plays a crucial role in the pathogenesis of breast cancer and is a key target in antitumor therapy, identifying the functional links between ESR1 and S6K1 opens new avenues for therapeutic intervention. Furthermore, this is vital for understanding the molecular mechanisms of acquired resistance to estrogen therapy, which is associated with the activation of the mTOR/S6K1 signaling cascade. A detailed understanding of the functional relationships between ESR1 and S6K1 isoforms is essential, since individual isoforms may differ in their potential as therapeutic targets; for example, only p70 and p60 showed the ability to phosphorylate ESR1 at Ser167. Given the ongoing uncertainty regarding the roles of Ser167 and Ser118 phosphorylation sites in ESR1 regulation and breast cancer progression, the p85 isoform may also be a therapeutic target, as it promotes phosphorylation at Ser118 site critical for DNA binding and transcriptional activity.

The series of generated MCF7 cell models with differential expression of ESR1 isoforms will be used for further in-depth analysis of the molecular mechanisms of ESR1 regulation in human breast carcinoma cells.

**Keywords:** Estrogen receptor, CRISPR/Cas9, ribosomal protein S6 kinase, breast cancer, intracellular signaling pathways, tumor tissues, carcinogenesis, metastasis, migration, epithelial-mesenchymal transition (EMT), MCF-7 cell line, EpCAM, oncogenes.

## List of publications

### Articles:

1. **A.V. Mazov**, *I. V. Kroupskaya*. Generation and characterization of polyclonal antibodies specific to human estrogen receptor ER $\alpha$ . *Biotechnologia Acta T.* 17, No. 3, 2024, P. 59-65.
2. *L. O. Savins'ka, S. A. Kvitchenko, S.S. Palchevskiy, I. V. Kroups'kaya, A. V. Mazov, O. M. Garifulin, V. V. Filonenko*. Generation of the MCF-7 cell sublines with CRIS PR/Cas9 mediated disruption of estrogen receptor alfa (ESR 1) expression. *Ukr. Biochem. J.*, (2024); 96(6):29-35.
3. *L.O. Savinska, S.A. Kvitchenko, M.Ye. Martsynyuk, I.V. Kroupskaya, A.P.Pogribna, A.V. Mazov, O.M. Garifulin, V.V Filonenko*. ESR1 Gene Editing and its Impact on S6K1 Signaling and Cell Behavior. *Biopolymers and Cell.* 2025; 41(3):181.

### Conference abstracts:

1. **A. V. Mazov** Differential effects of S6K1 isoforms on EMT-related gene expression in MCF-7 cells. Proceedings of the XVI Annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics (Kyiv, 2021). *Biopolymers and Cell.* 2021. Vol. 37. N3.
2. **A.V. Mazov**, *I.V. Kroupskaya, V.V Filonenko*. Expression features of S6K1 isoforms at the mRNA level in human breast tumors of different molecular subtypes. Proceedings of the XX Annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics (Kyiv, 2026). Abstract book.
3. **A.V.Mazov**, *L.O., Savinska, S.S., Palchevskii, S.A., Kvitchenko, V.V., Filonenko*. The role of S6K1 isoforms in regulating ESR1 phosphorylation at Ser118 and Ser167 sites crucial for its activity, and the reciprocal effect on S6K1 activity. Proceedings of the XX Annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics (Kyiv, 2026). Abstract book.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	26
1.1. Рак грудної залози та гормонозалежна біологія: сучасний стан проблеми....	26
1.2. Естрогеновий рецептор (ESR1): доменна організація, ізоформи та функціональна спеціалізація .....	28
1.3. mTOR/S6K1 сигнальний каскад у раку грудної залози: загальні принципи та клінічні кореляції.....	32
1.4. Ізоформи S6K1: структурні відмінності, локалізація та можливі ролі у клітинах РГЗ.....	33
1.5. Регуляторний зв'язок S6K1 та ESR1: фосфорилування ESR1 та ізоформно-залежні закономірності формування гормональної резистентності.....	36
1.6. S6K1 та ендокринна резистентність при ER-позитивному РГЗ.....	37
1.7. Ізоформи S6K1, реорганізація цитоскелета, міграція та епітелійно-мезенхімальний перехід у клітинах РГЗ.....	40
1.8. Гіпотези ізоформ-специфічної взаємодії S6K1 та ESR1 і наслідки для фенотипу клітин РГЗ.....	43
1.9. Модельні сублінії клітин карциноми грудної залози MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1. ....	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
2.1. Матеріали та обладнання.....	49
2.2. Дизайн олігонуклеотидів.....	50
2.3. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній ссавців.....	50
2.4 Синтез кДНК .....	51
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	51

2.6. Розрізання ДНК ендонуклеазами рестрикції.....	52
2.7. Електрофорез та очищення фрагментів ДНК з гелю.....	52
2.8. Лігування ДНК фрагментів .....	53
2.9. Виділення плазмідної ДНК із клітин <i>E. coli</i> .....	54
2.10. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція.....	54
2.11. Клонування gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9 опосередкованого редагування ESR1 гена.....	55
2.12. Методи роботи з клітинами <i>Escherichia coli</i> .....	56
2.12.1. Поживні середовища для росту клітин.....	57
2.12.2. Отримання компетентних клітин <i>E. coli</i> . .....	57
2.12.3. Трансформація бактеріальних клітин плазмідними ДНК.....	57
2.12.4. Нарощування клітин <i>E. coli</i> для препаративного виділення рекомбінантного білка. ....	58
2.13. Приготування лізатів бактеріальних клітин за нативних умов.....	58
2.14. Очистка His-таг злитих білків на Ni-NTA агарозі.....	59
2.15. Визначення концентрації білка за Бредфордом.....	59
2.16. Електрофорез білків в ПААГ .....	60
2.17. Вестерн-блот аналіз.....	60
2.18. Статистичний аналіз даних.....	60
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Аналіз можливості формування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1</b>	
3.1.1 Отримання та характеристика поліклональних антитіл, до людського ESR1.....	62
3.1.2. Створення векторної конструкції на основі плазмиди pET28a, що містить кДНК для N-кінцевої ділянки та повнорозмірної форми ESR1 .....	63
3.1.3. Експресія рекомбінантних протеїнів N-кінцевої ділянки та повнорозмірної форми естрогенового рецептора ESR1 в клітинах <i>Escherichia coli</i> .....	64

3.1.4. Аналіз можливості існування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1.....	72
3.2 Створення та характеристика клітинних моделей MCF-7 із диференційною експресією ESR1 з використанням siRNA-інтерференції та CRISPR/Cas9-системи редагування геному. ....	74
3.2.1. Створення субліній клітин MCF-7 методом CRISPR/Cas9 редагування гена естрогенового рецептора альфа (ESR1). ....	74.
3.2.1.1. Генерація субліній клітин MCF-7 із порушеною експресією ESR1 за допомогою системи CRISPR/Cas9.....	74
3.3. Вплив редагування гена <i>ESR1</i> на S6K1-залежне сигналювання в клітинах MCF7.....	83
3.4 Вплив фосфорилювання ESR1 за Сер 167 на S6K1-залежне сигналювання в клітинах MCF7.....	94
3.5. Вплив експресії ізоформ S6K1 експресію та функціональний стан ESR1.....	98
3.6. Аналіз експресії мРНК-ізоформ S6K1-p85/70S6K1 та p60S6K1 у пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів. ....	104
ВИСНОВКИ.....	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	121
ДОДАТОК А .....	129

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2-ME - 2-Mercaptoethanol

BSA - Bovine Serum Albumin

Co-IP - Co-Immunoprecipitation

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DTT - Dithiothreitol

ECL - Electrogenenerated Chemiluminescence

ER - Estrogen Receptor

HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

IP - Immunoprecipitation

IPTG - Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

LB - Lysogeny Broth

OD - Optical Density

PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS - Phosphate Buffered Saline

PBST - Phosphate Buffered Saline with Tween-20

PR - Progesterone Receptor

PVDF - Polyvinylidene Fluoride

RPMI - Roswell Park Memorial Institute (Medium)

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

TBS - Tris-Buffered Saline

TB - Terrific Broth

TBST - Tris-Buffered Saline with Tween-20

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

WB – Вестерн-блот-аналіз

РГЗ - рак грудної залози

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Рак грудної залози (РГЗ) у жінок є основною причиною смертності, спричиненої онкологічними захворюваннями [1]. Найпоширеніша та загально визнана класифікація пухлин базується на визначенні експресії в них рецепторів естрогену (ESR1), прогестерону (PR) і епідермального фактора росту (HER2) [2]. Пухлини люмінальних субтипів, що є ESR1 позитивними мають більш сприятливий прогноз перебігу захворювання і відповідь на протипухлинну терапію порівняно з ESR1<sup>-</sup> і особливо потрійно негативними субтипами, що є найбільш агресивними і характеризуються високим рівнем метастазування і, відповідно, низьким рівнем виживаності пацієнтів [3].

ESR1 функціонує як ліганд-залежний фактор транскрипції. Зв'язування з ним естрогенів у цитоплазмі клітини індукують утворення гомодимерного комплексу, транслокацію в ядро та ініціацію транскрипції генів, що містять елемент відповіді на естроген (ER), у промоторних ділянках [4]. Інша активність ESR1 пов'язана з його розташуванням на плазматичній мембрані де він виконує функцію модулятора сигнальних каскадів в тому числі і mTOR/Akt/S6K-залежного каскаду, що виконує в клітині функцію головного інтегратора позаклітинних стимулів, що контролює головні клітинні функції серед яких проліферація, клітинний ріст, виживання, міграція, метаболічні процеси і тому є одним із ключових в регуляції прогресії пухлин [5].

Переважає кількість злоякісних пухлин грудної залози людини (біля 70%) є ESR1<sup>+</sup>, що вказує на залежність пухлин від естрогенів і активності ESR1 [3]. З цієї причини стандартною для застосування в клініці є антиестрогенова терапія, суть якої полягає у використанні антагоністів естрогену (тамоксифен), негативних регуляторів експресії ER (фульвістрант) та блокаторів синтезу естрогену (інгібітори ароматази). Однак відповідь на таку терапію коливається в межах 35–75%, а в багатьох випадках

спостерігається розвиток резистентності до терапії [6,7]. Механізм такої резистентності достеменно не відомий. Однак вважається, що однією з причин може бути ліганд-незалежна активація головної p66-ізоформи ESR1 та пригнічення її експресії, а також активація онкогенної p36-ізоформи ESR1 за невідомим механізмом [8].

Відомо, що саме mTOR/S6K1 бере участь в індукції незалежної від естрогену активації ESR1 шляхом S6K1-опосередкованого фосфорилування ESR1 за Ser167, що ініціює його димеризацію і транслокацію до ядра [9,10]. Крім того, є підстави вважати, що остаточна активація рецептора в ядрі теж супроводжується mTOR-опосередкованим фосфорилуванням ESR1 за Ser104/106. У свою чергу, у відповідь на естроген, ESR1 також позитивно регулює експресію S6K1 завдяки активації транскрипційного фактора GATA. Таким чином, mTOR/S6K1-залежний каскад може відігравати важливу роль в розвитку резистентності до антиестрогенової терапії, а ESR1 може модулювати S6K1-залежні процеси в клітині, в тому числі залучені до канцерогенеза. Загалом вважається, що гіперактивування mTOR/S6K1 сигнального шляху є важливим для канцерогенеза РГЗ. Надекспресію гена S6K1 часто спостерігають у клінічних зразках РГЗ [11], що корелює з поганим прогнозом у пацієнтів. З іншого боку, показано, що інгібування S6K1 у клітинах тричі негативного РГЗ призводить до суттєвого зниження рівнів міграції та інвазії цих клітин, вказуючи на важливу роль S6K1 у функціонуванні клітин метастатичного РГЗ. Крім того, виявлено, що активація S6K1 індукує посилення малігнізації епітеліальних клітин грудної залози, негативних за естрогеновим рецептором ESR1.

Слід зазначити, що резистентність пухлин до ендокринної терапії може бути обумовлена і критичним зменшенням вмісту ESR1 в клітинах пухлини, що, в тому числі, сприяє набуттю пухлиною більш агресивного фенотипу з ознаками метастазування, характерними для потрійно негативного субтипу

пухлин. Це може відбуватися як завдяки зменшенню стабільності ESR1 на рівні білка та мРНК, так і пригніченню експресії гена *ESR1* за поки невідомими механізмами. Таким чином, з одного боку, ESR1 є ключовою мішенню в терапії ESR1-позитивних пухлин, але з іншого, його низький рівень експресії є характерним для найбільш агресивного субтипу пухлин з ознаками метастазування та резистентності до більшості хіміотерапій. Експериментальне siРНК-опосередковане пригнічення експресії *ESR1* в клітинах карциноми грудної залози дійсно призводить до ініціації епітеліально-мезенхімного переходу (EMT), що на рівні пухлини є ознакою метастазування. Нещодавно у відділі сигнальних систем клітини ІМБГ НАНУ було ідентифіковано нову р60 ізоформу S6K1, що суттєво відрізняється за регуляцією активності від відомих р70 та р85 ізоформ, оскільки нечутлива до дії mTOR-інгібіторів. Крім того, отримано переконливі дані щодо причетності ізоформ S6K1 до регуляції експресії ESR в клітинах РГЗ. За нашими даними, вибіркоче пригнічення експресії ізоформ кінази супроводжується повним блокуванням експресії ESR1 і ініціацією EMT, притаманною трічі негативним субтипам РГЗ. Отже, з'ясування взаємозв'язку між регуляцією активності та експресії ізоформ ESR1 та S6K1 сприятиме поглибленню розуміння їхніх функцій в клітинах карциноми грудної залози з урахуванням молекулярних субтипів пухлин, а отже і розробці в подальшому нових стратегій лікування як ESR1<sup>+</sup>, так і ESR1<sup>-</sup> субтипів РГЗ.

**Мета роботи:** Дослідити взаємозв'язок між активністю ізоформ естрогенового рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6K1 в клітинах карциноми грудної залози людини MCF7.

Для досягнення мети було визначено такі завдання:

1. Створити та охарактеризувати поліклональні антитіла проти естрогенового рецептора людини ESR1.

2. Проаналізувати можливість утворення протеїнового комплексу між ESR1 та ізоформами S6K1 в клітинах MCF-7.
3. З застосуванням CRISPR/Cas9-системи редагування геному створити та охарактеризувати сублінії клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ ESR1.
4. З використанням модельних субліній клітин MCF-7 з диференційною експресією ESR1 дослідити їхній вплив на експресію маркерів епітеліально-мезенхимного переходу (EMT).
5. Дослідити вплив пригнічення експресії ESR1 в сублініях клітин MCF-7 на їхню проліферацію та міграцію.
6. З'ясувати роль експресії ESR1 в регуляції функціональної активності S6K1 за фосфорилюванням ключових сайтів фосфорилювання кінази та експресією мРНК.
7. Створити сублінії клітин MCF-7, що експресують мутантні за Ser167 форми ESR1 з мімікрією фосфорилювання та його блокуванням та з'ясувати роль фосфорилювання ESR1 за Ser167 на S6K1-залежне сигналювання.
8. З використанням субліній клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1 дослідити їхню роль в регуляції функціональної активності ESR1 за рівнем експресії та фосфорилюванням ключових для активності сайтів фосфорилювання Ser 118 та Ser 167.
9. Проаналізувати кореляційні зв'язки між експресією ESR1 та ізоформ S6K1 в пухлинах раку грудної залози жінок різних молекулярних субтипів.

**Об'єкт дослідження:** особливості функціональної активності естрогенового рецептора ESR1 та ізоформ кінази рибосомного білка S6 в пухлинах грудної залози жінок.

**Предмет дослідження:** функціональні зв'язки між ізоформами естрогенового рецептора ESR1 та ізоформами кінази рибосомного білка S6 – S6K1 в клітинах MCF-7.

**Методи дослідження.** Для вирішення поставлених завдань було використано методи культивування бактеріальних та еукаріотичних клітин, клонування ДНК, експресії та афінної очистки рекомбінантних протеїнів, визначення рівня проліферації та рухливості еукаріотичних клітин, світлової мікроскопії, створення стабільних ліній з CRISPR/Cas9 редагуванням геному, вестерн-блот аналізу, ПЛР аналізу, ПЛР аналізу в реальному часі, біоінформатичні і статистичні методи обробки результатів

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше досліджено вплив експресії естрогенового рецептора ESR1 на стан S6K1-залежного сигналювання з використанням створених з використанням системи редагування геному CRISPR/Cas9 субліній клітин карциноми грудної залози людини MCF-7 з диференційною експресією ESR1. Встановлено, що пригнічення експресії ESR1 негативно впливає на експресію кінази рибосомного білка S6K1 і, як наслідок, на її загальну активність, що, своєю чергою, призводить до пригнічення проліферативної та локомоторної активності клітин MCF-7.

Вперше досліджено роль окремих ізоформ S6K1 в регуляції активності ESR1 шляхом регуляції статусу його фосфорилювання за Сер 118 та Сер 167. Встановлено, що експресія p70 та p60 ізоформ S6K1 призводить до суттєвого підвищення рівня фосфорилювання за Сер167, натомість експресія ізоформи p85 не впливає на цей показник. Навпаки, для Сер 118 показано, що його

фосфорилування підвищується за умови експресії виключно p85-ізоформи S6K1.

З використанням створених мутантних субліній клітин MCF-7 з мімікрією сайту фосфорилування шляхом заміни Сер 167 на аспарагінову кислоту та блокуванням сайту фосфорилування шляхом заміни Сер 167 на аланін встановлено, що фосфорилування Сер 167 не залучене до регулювання активності S6K1.

Вперше визначено особливості експресії ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини. Виявлено пригнічення експресії ключових ізоформ S6K1 в пухлинах потрійно-негативного типу поряд з підвищенням в пухлинах люмінального А- та Б-типів.

Вперше виявлено пригнічення експресії мРНК-ізоформи p60S6K1 в пухлинах раку грудної залози всіх молекулярних субтипів порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.

Вперше досліджено кореляцію експресії ESR1 та ізоформ S6K1 в пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів і виявлено спільну динаміку експресії в усіх досліджуваних типах пухлин.

**Практичне значення отриманих результатів.** Естрогеновий рецептор відіграє надзвичайно важливу роль в патогенезі раку грудної залози жінок, і саме тому близько 70% випадків раку потребують антиестрогенової терапії, спрямованої на пригнічення активності ESR1. Визначення функціональних зв'язків ESR1 з S6K1 відкриває нові можливості для пошуку нових ланок впливу на ESR1 в ході терапії раку грудної залози. Крім того, це також є надзвичайно важливим для розуміння молекулярних механізмів набуті резистентності до естрогенової терапії, що пов'язують з активацією mTOR/S6K1-сигнального каскаду і безпосередньо з активацією S6K1. З'ясування особливостей функціональних зв'язків ESR1 з ізоформами S6K1 у цьому контексті є надзвичайно важливим, адже ефективною мішенню для

терапії можуть бути не всі ізоформи, а, до прикладу, лише p70 та p60, для яких саме і було показано можливість фосфорилювання ESR1 за Ser167. З огляду на відсутність остаточної визначеності ролі сайтів фосфорилювання Ser 167 та Ser118 в регуляції активності ESR1 в тому числі і у зв'язку з роллю в прогресії пухлин грудної залози ізоформа p85 також може бути терапевтичною мішенню, адже вона сприяє підвищенню іншого сайту фосфорилювання - Ser118 критичного для зв'язування ESR1 з ДНК і критичного для активності як фактора транскрипції.

Низка створених моделей клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ ESR1 буде надалі використовуватися для поглибленого аналізу молекулярних механізмів регуляції ESR1 в клітинах карциноми грудної залози людини.

**Особистий внесок.** Викладені в дисертації результати були отримані автором самостійно або за його безпосередньої участі в проведенні експериментів та обробці даних. Дисертант особисто здійснив аналіз та узагальнення літературних джерел, що стосуються теми дослідження.

Планування дослідження та обговорення отриманих даних було проведено за участі наукового керівника, завідувача відділу сигнальних систем клітини, д.б.н., проф., академіка НАНУ В.В. Філоненка. Результати висвітлено у спільних публікаціях.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетних тематик: «Особливості структурно-функціональної організація mTOR/S6K-залежного сигнального каскаду в нормальних та злоякісних клітинах: множинність сплайсових ізоформ mTOR та S6K кіназ» (2015-2020, 0110U000692); «Особливості

функціональної активності ізоформ кінази рибосомного білка S6 (S6K1) та молекулярних механізмів її регуляції в нормі та патології» (2021-2025, 0121U109973).

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були висвітлені на наступних конференціях: XIV ІМБіГ Всеукраїнська конференція молодих вчених (Київ, 2020); XVI річна конференція молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2021); XX Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 3 статті, з них 2 – у періодичних фахових виданнях України категорії А і 1 у періодичних фахових виданнях України категорії Б, а також 3 тез доповідей у наукових збірниках вищезазначених конференцій.

**Обсяг і структура роботи.** Дисертація складається зі вступу, розділу огляду літератури (містить 9 підпунктів), розділу матеріалів та методів (включає 18 підпунктів), розділу результатів та обговорення (складається з 6 підпунктів), висновків, списку використаних джерел, який містить 84 посилання. Дисертація викладена на 129 сторінках, містить 31 рисунок та 4 таблиці.

## Розділ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Рак грудної залози та гормонозалежна біологія: сучасний стан проблеми

Рак грудної залози (РГЗ) залишається однією з провідних причин онкологічної захворюваності та смертності серед жінок у світі рис.1.1 [1, 12], а його гетерогенність зумовлює значні відмінності в перебігу хвороби, прогнозі та відповіді на терапію [12]. Клінічно та молекулярно РГЗ традиційно класифікують на підтипи залежно від експресії рецепторів естрогену (estrogen receptor, ER), прогестерону (progesterone receptor, PR) та HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2, HER2), що визначає базову терапевтичну стратегію та ризики рецидиву [12]. Найбільш поширеним є ESR-позитивний (люмінальний) РГЗ, для якого ключовим драйвером пухлинного росту виступає естроген-залежна транскрипційна програма, опосередкована естрогеновим рецептором (ESR1) та його ко-регуляторами [13].

Попри ефективність ендокринотерапії (tamoxifen, інгібітори ароматази, SERD), значна частка ESR-позитивних пухлин демонструє первинну або набуто-резистентну поведінку [14]. Однією з центральних причин є крос-ток між ESR-сигналінгом та шляхами ростових факторів, зокрема PI3K/AKT/mTOR та MAPK/ERK, які здатні активувати ESR-залежну транскрипцію генів залучених до прогресії пухлинного росту ліганд-незалежно через фосфорилування безпосередньо ESR1 та/або його ко-регуляторів [14, 15] ініціюючи при цьому ER-незалежну транслокацію ESR1 до ядра. У цьому контексті особливу увагу привертає mTOR/S6K1-залежне сигналювання, де S6K1 (кіназа рибосомного білка S6), продукт гена

RPS6KB1 знаходиться під регуляторн контролем mTORC1 і часто має підвищену експресію і активність в пухлинах РГЗ [16, 17], і крім того може напряду впливати на функціональну активність ESR1 [15].

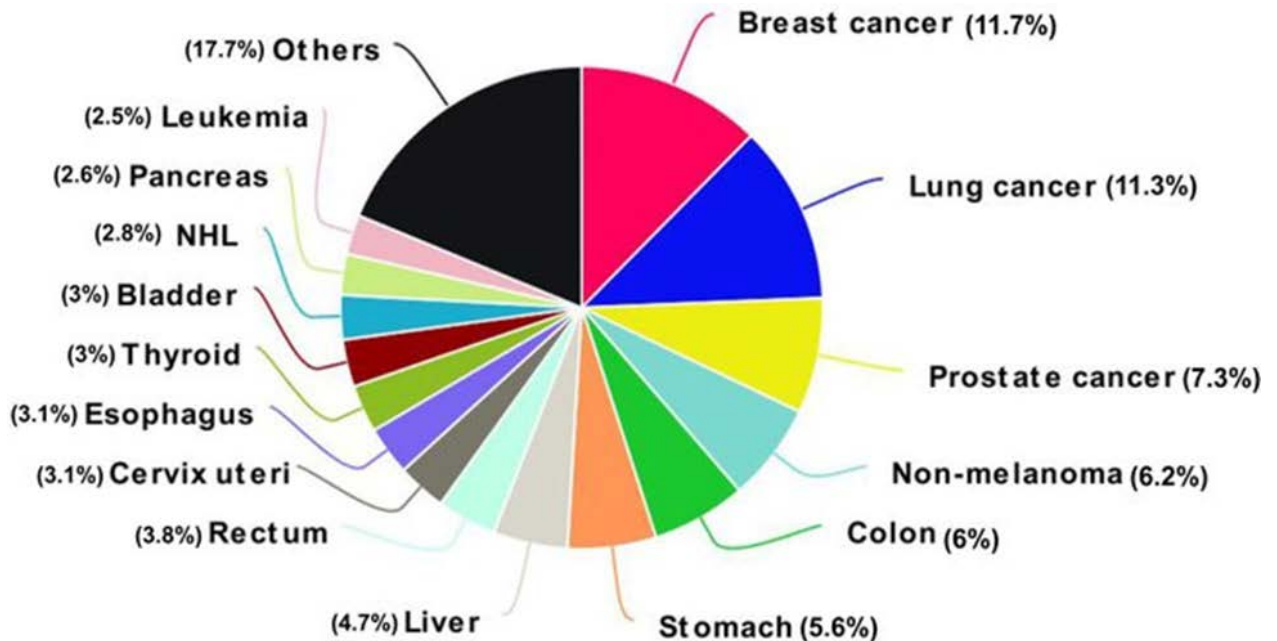


Рис. 1.1 Розподіл нових випадків онкологічних захворювань у світі за 2020 рік для обох статей усіх вікових груп (за даними GLOBOCAN 2020)

Паралельно з “класичним” ядерним ESR-сигналюванням, у розвитку РГЗ все більше уваги приділяється дослідженню негеномних/мембранних естрогенових сигналів, що можуть реалізовуватися через ізоформи ESR1 (зокрема ESR1/36) і бути залученими до регуляції активності Src/ERK та PI3K/АКТ сигнальних каскадів [18-20]. Активність ESR1/36 пов’язують із більш агресивними фенотипами та терапевтичною резистентністю, а також зі зміщенням балансу між ядерними та мембранними відповідями на естроген [18-20]. Таким чином, ізоформна організація ESR1 створює

додатковий рівень складності: різні білкові форми можуть відрізнятися локалізацією, набором доменів, білок-білковими взаємодіями та набором мішеней фосфорилування, що прямо впливає на злоякісну поведінку клітин.

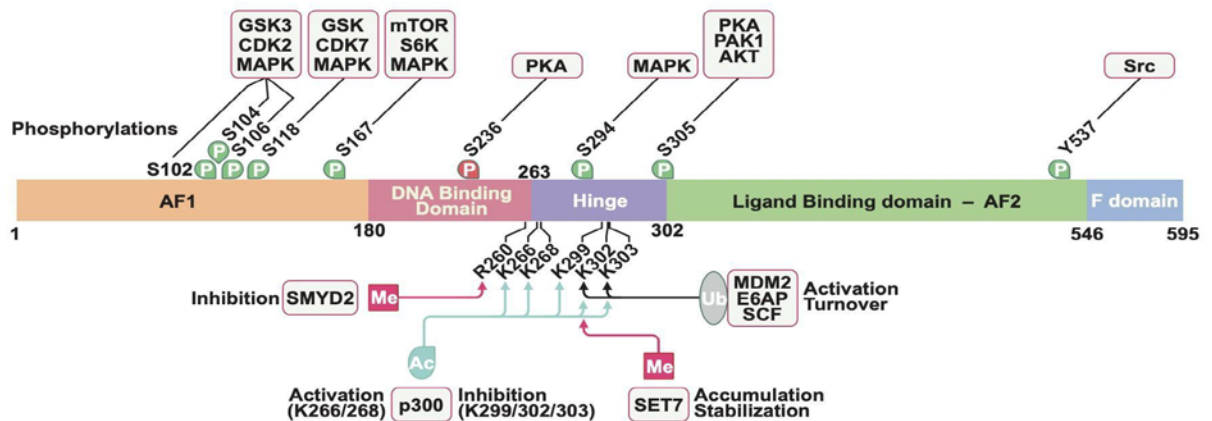
## **1.2. Естрогеновий рецептор (ESR1): доменна організація, ізоформи та функціональна спеціалізація**

ESR1 є ядерним рецептором-транскрипційним фактором, який після зв'язування естрадіолу формує димери, взаємодіє з estrogen response elements (ERE) у ДНК та рекрутує ко-активатори/ко-репресори, регулюючи експресію генів проліферації, виживання та диференціації [13, 17]. Канонічний ESRp66 ( $\approx 66$  кДа) містить домени A/B (AF-1), C (DNA-binding domain, DBD), D (hinge), E/F (ligand-binding domain, LBD; AF-2), що забезпечують інтеграцію гормональних та сигнальних входів [23]. На рисунку 1.2 представлена схематична структура естрогенового рецептора [21]

Ген ESR1 кодує декілька протеїнових варіантів (ізоформ), найбільш дослідженими серед яких є ESR1/66, ESR1/46 та ESR1/36 (табл.1.1 [18] і рис.1.3) [22]. ESR1/46 зазвичай розглядають як N-термінально укорочену форму, яка втрачає повноцінну AF-1 активність, змінюючи транскрипційну відповідь та взаємодію з ко-регуляторами [23,24]. Натомість форма ESR1/p36 є значно більш “нестандартною”: вона позбавлена класичних транскрипційно-активуючих доменів AF-1/AF-2, але зберігає DBD частково та має унікальний C-термінальний хвіст, а її локалізація часто асоціюється з плазматичною мембраною/цитоплазмою, де вона може запускати швидкі сигнали через Src/ERK та PI3K/АКТ [24 - 26].

Показано, що ESR1/36-форма здатна формувати функціональні сигнальні вузли з ростовими рецепторами та кіназами, посилюючи проліферацію, виживання, міграцію та потенціал метастазування клітин

РГЗ [24]. В експериментальних моделях ESR1/36-асоційований мембранний естрогеновий сигнал може посилювати пухлино утворення та метастатичні властивості [25]. Таким чином, у межах ESR-позитивного спектру РГЗ важливо враховувати не лише “наявність ESR” як маркера, але й яка саме ізоформна конфігурація ESR1 реалізована у клітині, і як вона інтегрується з різними кіназними каскадами.



**Рис. 1.2.** Схематична структура естрогенового рецептора ESR1 із зазначенням основних функціональних доменів та сайтів посттрансляційних модифікацій. Адаптовано з [21]. На схемі показано домени: AF1 (функціональний домен активації 1), ДНК-зв’язувальний домен (DBD), шарнірний домен (Hinge), ліганд-зв’язувальний домен (LBD/AF2) та F-домен. Позначено ключові модифікації: фосфорилювання (P), метилювання (Me), ацетилювання (Ac) та убіквітинування (Ub), а також кінази та ферменти, що їх регулюють (GSK3, MAPK, mTOR, p300 та ін.)

Вісім екзонів ESR1 (позначені синім), що кодують дикий тип ESR1, зображені у вигляді пронумерованих блоків. Білкові домени позначені літерами A–F, а нумерація відповідає положенню амінокислот у

послідовності повнорозмірного білка. Повнорозмірний ESR1 має довжину 595 амінокислот.

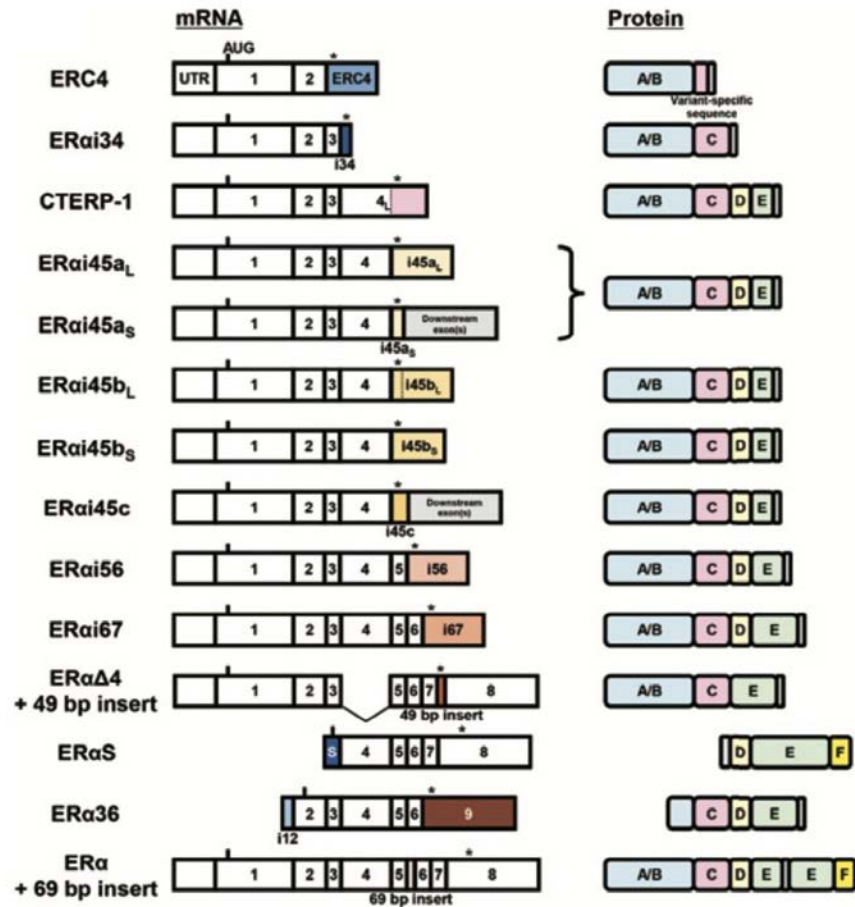


Рис. 1.3. мРНК ізоформи естрогенового рецептора. Адаптовано з [22]

Ізоформа p46 ESR1 утворюється внаслідок використання альтернативного старт-кодону, і її мРНК не містить екзону 1, що призводить до утворення укороченої форми рецептора, у якій відсутні перші 173 амінокислоти повнорозмірної послідовності.

Ізоформа ESR1-36 генерується з промотора, розташованого в першому інтроні, і також не містить екзону 1, але, крім того, позбавлена останніх 138 амінокислот, що кодуються екзонами 7 і 8; вони замінені на 27 амінокислот

на С-кінці.

*Таблиця 1.1.*

**Основні ізоформи ER $\alpha$  та їх функціональні особливості (узагальнено)**

<b>Ізоформа</b>	<b>Орієнтовна маса</b>	<b>Доменний склад</b>	<b>Локалізація</b>	<b>Функція</b>
ER $\alpha$ 66	~66 кДа	A/B(AF-1)+C(DBD)+D+E/F (LBD, AF-2)	ядро/цитоплазма	“класична” естроген-залежна транскрипція
ER $\alpha$ 46	~46 кДа	вкорочений N-кінцевий (↓ AF-1) + C+D+E/F	ядро/цитоплазма	модифікована транскрипційна відповідь, домінантні ефекти в окремих контекстах
ER $\alpha$ 36	~36 кДа	укорочені транскрипційні домени; нетиповий С-кінець	мембрана/цитоплазма (часто)	швидкі (non-genomic) сигнали, крос-ток із ростовими шляхами, резистентність [13–15,17]

### **1.3 mTOR/S6K1 сигнальний каскад у раку грудної залози: загальні принципи та клінічні кореляції**

Шлях PI3K/AKT/mTOR є одним із найчастіше активованих у РГЗ і виступає центральним регулятором росту клітини, метаболізму та білкового синтезу [16]. Комплекс mTORC1 активує низку ефекторів, серед яких ключовими є 4E-BP1 та S6K1 [16,17]. S6K1, у свою чергу, фосфорилує рибосомний білок S6 та інші субстрати, змінюючи трансляційний профіль клітини та підтримуючи проліферативні програми [17]. Окрім “трансляційної” функції, S6K1 впливає на виживання, міграцію та терапевтичну відповідь пухлинних клітин, що робить її не лише маркером активності mTORC1, але й потенційною терапевтичною мішенню [17].

Ген RPS6KB1 розташований у регіоні 17q23, який є відомим локусом, що зазнає частої ампліфікації в пухлинах грудної залози [25]. Структурні та функціональні дослідження 17q23 амплікону розглядають RPS6KB1 серед кандидатних онкогенів регіону [25,26]. На клінічних вибірках показано, що ампліфікація/надекспресія RPS6KB1 трапляється у помітної частки карцином і може асоціюватися з несприятливими параметрами перебігу [26], а на рівні білка надекспресія p70S6K корелює з прогнозом у окремих когортах [22]. Ці дані створюють підґрунтя для моделі, де гіперактивація mTORC1/S6K1 не лише прискорює ріст пухлини, але й перебудовує гормональну залежність та підвищує ймовірність резистентності до ендокринотерапії [24].

## 1.4 Ізоформи S6K1: структурні відмінності, локалізація та можлива роль у клітинах РГЗ

S6K1 представлена кількома ізоформами, які виникають внаслідок альтернативного старту трансляції та/або сплайсингу [27] табл.1.2. Найбільш дослідженими є p70S6K1 та p85S6K1. На рис. 1.4 представлена доменна організація протеїнкінази S6K1: p85S6K1 має N-термінальне подовження, що містить сигнал ядерної локалізації, що зумовлює відмінності у її внутрішньоклітинному розподілі порівняно з p70 [28]. Окрім зазначених форм, описані менш досліджені варіанти, зокрема p60S6K1 та p31S6K1, які можуть мати відмінну локалізацію та, потенційно, інший набір партнерів/мішеней [28].

У контексті прогресії РГЗ важливо, що саме ізоформний баланс S6K1 може корелювати зі змінами морфології, міграції та ознаками епітеліально-мезенхімального переходу. На модельних лініях MCF-7, де експериментально модулювали експресію ізоформ, показано, що зсув у бік p60S6K1 супроводжувався змінами, сумісними з більш рухливим/агресивним фенотипом [28]. Такі спостереження підсилюють гіпотезу, що визначення S6K1 як маркера є занадто грубим, і для розуміння поведінки ESR-позитивних клітин необхідно враховувати експресію і активність окремих ізоформ S6K1.

Таблиця 1.2.

Основні ізоформи S6K1 та їхні відмінності (узагальнено).

<b>Ізоформа</b>	<b>Орієнтовна маса</b>	<b>Походження (спрощено)</b>	<b>Типові відмінності</b>	<b>Біологічні натяки для РМЗ</b>
p85S6K1	~85 кДа	N-термінальне подовження	більш виражений ядерний компонент	може залучатися до ядерних подій/ко-регуляції
p70S6K1	~70 кДа	канонічний варіант	класична мішень mTORC1	часто вивчається як ефектор проліферації/резистентності ості [18,19]
p60S6K1	~60 кДа	альтернативні варіанти	потенційно інша локалізація/партнери	асоціації з міграцією та фенотипічними зсувами у MCF-7 [28]
p31S6K1	~31 кДа	укорочений варіант	обмежений доменний склад	біологія значно менш визначена

може корелювати зі змінами морфології, міграції та ознаками епітеліально-мезенхімального переходу. На модельних лініях MCF-7, де експериментально модулювали експресію ізоформ, показано, що зсув у бік p60S6K1 супроводжувався змінами, сумісними з більш рухливим/агресивним фенотипом [28]. Такі спостереження підсилюють гіпотезу, що визначення S6K1 як маркера є занадто грубим, і для розуміння поведінки ESR-позитивних клітин необхідно враховувати експресію і активність окремих ізоформ S6K1.

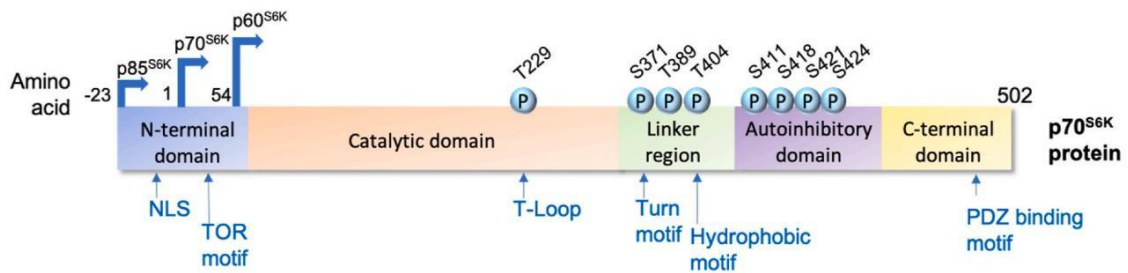


Рис.1.4. Доменна організація та ключові сайти регуляторного фосфорилювання протеїнкінази S6K1. На схемі представлено основні функціональні домени білка (N-кінцевий, каталітичний, лінкерний, автоінгібіторний та С-кінцевий) із зазначенням нумерації амінокислотних залишків. Стрілками вказано альтернативні сайти ініціації трансляції, що призводять до утворення трьох ізоформ: p85S6K, p70S6K та p60S6K. Позначено критичні сайти фосфорилювання (T229 у Т-петлі, T389 у гідрофобному мотиві та групу сайтів в автоінгібіторному домені), які контролюють активацію ферменту в сигнальному каскаді mTOR. Адаптовано з [28]

## 1.5 Регуляторний зв'язок S6K1 та ESR1: фосфорилування ESR1 та ізоформно-залежні закономірності формування гормональної резистентності

Одним із найбільш переконливих механістичних мостів між mTOR/S6K1 та EIR-сигналігом є здатність S6K1 безпосередньо фосфорилувати ESR1. Показано, що S6K1 фосфорилує ESR1 за Ser167, що призводить до транскрипційної активації ESR1, в основі якої транслокації ESR1 до ядра, і надає клітинам проліферативну перевагу навіть за умов низького вмісту естрогенів, а також змінює чутливість до рапаміцину [29].

Оглядові роботи зосереджують увагу на тому, що активований S6K1 та фосфорилування ESR1 (включно з Ser167) можуть бути пов'язані з феноменами резистентності до ендокринотерапії та загальною агресивністю ESR-позитивних пухлин [30]. Додатково підкреслюється, що Ser167 може фосфорилуватися не лише через mTOR/S6K1, але й через паралельні кіназні осі (наприклад MAPK/RSK), що дозволяє пухлинній клітині підтримувати ER-активність навіть при блокаді однієї ланки [31].

Окремі питання стосуються ізоформи ESR1/p36. ESR/36 - опосередковані мембранні сигнали можуть активувати Src/ERK та PI3K/AKT, підтримуючи проліферацію та виживання і формуючи резистентні стани [18–22]. Зокрема, детально описані сигнальні каскади ESR/p36 у ER-негативних та ER-позитивних контекстах, які сходяться на регуляції цикліна D1 та інших вузлів росту [33]. Якщо накласти це на вісь mTOR/S6K1, виникає концептуально “замкнене коло”: ESR/p36 посилює активність протеїн кіназні сигнальні шляхи росту, а ті, у свою чергу, можуть підтримувати ESR-функцію через фосфорилування ESR1 або перебудову трансляції.

Отже, ізоформний крос-ток (S6K1 p70/p85/p60 ER $\alpha$ 66/46/36) є

можливим механізмом, який може пояснювати, чому клітини з однаковим формальним статусом “ER+” демонструють різну поведінку[30, 32-34], різний інвазивний потенціал та різну відповідь на терапію

### **1.6 S6K1 та ендокринна резистентність при ESR-позитивному РГЗ**

Ендокринна терапія є базовою складовою лікування ESR-позитивного РГЗ і включає селективні модулятори естрогенового рецептора (selective estrogen receptor modulators, SERMs; наприклад тамоксифен), інгібітори ароматази (aromatase inhibitors, AIs), а також речовини, що селективно деградують ESR (selective estrogen receptor degraders, SERDs). Незважаючи на істотний клінічний ефект, у значної частки пацієток формується первинна або набута резистентність, що проявляється прогресуванням пухлини на фоні терапії або рецидивом після періоду ремісії [25,26]. Біологічно резистентність не є єдиним “вимикачем”, а радше мережею низки обхідних шляхів, які дозволяють клітині підтримувати проліферацію та виживання за умови блокування естрогенового сигналу. Одним із центральних обхідних шляхів вважають крос-ток між ESR-сигналінгом і кіназними каскадами ростових факторів, найперше PI3K/АКТ/mTOR та MAPK/ERK [35–37].

В PI3K/АКТ/mTOR сигнальному каскаді особливий інтерес становить комплекс mTORC1 та його ефектор S6K1, оскільки на цьому рівні відбувається інтеграція сигналів від поживних речовин, факторів росту та стресових факторів, що прямо перебудовує трансляційний профіль клітини, підсилюючи синтез білків, необхідних для росту і проходження клітинного циклу [38,39]. Доведено, що активація mTORC1 часто характерна для ESR-позитивних пухлин і корелює з агресивністю та зниженням чутливості до

ендокринотерапії, що стало підґрунтям для клінічного застосування інгібіторів mTOR (наприклад everolimus у комбінації з ендокринною терапією у резистентних станах) [40].

Однак навіть за цього терапевтичного підходу спостерігається варіабельність відповіді, що підкреслює необхідність більш тонкого молекулярного розуміння: не лише “mTOR активний/неактивний”, а які саме ефектори та механізми підтримують ESR функцію у резистентних клітинах.

Як вже було зазначено, одним із найбільш чітких зв'язків між S6K1 та ESR1 є фосфорилювання рецептора за Ser167. Показано, що S6K1 здатна безпосередньо фосфорилювати ER $\alpha$  у цій позиції, що підсилює транскрипційну активність ESR1 та сприяє проліферації, зокрема в умовах низького гормонального стимулу, тобто формує підґрунтя для ліганд-незалежної ER-активації [41]. Ser167 є “вузловим” сайтом, оскільки його фосфорилювання корелює з активністю ER-залежної транскрипції та може бути індуковане кількома паралельними кіназними шляхами (наприклад, S6K1 або RSK), що полегшує виживання пухлинної клітини при фармакологічному тиску [41]. Таким чином, за умови блокади ліганд-залежної активації ESR1 клітина може підтримувати ESR1 активність через його посттрансляційні модифікації.

Окрім прямої модифікації ESR1, mTORC1/S6K1 може сприяти ендокринній резистентності через перебудову трансляції та синтезу ключових регуляторів клітинного циклу, виживання та стрес-відповіді [29]. S6K1, фосфорилюючи рибосомний білок S6 і низку білків трансляційного апарату, підсилює біогенез рибосом і селективно підвищує трансляцію мРНК, що кодують компоненти ростових факторів. Це означає, що навіть за пригнічення класичної ESR-залежної регуляції транскрипції клітина може

частково компенсувати втрату гормонального впливу через зсув у бік більш автономного метаболічно-трансляційного режиму. Особливо важливо, що для ESR-позитивних пухлин характерна співрегуляція між ESR та білками цикліна D1/CDK4/6, а також взаємозв'язки ESR із сигнальними каскадами, які залучені до контролю і тому кіназна підтримка проліферації може знижувати залежність від естрогенового сигналу як такого.

Ще одним механізмом резистентності, що активно обговорюється, є генетична та епігенетична перебудова клітини у відповідь на терапевтичний тиск. Для ESR-позитивного РГЗ описані мутації ESR1 (особливо при метастатичному перебігу після тривалої терапії інгібіторами ароматази), що підвищують конститутивну активність рецептора [42], а також зміни у PI3K/АКТ/mTOR-осьових компонентах (наприклад, PIK3CA), які посилюють сигнал ростових факторів [37,43]. У цьому контексті S6K1 може виступати не лише ефектором mTORC1, а й маркером того, що клітина перейшла до стану, де гормональна залежність ослаблена, а виживання підтримується гіперактивацією ростових каскадів.

Важливо, що ці зміни рідко існують ізольовано: ESR-програма, PI3K/АКТ/mTOR і MAPK/ERK сигналювання формують взаємопідсилювальні петлі, і резистентність часто реалізується через комбінацію кількох механізмів [38,44].

Особливо перспективним виглядає припущення, що різні ізоформи S6K1 можуть по-різному підтримувати резистентний фенотип. p70S6K1 і p85S6K1 відрізняються N-кінцевими ділянками та внутрішньоклітинною локалізацією, що потенційно визначає різний доступ до субстратів, у тому числі до ESR1 та його ко-регуляторів [45–47]. Менш досліджені ізоформи S6K1 (наприклад p60S6K1) можуть мати відмінні партнерські взаємодії і бути пов'язаними з фенотипами міграції/ЕМП, які часто супроводжують прогресію та терапевтичну резистентність. Паралельно, ізоформи ESR1

(ESR/66/ESR/46/ESR/36) можуть перемикаєти клітинну відповідь: ESR/36 асоціюють зі швидкими мембранними сигналами через Src/ERK і PI3K/АКТ, що теоретично здатне підтримувати mTORC1–S6K1 активність і створювати петлю автопідсилення резистентності [48,49]. У результаті виникає ізоформна модель резистентності, де не лише рівень ESR або S6K1, а саме конкретна комбінація ESR- та S6K1 ізоформ визначає, який обхідний маршрут може використати пухлинна клітина під тиском ендокринної терапії.

Отже, дані літератури дозволяють зробити узагальнення: mTORC1/S6K1-залежне сигналювання сприяє ендокринній резистентності через пряме посттрансляційне підсилення ESR1 активності (фосфорилювання Ser167) [41]; через трансляційно-метаболичну підтримку проліферації та виживання незалежно від гормонального сигналу [39]; через інтеграцію з ростовими каскадами, що формують обхідні маршрути активації ESR-залежної активності [38]; а також потенційно через ізоформ-специфічні механізми, які на даному етапі залишаються недостатньо дослідженими [45–47].

### **1.7 Ізоформи S6K1, реорганізація цитоскелета, міграція та епітеліально-мезенхімальний перехід у клітинах РГЗ**

Метастатичний потенціал пухлинних клітин є визначальним чинником несприятливого прогнозу при раку грудної залози і тісно пов'язаний зі здатністю клітин до міграції, інвазії та адаптації до нових мікрооточень. У молекулярному сенсі ці процеси реалізуються через складну перебудову цитоскелета, міжклітинних контактів та сигнальних мереж, що регулюють клітинну полярність і рух. Одним із центральних фенотипічних сценаріїв,

який забезпечує таку пластичність, є епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП), що характеризується втратою епітеліальних маркерів, набуттям мезенхімальних ознак і підвищенням інвазивності [50-52].

Сигнальні шляхи PI3K/AKT/mTOR та MAPK/ERK відіграють ключову роль у запуску і підтриманні ЕМП та міграційних програм у клітинах РМЗ [44, 53, 54]. У цьому контексті S6K1 розглядається не лише як регулятор трансляції і росту клітини, але й як функціональний вузол, здатний впливати на морфологію клітини, організацію цитоскелета та рухливість. Дослідження показали, що активація mTORC1–S6K1 може сприяти ремоделюванню актинового цитоскелета, зміні адгезивних властивостей клітин та регуляції експресії генів, пов'язаних з інвазією і метастазуванням [44].

Особливий інтерес у цьому аспекті становить ізоформна гетерогенність S6K1. Класичні ізоформи p70S6K1 і p85S6K1 відрізняються доменною організацією та внутрішньо клітинною локалізацією, що потенційно визначає їхню участь у різних клітинних процесах. p85S6K1, завдяки N-кінцевому ядерному локалізаційному сигналу, частіше асоціюється з ядерними функціями, тоді як p70S6K1 переважно локалізується в цитоплазмі та реалізує класичні впливи mTORC1 на трансляцію [45]. Водночас описані менш досліджені ізоформи, зокрема p60S6K1, які можуть мати унікальні властивості та специфічні функціональні ролі.

На модельних клітинних лініях РМЗ, зокрема MCF-7, показано, що зміна співвідношення ізоформ S6K1 супроводжується фенотиповими зсувами. Зокрема, підвищена експресія або домінування p60S6K1 асоціювалася зі змінами клітинної морфології, порушенням типової епітеліальної організації та зростанням міграційної активності клітин [46,47]. Ці спостереження узгоджуються з концепцією, що p60S6K1 може бути залученою до регуляції актинового цитоскелета або до сигнальних

комплексів, які контролюють клітинну рухливість, на відміну від “класичної” p70S6K1, основною функцією якої вважається стимуляція білкового синтезу.

ЕМП супроводжується глибокими змінами в експресії та активності білків клітинної адгезії (E-cadherin, N-cadherin), регуляторів актинових філаментів, Rho-GTPаз та факторів транскрипції (SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB) [37]. Активація S6K1 може опосередковано впливати на ці процеси через регуляцію трансляції відповідних мРНК або через взаємодію з сигнальними шляхами, що контролюють ЕМП. Відомо, що mTOR/S6K1 сигнальний каскад може сприяти індукції мезенхімальних маркерів та пригніченню епітеліальних характеристик у різних типах раку, включно з РГЗ [20]. У цьому сенсі ізоформ-специфічні ефекти S6K1 можуть визначати, чи клітина залишатиметься у відносно диференційованому, гормонозалежному стані, чи набуватиме більш агресивного, міграційно-активного фенотипу.

Важливо також враховувати взаємодію між S6K1 та естрогеновим сигналінгом у регуляції міграції та інвазії. Естрогеновий рецептор, окрім своєї ядерної транскрипційної ролі, здатний впливати на організацію цитоскелета і клітинний рух через негеномні сигнали. Особливо це стосується ізоформи ESR/p36, яка локалізується в цитоплазмі та на плазматичній мембрані і активує Src/ERK та PI3K/АКТ каскади [48, 49]. Активація цих шляхів безпосередньо пов'язана з регуляцією Rho-GTPаз, динамікою актинових філаментів та формуванням протрузій, необхідних для міграції клітин.

У такій моделі ESR/p36 може виступати як “тригер” міграційних сигналів, тоді як S6K1, особливо її альтернативні ізоформи, може забезпечувати метаболічну та трансляційну підтримку цих процесів. Теоретично можливий сценарій, за якого ESR/p36-опосередкована активація

PI3K/АКТ призводить до стимуляції mTORC1/S6K1, а певні ізоформи S6K1 (наприклад p60S6K1) беруть участь у формуванні або стабілізації сигнальних комплексів, необхідних для перебудови цитоскелета та підтримки рухливого фенотипу. Така ізоформна взаємодія може пояснювати, чому клітини з формально ER-позитивним статусом демонструють підвищену інвазивність і ознаки ЕМП [46–49].

Окрім прямого впливу на міграцію, S6K1 та її ізоформи можуть опосередковано сприяти метастазуванню через регуляцію виживання клітин у стресових умовах, зокрема під час відриву від первинної пухлини (анойкіс-резистентність) та при колонізації віддалених органів. Активація mTOR/S6K1 асоціюється з підвищеною стійкістю клітин до метаболічного стресу та дефіциту факторів росту, що є критичним для клітин, які перебувають у кровотоці або новому мікрооточенні [55,56]. У поєднанні з ЕМП це створює сприятливі умови для успішного метастазування [57].

### **1.8. Ізоформ-специфічні взаємодії S6K1 та ESR1 (66/46/36) та наслідки для фенотипу клітин РГЗ**

Наявні дані однозначно вказують, що mTORC1/S6K1 сигнальний каскад здатен впливати на ESR1 функціональну активність не лише опосередковано через трансляцію, але й прямо, через посттрансляційну модифікацію ESR1. Зокрема, показано, що S6K1 фосфорилує ESR1 за Ser167, що активує ER-залежну транскрипцію та підсилює проліферацію клітин раку грудної залози; при цьому Ser167-фосфорилування є рапаміцин-чутливим і корелює з активністю S6K1 [15,58]. Водночас Ser167 є сайтом, до якого надходять сигнали як від mTOR/S6K1, так і від MAPK/RSK, що створює функціональну незалежність і дозволяє підтримувати ESR-активність за умов терапевтичного тиску [58]. Окремо підкреслюється, що активація S6K1 у ER-позитивних

пухлинах асоціюється з гіршим прогнозом і розвитком ендокринної резистентності [13].

На тлі цих механізмів виникає питання про ізоформну специфічність взаємодії S6K1 та ESR1 у різних клітинних контекстах. ESR1 представлений кількома білковими варіантами (ESR/66, ESR/46, ESR/36), причому ER $\alpha$ 36 асоціюється з мембранно-цитоплазматичним сигналінгом, активацією MAPK/ERK і PI3K/AKT та підвищенням агресивності пухлин [18]. Також показано, що ERS/36 може брати участь у формуванні терапевтичної резистентності, зокрема опосередковуючи нетипові (“агоністичні”) ефекти тамоксифену та підтримуючи рост-фактор-залежний фенотип [24].

Паралельно S6K1 існує у вигляді кількох ізоформ (p70/p85, а також менш дослідженої ізоформи p60). Для p60/S6K1 продемонстровано наявність специфічного транскрипту у клітинах MCF-7 та гетерогенність експресії серед різних клітинних ліній, причому рівні p60 не корелюють із загальним рівнем S6K1 [46]. Важливо, що зміни у співвідношенні ізоформ S6K1 можуть істотно впливати на клітинний фенотип, зокрема на міграцію та сигнальні каскади [59]. Зокрема, селективна експресія p60S6K1 у клітинах із пригніченими p70/p85 асоціюється з індукцією епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), втратою епітеліальної морфології та зростанням міграційної активності [60].

### **1.9. Модельні сублінії клітин карциноми грудної залози MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1**

Як вже було зазначено, поряд із вже відомими p70 та p85 ізоформами S6K1 нами нещодавно ідентифіковано та охарактеризовано нову, коротшу p60 ізоформу S6K1, що може транслюватися з третього альтернативного старту трансляції в 2-му екзоні тому не має взагалі N-кінцевої регуляторної ділянки,

а отже і регуляція якої має відрізнятися [61]. Дійсно, нами встановлено, що активність p60 ізоформи має відмінний від p70 та p85, mTOR- незалежний механізм активації і, відповідно, характеризується нечутливістю до інгібітора mTOR рапаміцину [62], похідні якого схвалені для використання в протипухлинній терапії, зокрема РГЗ. То ж ми припускаємо, що існуюча, або набута з часом, резистентність пухлин до рапаміцину та його похідних може бути в тому числі пов'язана і з експресією/активністю p60 S6K1. Відповідно p60 може бути прогностичним маркером для визначення ефективності терапії, а також і перспективною мішенню в терапії. Крім того, нами виявлено і додаткову сплайсову мРНК ізоформу S6K1, що може бути відповідальною за альтернативний шлях експресії p60-S6K1 відмінний від існуючого для p70 та p85 ізоформ. Згадана мРНК містить додатковий екзон (між 1-им та 2-им) завдяки чому відбувається передчасна термінація трансляції з першого та другого стартів розташованих в 1-му екзоні, що відповідають за трансляцію p70 та p85 ізоформ S6K1 з можливим утворення двох коротких N-кінцевих пептидів (4kDa та 6kDa), відповідно p85- та p70-S6K1, що містять важливі регуляторні елементи, про що йшлося вище. При цьому трансляція p60 зберігається, адже старт її трансляції знаходиться в 2-му екзоні. Нами встановлено, що сіРНК індукована деградація нової сплайсової мРНК призводить до суттєвого, але не повного зменшення вмісту p60 ізоформи [62]. То ж найбільш вірогідно, що до експресії p60 причетні обидві ізоформи мРНК S6K1, однак в останньому випадку це напевно відбувається разом з експресією регуляторних пептидів. Крім того, регуляція трансляції цих S6K1 мРНК також може відрізнятися з огляду на відмінності в довжині 3'UTR, а значить і наявності в ньому регуляторних ділянок. Надзвичайно важливим і перспективним є подальше з'ясування можливої функціональної активності цих пептидів S6K1, адже довший за розміром N-кінцевий пептид p85/S6K1 маючи TOS мотив може виконувати роль антагоніста в регуляції mTOR-

залежного фосфорилування, а завдяки поліаргініновій послідовності і здатність до секреції і проникнення в оточуючі клітини. Отримано експериментальне підтвердження важливих регуляторних функцій білкових продуктів нової сплайсової мРНК - р60 ізоформи S6K1 та/чи коротких пептидів S6K1. ПЛР аналізом пухлин щитоподібної залози людини різних типів встановлено кореляцію між зростанням рівня експресії саме сплайсової ізоформи мРНК в пухлинах, що утворюють метастази [63]. Важливо, що такої кореляції для мРНК р70 та р85 ізоформ кінази не виявлено.

Для дослідження функціональної активності ізоформ S6K1 з використанням системи геномного редагування CRISPR/Cas9 на основі клітин HEK293 [61,64] та клітин карциноми грудної залози людини MCF-7 [65, 59] нами створено низку субліній з диференційною експресією ізоформ S6K1 (рис. 1.5.).

За умови пригнічення експресії р70 та р85 ізоформ та експресії лише р60 ізоформи S6K1 (р85<sup>-</sup>/р70<sup>-</sup>/р60<sup>+</sup>/S6K1) в клітинах MCF-7 виявлено кардинальні зміни фенотипу, а саме появу фібробластоподібного фенотипу, багаторазове підвищення локомоторної активності, пригнічення рівня проліферації, перебудову цитоскелету. Це супроводжувалася заміною експресії маркерів епітелійних клітин цитокератинів на маркер мезенхимних клітин віментин, кадєрину E на кадєрину N, суттєвим збільшенням експресії маркерів стовбурових ракових клітин CD44 та альдегіддегідрогенази (ALDH), експресією генів ключових транскрипційних факторів пов'язаних з ініціацією EMT (Twist1, Slag, Zeb1/2) [60].

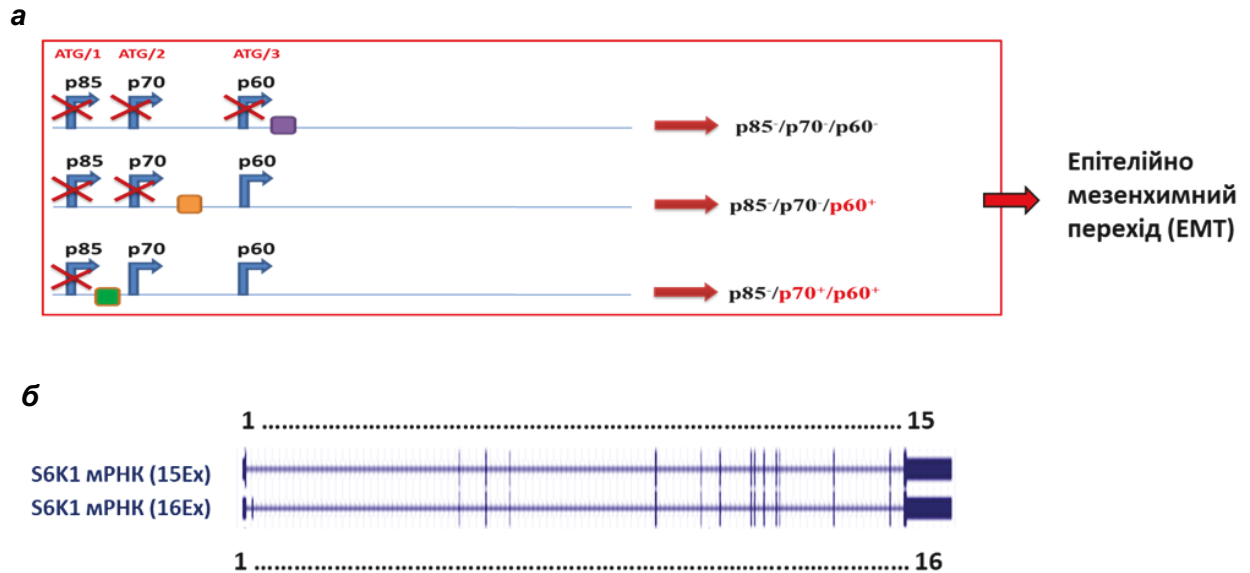


Рис. 1.5. Створення модельних субліній клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1 з використанням системи редагування геному CRISPR/Cas9. Схематичне зображення розташування ділянок мРНК S6K1, ген якої зазнав редагування (зазначено різнокольоровими чотирикутниками) яке в свою чергу мало наслідком блокування експресії відповідних ізоформ S6K1 (виділено хрестиками) (а). Схематичне зображення двох головних сплайсових мРНК S6K1, що містять відповідно 15 чи 16 екзонів і відповідають за трансляцію всіх трьох ізоформ (p60/p70/p85S6K1) чи лише p60/S6K1 – мРНК (15Ex) та мРНК (16Ex) відповідно (б)

Крім того, виявлено повне пригнічення експресії ESR1, як на рівні білка, так і мРНК. Таким чином, нами вперше встановлено, що ізоформи S6K1 причетні до ініціації EMT і регуляції експресії ESR1 за поки невідомим механізмом. На рівні ж пухлини це може свідчити про залучення S6K1 до патогенеза не тільки ESR<sup>+</sup> пухлин, а і більш агресивних ESR<sup>-</sup> і навіть пухлин тричі негативного молекулярного субтипу, адже крім всього нами зафіксовано вплив і на пригнічення експресії рецептора прогестерону (PR) та епідермального фактору росту (HER2 neu).

Створені модельні сублінії клітин MCF-7 з диференційною експресією різних ізоформ S6K1 надали можливість ініціювати дослідження по з'ясуванню особливостей функціональної активності ізоформ S6K1 в тому числі і в контексті взаємозв'язку між активністю S6K1 та ESR1.

## РОЗДІЛ 2

### Матеріали і методи

#### 2.1. Матеріали та обладнання

У роботі були використані хімічні реактиви компаній “Thermo Fisher Scientific” (США), “Merck” (США), “Sigma-Aldrich” (США), “New England Biolabs” (Велика Британія), “Fluka” (США), “Bio-Rad” (США), “Serva” (Німеччина), а також вітчизняні реактиви кваліфікації «х.ч.» та «о.с.ч.».

Для стерилізації розчинів та поживних середовищ використовували вертикальний паровий стерилізатор. Всі розчини для роботи з клітинними культурами готували з використанням діонізованої води та фільтрували через мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

У роботі використовували ферменти виробництва компаній “Thermo Fisher Scientific” (США) та “Applied Biosystems” (США). Суміші інгібіторів протеаз та фосфатаз були придбані у компанії “Roche” (Німеччина).

Набори для виділення тотальної РНК, синтезу кДНК, полімеразної ланцюгової реакції, а також набори для очищення плазмідної ДНК та екстракції ДНК з агарозного гелю були виробництва “Thermo Fisher Scientific” (США).

Матеріали для культивування клітинних ліній ссавців (поживні середовища DMEM, фетальна бичача сироватка, L-глутамін, антибіотики) були придбані у компаній “Gibco” (США), “HyClone” (США) та “Lonza” (США).

Для роботи з клітинними лініями ссавців та їх культивування використовували ламінарний бокс II класу біологічної безпеки та CO<sub>2</sub>-інкубатор з контрольованими умовами температури та вологості.

Електрофоретичний розподіл білків та ДНК проводили з використанням камер для вертикального та горизонтального електрофорезу. Візуалізацію білкових сигналів після вестерн-блот-аналізу здійснювали методом хемілюмінесценції з використанням відповідної системи детекції.

## 2.2 Дизайн олігонуклеотидів

Послідовності олігонуклеотидів розробляли на основі нуклеотидної послідовності відповідної ДНК-матриці з додаванням послідовностей, що містили сайти ендонуклеаз рестрикції для подальшого клонування у відповідні вектори. Послідовності, специфічні для додаткових Мус-тагів, включали в послідовність сенс та антисенс праймера в рамці з кодуючою послідовністю. Температуру плавлення розраховували за стандартною формулою:  $T_m = 2(A+T) + A(G+C)$ .

## 2.3 Виділення тотальної РНК з клітинних ліній ссавців

Тотальна РНК була екстрагована з клітинних ліній з використанням одного з двох наборів реагентів: за допомогою набору реагентів “GeneJET RNA purification kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США) та за допомогою реагенту AccuZol™ (BioNeer, США). В першому випадку згідно з рекомендаціями виробника клітини (2-3 x 10<sup>6</sup>) ресуспендували у 600 мкл лізуючого буфера, який містив 100 мМ ДТТ, після чого ретельно перемішували суміш, далі центрифугували 5 хвилин при 14000 x g і переносили в супернатант в нові стерильні епендорфи. Далі до лізованих клітин додавали 360 мкл етанолу (96%) і перемішували зразок шляхом піпетування і лізат переносили у колонку для очищення РНК, центрифугували протягом 1 хв при 12000 x g.

Після видалення “проскоку” колонку зі зв’язаною РНК промивали 3 рази буфером для промивки. Елюцію РНК проводили додаванням 100 мкл деіонізованої води, вільної від нуклеаз. Етапи промивки та елюції супроводжувалися центрифугуванням за умовами, які були викладені вище. Концентрацію РНК вимірювали за допомогою приладу NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, США). У другому випадку клітини ресуспендували в 1 мл AccuZol™ (для чашки діаметром 10 см<sup>2</sup>), ретельно перемішували суміш, далі додали 200 мкл хлороформу, перемішували і залишали на льду 5 хв, далі центрифугували 15 хв при 12000 rpm на +40 °С. Обережно відбирали водну фазу, переносили в нову пробірку і додавали рівний об’єм ізопропілового спирту, перемішували і залишали на –20 °С на 5 хвилин, потім центрифугували 10 хвилин при 12000 rpm на +40 °С. До осаду додавали 1 мл 80% етілового спирту, перемішували і центрифугували 5 хв при 12000 rpm на +40 °С. Осад підсушували і розчиняли у 100 мкл деіонізованої води, вільної від нуклеаз.

## 2.4 Синтез кДНК

Склад реакційної суміші (загальний об’єм складав 10 мкл): тотальна РНК (1 мкг), реакційний буфер, ДНКаза I (1 U). Суміш інкубували протягом 30 хв при 37 °С, додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та інкубували протягом 10 хв при 65 °С для інактивації ДНКази I. Синтез першого кДНК-ланцюга проводили з використанням набору реагентів: “RevertAid Reverse Transcriptase” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Спочатку в реакційну суміш (загальний об’єм 12,5 мкл) додавали 1 мкг тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою I, 1 мкл Oligo(dT)18 праймерів (0,5 мкг) і проводили денатурацію РНК протягом 10 хв при 65 °С. Далі, для синтезу кДНК повну реакційну суміш 4 мкл 5X реакційного буфера, 0,5 мкл інгібітора РНКази “RiboLock”, 0,4 мкл 10 мМ дНТФ та 1 мкл зворотної транскриптази “RevertAid” інкубували протягом

однієї години при 42°C із подальшою термінацією реакції шляхом інкубування суміші при 70°C протягом 10 хв.

## **2.5 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)**

Для оцінки рівнів експресії ESR1 транскрипту в клітинних лініях за допомогою праймерів, специфічних до ESR1 (екзон 4 та екзон 5), p36LBD (екзон 2 та екзон 8),  $\beta$ -актину в якості контролів, проводилась полімеразна ланцюгова реакція з використанням набору реагентів “DreamTaq DNA Polymerase” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакційну суміш (загальним об’ємом 20 мкл) готували наступним чином: додавали 2,0 мкл 10X “DreamTaq” буферу, 0,4 мкл 10 мМ дНТФ, 1 мкл 5 мкМ специфічних праймерів, 1 мкл синтезованої кДНК, “DreamTaq” полімерази та 15,1 мкл води, вільної від нуклеаз. Усі реакції ампліфікації ДНК методом ПЛР проводилися з використанням приладу “FlexCycler” (“Analytik Jena”, Німеччина). Умови реакції були задані наступним чином: попередня денатурація – 2 хв, 95°C, з наступними 35 циклами денатурації (25 с, 95°C), відпалу праймерів (25 с, 65°C або 72°C в залежності від праймерів) та елонгації (1 хв, 72°C), а також етапом кінцевої елонгації (5 хв, 72°C). Утворення відповідних фрагментів ПЛР було в подальшому проаналізовано за допомогою електрофорезу ДНК в агарозному гелі.

## **2.6 Розрізання ДНК ендонуклеазами рестрикції**

В роботі використовували ендонуклеази рестрикції виробництва “Thermo Fisher Scientific”, США. Рестрикцію проводили з використанням відповідного для кожної ендонуклеази буфера. 1 мкг ДНК розрізали 5 U ендонуклеази рестрикції в об’ємі 20 мкл із використанням рекомендованого

виробником буфера. Реакційну суміш інкубували при 37 °С 1–2 год, а ДНК-фрагменти аналізували методом ДНК-електрофорезу в агарозному гелі.

## 2.7. Електрофорез та очищення фрагментів ДНК з гелю

Для приготування агарозного гелю розчиняли агарозу у 1X TAE буфері, кип'ятли до повного розчинення агарози. Після охолодження розчину агарози до 50°C додавали бромистий етидид в концентрації 0,5 мкг/мл. Концентрація агарозного гелю залежала від довжини утворених продуктів ПЛР. Для розділення фрагментів довжиною до 500 п.о. готували 2% агарозний гель (маса/об'єм). У випадку розділення фрагментів ПЛР, довжина яких становила більше 500 п.о., готували 1% агарозний гель (маса/об'єм). Агарозний гель формувався протягом 20-25 хв при кімнатній температурі. Зразки ДНК змішували з бх буфером для нанесення зразків (0,25% бромфеноловий синій, 0,25% ксиленціанол, 30% гліцерин) і вносили в лунки гелю. Електрофорез проводили в буфері TAE при 100 V протягом 1-2 годин. Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували стандартні ДНК-маркери ("MBI", 1Kb). Як буфер для електрофорезу застосовували 1× TAE. Візуалізацію розділених фрагментів ПЛР робили за допомогою опромінення гелю ультрафіолетом при використанні приладу "ChemiDoc" ("Bio-Rad", США).

ДНК-фрагменти за потреби вирізали з гелю та екстрагували за допомогою QIAEX DNA Gel Extraction Kit (QIAGEN), згідно з рекомендаціями виробника.

## 2.8. Лігування ДНК фрагментів

Для лігування фрагментів ДНК у відповідний вектор використовували LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (Promega). У реакції лігування застосовували молярне співвідношення між вектором і вставкою - 1:3, а визначення молярності до маси здійснювалося за формулою:

$$\frac{\text{Нг вектора} \times \text{розмір вставки} \text{ (т.п.н.)}}{\text{розмір вектора} \text{ (т.п.н.)}} \times \text{Х молярне співвідношення вставки/вектор} = \text{нг вставки}$$

Реакцію проводили при кімнатній температурі в буфері , що містив 30 мМ трис-НСІ (рН 7,8), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ DTT, 1 мМ АТФ та 10% ПЕГ-8000 у присутності 3U T4 DNA лігази. Після інкубації протягом 5 хв 10 мкл реакційної суміші використовували для трансформації клітин *E.coli* штаму XL-1 Blue.

## 2.9. Виділення плазмідної ДНК із клітин *E. coli*

Плазмідну ДНК виділяли з клітин *E. coli* із використанням GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific Lithuania EU) та ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit (USA) за рекомендаціями виробників. Кіти базуються на модифікованому методі лужного лізису клітин з наступним зв'язуванням плазмідної ДНК до аніонообмінного матриксу. Осад бактеріальних клітин штаму *E. coli* XL-1 Blue у пізній log фазі (8-12 година культивування)

трансформованих відповідною плазмідною ДНК ресуспендували в буфері 1 (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА, 100 мкг/мл РНКазі А), та додавали рівний об'єм лізуючого розчину 2 (200 мМ NaOH, 1% ДСН). Після інкубування протягом 5 хв при кімнатній температурі, лізат нейтралізували таким же об'ємом охолодженого 3 М КAc, рН 5,5. Клітинні уламки та денатуровані білки видаляли центрифугуванням при 13000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант наносили на колонки QIAGEN-tip, що містили аніон-обмінний носій, попередньо врівноважений буфером QBT (50 мМ MOPS, рН 7,0, 750 мМ NaCl, 15% ізопропанолу, 0,15% Triton X-100), та давали рідині пройти крізь носій. Потім носій промивали двічі буфером для промивки (50 мМ MOPS, рН 7,0, 1 М NaCl, 15% ізопропанол). ДНК елювали буфером для елюції (50 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 1,25 М NaCl, 15% ізопропанол). Елюйовану плазмідну переосаджували ізопропаноловим спиртом (50%). Розчин миттєво центрифугували при 13000 об/хв впродовж 30 хв. Осад ДНК промивали 70% розчином етанолу, та висушували протягом 5-10 хв. Отриманий осад розчиняли у відповідному об'ємі буфера TE (10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА). Кількість та якість отриманої плазмідної ДНК перевіряли електрофорезом в агарозному гелі. Кількість та якість отриманої плазмідної ДНК перевіряли електрофорезом в агарозному гелі.

## **2.10. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція**

Для вимірювання відносної експресії цільових генів у клітинних лініях використовували метод кількісної ПЛР. Реакції проводили із застосуванням набору реагентів “Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)” (“Thermo Fisher Scientific”, США). У реакційну суміш загальним об'ємом 20

мкл додавали 10 мкл “Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X)”, 1 мкл 5 мкМ праймерів, 0,5 мкл синтезованої кДНК та 8,5 мкл води, вільної від нуклеаз. Умови ПЛР були задані згідно з рекомендаціями виробника (початкова денатурація – 10 хв, 95 °С; 40 циклів: денатурація – 15 с, 95 °С, відпал – 30 с, 60 °С, елонгація – 30 с, 72 °С) і реакції проводилися з використанням приладу “Thermal Cycler CFX96 Real-Time System” (“Bio-Rad”, Сінгапур). Для кожної реакції було зроблено три технічні повтори. Аналіз кривих плавлення показав, що присутні одиночні амплікони для кожної використаної пари праймерів, що означає відсутність неспецифічних продуктів реакції. Для вимірювання відносної експресії генів застосовували метод розрахунку  $\Delta C_t$ . Як референційний ген використовували TBP, відносно якого і проводився розрахунок експресії цільових генів.

### **2.11. Клонування gRNA олігонуклеотидів для CRISPR/Cas9 опосередкованого редагування ESR1 гена**

Для клонування gRNA олігонуклеотидів був використаний ДНК-вектор pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Процедура клонування складалася з наступних етапів: фосфорилювання та відпал gRNA олігонуклеотидів, рестрикція ДНК-вектора з наступним дефосфорилюванням, лігування олігонуклеотидів та вектору. На першому етапі gRNA олігонуклеотиди оброблялися T4 полінуклеотидкіназою (T4 Polynucleotide Kinase) (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакцію (загальним об’ємом 25 мкл) замішували із додаванням 25 56 пмоль кожного з олігонуклеотидів (по 1 мкл), 2 мкл 10X буферу, 2 мкл 10 мМ АТФ, 1 мкл T4 полінуклеотидкінази та 13 мкл води. Реакційну суміш старанно перемішували та інкубували протягом 20 хв при 37 °С. Після реакції фосфорилювання проводили відпал олігонуклеотидів за

наступних умов: нагрівали реакцію до 95 °С, інкубували протягом 2 хв за цієї ж температури та охолоджували до 25 °С із кроком 1 °С за 1 хв. Рестрикцію ДНК-вектора виконували з використанням рестрикційного ферменту BbsI (“Thermo Fisher Scientific”, США) у реакції загальним об’ємом 20 мкл із додаванням 2 мкг вектору, 2 мкл 10× буферу та 1 одиниці рестриктази. Далі реакційну суміш інкубували протягом 2 год при 37 °С з наступним додаванням 1 одиниці лужної фосфатази (calf intestinal alkaline phosphatase) (“Thermo Fisher Scientific”, США) та інкубацією протягом 5 хв при 37 °С. Наступним кроком було лігування ДНК-вектора та олігонуклеотидів у реакції з Т4 ДНК-лігазою (T4 DNA ligase) (“Thermo Fisher Scientific”, США). До реакційної суміші (загальний об’єм становив 10 мкл) додавали ДНК-вектор та олігонуклеотиди у молярному співвідношенні 1:2, реакційний буфер та Т4-ДНК-лігазу. Суміш інкубували протягом 15 хв при 37 °С та використовували для подальшої трансформації клітин *E.coli* штаму XL-GOLD. З метою перевірки наявності олігонуклеотидів у ДНК-векторі після реакції лігування використовували ПЛР-аналіз (опис даних у підрозділі 2.4) та секвенування ДНК із використанням приладу Applied Biosystems™ 3130 DNA Analyzer (“Applied Biosystems”, США). У випадку ПЛР-аналізу використовувався U6 праймер в якості прямого праймера (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3') та олігонуклеотид, який відповідав нижньому ланцюгу gRNA олігонуклеотидів, застосовували в якості зворотного праймера.

## **2.12. Методи роботи з клітинами *Escherichia coli***

**2.12.1. Поживні середовища для росту клітин.** Середовище Лурія Бертрані (LB) містило 10 г бактотриптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl на 1 л води, рН 7,0. Для приготування LB агару до середовища LB додавали бактоагар (1,5%). Середовища LB та LB агар автоклали при 121° С впродовж 15 хв.

Ампіцилін та канаміцин готували в 100 мг/мл концентратах у дистильованій воді та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ампіцилін та канаміцин використовували в кінцевій концентрації 50 мкг/мл.

**2.12.2. Отримання компетентних клітин *E. coli*.** Отримання високоефективних компетентних клітин *E. coli* штамів XL1-Blue та XL Gold 10 фірми Stratagene (США) проводили за такої методики: 1 мл нічної культури додавали до 100 мл свіжого LB, інкубувати при  $37^{\circ}\text{C}$ , 200-250 об/хв, при  $\text{OD}_{600} = 0.4-0.6$ . Колбу переносили на лід на 10-15 хв. Потім клітини осаджували центрифугуванням при 4000-5000 g, 10 хв,  $4^{\circ}\text{C}$ . Осад ресеспендували у 30 мл холодного 0.1 М  $\text{CaCl}_2$  з подальшим інкубуванням на льоду: 20-30 хв. Центрифугували при 4000-5000 g, 10 хв,  $4^{\circ}\text{C}$ . Осад ресуспендували у 2-4 мл холодного 0.1 М  $\text{CaCl}_2$  + 15% гліцеролу. Аліквотили клітини по 50-100 мкл у пре-охолоджені пробірки і швидко заморожували у рідкому азоті або на сухому льоду з подальшим зберіганням при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**2.12.3. Трансформація бактеріальних клітин плазмідними ДНК.** Суміш для До 100 мкл компетентних клітин, що перебували в компітентному стані, додавали лігазну суміш, обережно перемішували та залишали на льоду на 30 хв. Далі проводили тепловий шок: пробірки з пробами розміщували у водяній бані та витримували 45 сек при температурі  $42^{\circ}\text{C}$ . Після цього пробірки негайно повертали на лід на 5 хв і до охолоджених клітин додавали попередньо нагріте до  $37^{\circ}\text{C}$  середовище LB з додаванням  $\text{MgSO}_4$  (25 мМ) та глюкози (20 мМ) та інкубували 1 годину при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Після інкубації бактеріальні клітини збирали центрифугуванням (3хв 4000 об/хв), а осад трансформованих бактерій ресуспендували у залишковому об'ємі середовища. Отриману суспензію висівали на поживне середовище LB агар, що містило відповідний антибіотик для селекції трансформантів. Чашки Петрі інкубували в термостаті при температурі  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 12-16 годин.

**2.12.4. Нарощування клітин *E. coli* для препаративного виділення рекомбінантного білка.** 20 мл середовища LB з відповідним антибіотиком інокулювали клітинами BL21(DE3) pLysS *E. Coli*, які були трансформовані відповідним вектором та вирощували протягом ночі при 37°C та інтенсивному перемішуванні (220-250 об/хв). Суспензію клітин розводили в 1 літрі LB-середовища з додаванням антибіотиків та культивували за тих же умов до досягнення оптичної густини OD620 – 0,6. Після цього для індукції експресії рекомбінантного білка до клітин додавали розчин IPTG до кінцевої концентрації 1 мМ. Після інкубації протягом додаткових 4-5 годин клітини збирали центрифугуванням при 4000 g впродовж 20 хв та заморожували при -70°C.

### **2.13. Приготування лізатів бактеріальних клітин за нативних умов**

Клітинний осад розчиняли у 5 мл буфера для лізису, до складу якого входили 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазол та 1% гліцерин. Після ресуспензії суміш витримували на льоду протягом 30 хвилин. Руйнування клітин здійснювали методом ультразвукової обробки (сонікація): 6 циклів по 10 секунд при потужності 200–300 Вт. Для очищення від клітинного дебрису та нерозчинних фракцій лізат піддавали центрифугуванню при 4°C протягом 20–30 хв зі швидкістю 10 000 g. Отриманий прозорий супернатант відбирали для подальшого аналізу експресії цільового білка та його виділення.

## 2.14. Очистка His-таг злитих білків на Ni-NTA агарозі

Для очистки рекомбінантних білків використовували систему QIAexpress®. Система QIAexpress заснована на винятковій селективності та афінності нікельнітрилотриацетової кислоти (Ni-NTA), на основі якої роблять метал афінні хроматографічні матрикси для біомолекул, що мають в своєму складі 6 послідовних залишків гістидину (6xHis таг). Для очистки His-тагового рекомбінантного білка 1 мл 50% суспензії Ni-NTA агарози додавали до 5 мл освітленого лізату та перемішували при 4 °C впродовж 60 хв. Після інкубації суміш наносили на хроматографічну колонку. Ni-NTA сефарозу два рази промивали 4 мл буфера (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 20 мМ імідазол). Зв'язаний білок елюювали 2 мл буфера для елюції (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 8,0, 300 мМ NaCl and 250 мМ імідазолу). Елюований білок діалізували в 1 літрі буфера - 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7,5, 150 NaCl, 1 мМ DTT впродовж 6 годин при 4°C та потім в 0,5 літра аналогічного буфера з додаванням 50% гліцерину. Концентрацію білка вимірювали як описано далі, а білок зберігали при -20°C.

## 2.15. Визначення концентрації білка за Бредфордом

Для визначення концентрації білка в клітинних лізатах та в очищених препаратах білків застосовували колориметричний метод з використанням Coomassie Protein Reagent (Pierce). Метод базується на зміні поглинання Coomassie brilliant blue G-250 з 465 нм на 595 нм, що відбувається при зв'язуванні з білком в кислому середовищі. 0,5 мл Coomassie Protein Reagent розводили 0,5 мл H<sub>2</sub>O та додавали 1 мкл білкового зразка. Після інкубації протягом 30 хв при кімнатній температурі вимірювали поглинання при OD595 порівнянно із контролем, в який не додавали білок.

## 2.16. Електрофорез білків в ПААГ

Гель-електрофорез лізатів клітин та очищених білків проводили згідно з протоколом, описаним у роботі Лемлі [148]. В роботі використовували гелі з градієнтом концентрацій акриламідів (7%-12%).

Після електрофорезу гелі фарбували для виявлення розділених білків за допомогою фарби, до складу якої входили: 0,2% Coomassie brilliant blue R-250, 45% метанолу та 10% оцтової кислоти протягом 20 хв, з наступним відмиванням в 20% метанолі та 5% оцтовій кислоті при помішуванні.

## 2.17. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення протеїнів в ПААГ протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану в буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 год у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Великобританія) у випадку самостійно приготованого геля, або у буфері TransBlot transfer buffer виробництва «BioRad», США в напівсухій системі переносу TransBlot. Після переносу мембрану фарбували понсо С, документували сигнал за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США), блокували протягом 1 год у розчині 5% знежиреного молока в TBST (20 мМ трис-HCl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100), або 5% БСА (бичачий сироватковий альбумін), щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 1–16 год залежно від антитіла та відмивали від первинних антитіл TBS-T три рази по 5 хв. Після промивки мембрану інкубували протягом години в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою TBS-T.

Для хемолюмінісцентної детекції (ECL) змішували рівні об'єми розчину А (100 мМ Tris-HCl, pH8.5, 2,5 мМ люмінал, 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (100 мМ Tris-HCl, pH8,5, 0.023% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемолюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США). Інтенсивність сигналів обраховували, використовуючи програмне забезпечення ImageLab. Обробку даних здійснювали за допомогою програми OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation).

## 2.18. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення MS Excel («Microsoft»), OriginPro 19.1 («OriginLab Corporation», США) або «GraphPad Prism 9.5» («GraphPad Software», США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за W-критерієм Шапіро-Уїлка та критерієм Колмогорова-Смірнова. Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Для порівняння трьох і більше нормально розподілених вибірок аналіз проводили за допомогою ANOVA. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. Для порівняння трьох і більше ненормально розподілених вибірок використовували ANOVA з критерієм Краскела-Уоліса. В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при  $p < 0.05$ . Спосіб представлення даних наведено окремо під кожною гістограмою. На всіх гістограмах \* відповідає  $p < 0.05$ , \*\* відповідає  $p < 0.01$ , \*\*\* відповідає  $p < 0.001$ , а \*\*\*\* відповідає  $p < 0.0001$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Аналіз можливості формування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1

З огляду на існування функціонального зв'язку між ESR1 та S6K1 з одного боку, а з іншого на існування ізоформ як ESR1 так і S6K1 було поставлено завдання проаналізувати як можливість існування протеїнового комплексу між зазначеними молекулами, так і дослідити його склад, а саме можливість участі в його утворенні різних ізоформ. Для цього було обрано метод імунопреципітації протеїнових комплексів з подальшим аналізом методом вестерн-блот.

**3.1.1. Отримання та характеристика поліклональних антитіл, до людського ESR1.** Для виконання поставленого завдання першочерговим було отримання поліклональних антитіл, специфічних до людського ESR1, що містили суміш антитіл до різних ділянок ESR1. Додатковим аргументом на користь цього стало те, що комерційно доступні антитіла проти ESR1 суттєво відрізняються за своєю специфічністю між собою. Цей висновок базується на результатах вестерн-блот-аналізу клітинних лізатів MCF-7 та сублінії MCF-7 (p70-/p85-/p60+/S6K1) зі зниженою експресією ізоформ p70 і p85 S6K1 [59]. Згідно з раніше отриманими даними, а саме ПЛР-аналізом, експресія гена ESR1, що була високою у клітинах MCF-7, була повністю пригніченою у сублінії MCF-7 p70-/p85-/p60+/S6K1. Водночас лише один із двох протестованих типів комерційних антитіл підтвердив результати ПЛР-аналізу на білковому рівні (рис.3.1). Це свідчить про те, що антитіла, заявлені як анти-hESR1, можуть відрізнятися за специфічністю або розпізнавати інші, поки що неідентифіковані ізоформи ESR1. Зокрема, було

показано, що один із двох типів антитіл розпізнає білок із близькою, але дещо меншою молекулярною масою (рис.3.1 доріжка 1, 2) і головне, що експресія цього протеїну за даними вестерн блоту зберігалася в клітинах сублінії MCF-7 (p70-/p85-/p60+/S6K1), що за даними ПЛР аналізу мала б бути пригніченою. Натомість ці антитіла не розпізнавали класичну повнорозмірну форму ESR1/p66.

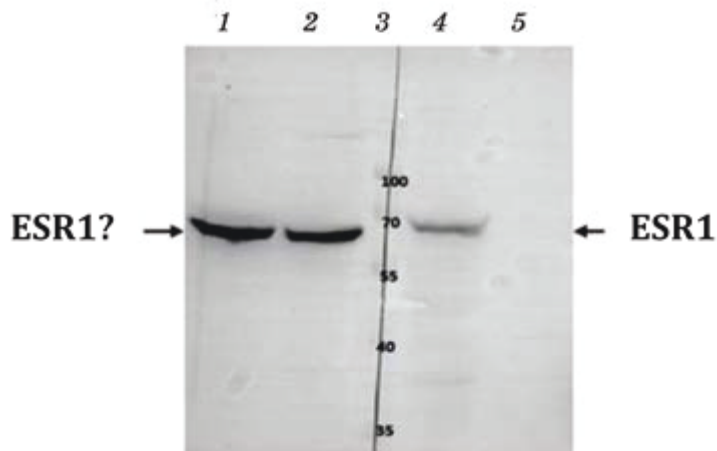


Рис. 3.1. Вестерн-блот-аналіз лізатів клітин MCF-7 та сублінії MCF-7 (p70-/p85-/p60+/S6K1) із використанням різних моноклональних антитіл до ESR1. **1, 2** — мишачі моноклональні антитіла проти ER $\alpha$  (Abcam, MA5-15689); **4, 5** — кролячі моноклональні антитіла проти ESR1 (Abcam, MA5-14501); **1, 4** — лізати клітин MCF-7 (20 мкг); **2, 5** — лізати клітин MCF-7 (p70-, p85-, p60+/S6K1) (20 мкг); **3** — маркери білків із зазначенням молекулярної маси (кДа)

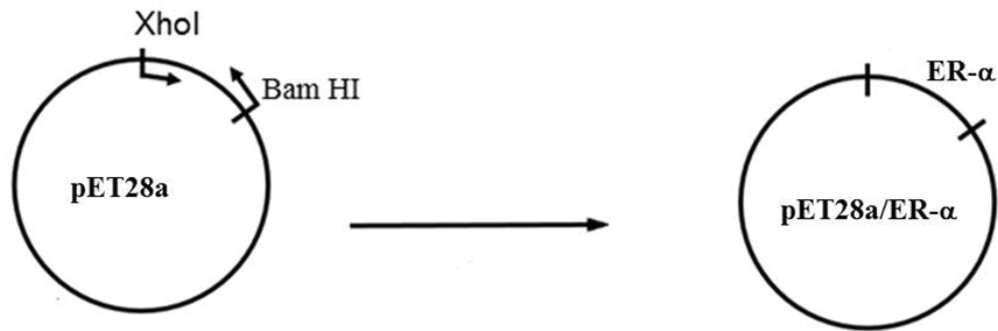
**3.1.2. Створення векторних конструкцій на основі плазмиди pET28a, що містить кДНК для N-кінцевої ділянки та повнорозмірної форми ESR1.** Для отримання поліклональних антитіл як антиген було вирішено використовувати N-кінцевий фрагмент (1-120 а.к.) та рекомбінантний білок, що відповідає повнорозмірній формі hESR1, експресований у бактеріальній системі з таговою

послідовністю, що містила 6 гістидинових залишків (6× His). На початковому етапі кДНК-послідовність, створену на основі мРНК, виділеної з клітин MCF7, для яких характерним є високий рівень експресії ESR1, і що кодує повнорозмірний ESR1 або його N-кінцевий фрагмент, було клоновано у вектор рЕТ28а у рамці з 6хHis-міткою. Ампліфіковані фрагменти кДНК гена естрогенового рецептора було лігровано у векторі рЕТ28а за сайтами рестрикції BamHI та XhoI. Схематичне зображення векторної конструкції зображене на рис. 3.2а. ПЛР-аналіз отриманих клонів з використанням відповідних праймерів показав наявність специфічних ДНК-фрагментів, які були клоновані у векторах рЕТ28а (рис.3.2б). Послідовність вставок у отриманих плазмідних конструкціях була перевірена методом секвенування. Отримані плазміди рЕТ28а/ESR1-His та рЕТ28а/ESR1/N-His використовували для трансформації штаму *Escherichia coli* «Rozetta».

**3.1.3. Експресія рекомбінантних протеїнів повнорозмірної форми естрогенового рецептора ESR1 та його N-кінцевої ділянки в клітинах *Escherichia coli*.** Для експресії рекомбінантних протеїнів у клітинах бактерій використовували штам клітин *Escherichia coli* – Rozetta.

Початково рівень експресії рекомбінантного білка повнорозмірної форми ESR1 в бактеріальних клітинах продуцентах був занадто низьким для детекції в умовах фарбування Кумассі лізатів клітин до та після індукції ПТГ та за результатами афінної хроматографії (дані не представлені), проте додавання 10% цукрози до середовища культивування сприяло значному підвищенню експресії однак при цьому білок накопичувався у формі тілець включення і був розчинним лише за присутності 8М сечовини (рис.3.3а). Очистку ESR1-His здійснювали методом афінної хроматографії на Ni-NTA в денатуруючих умовах також у присутності 8 М сечовини (рис.3.3б).

а



б

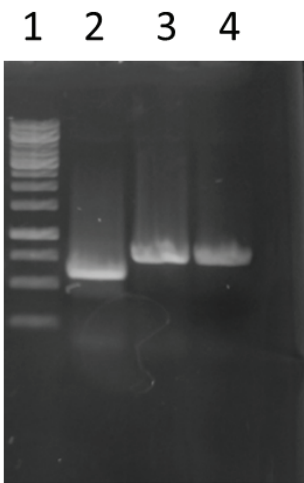


Рис. 3.2. Клонування ДНК-послідовності, що відповідає N-кінцевій ділянці *ESR1* чи повнорозмірній формі *ESR1*, вектора pET 28a. А - схематичне зображення ДНК-конструкції, що містила кДНК для повнорозмірної послідовності *ESR1* чи лише її N-кінцевої ділянки злитих з 6x His послідовністю. Б - ПЛР-аналіз клонів трансформованих бактерій на наявність вставки N-кінцевої ділянки (2) та повнорозмірного *ESR1* (3-4). Для ПЛР-аналізу використовували праймери, специфічні для ділянки векторної конструкції та відповідної ДНК-вставки

Як видно з представлених даних (рис.3.3. а), індукція ППТГ призводила до появи в лізаті бактерій двох протеїнів, а саме протеїну з очікуваною для ESR1 молекулярною масою ~66 кДа, а також протеїну з молекулярною масою близько 40 кДа. Препарат афінно очищеного протеїну також містив два протеїни з молекулярними масами близько 60 кДа, що співпадає з очікуваними для естрогенового рецептора і протеїном близько 40 кДа, що був представлений навіть в більшій кількості ніж лізаті (рис.3.3.б). Отримані результати свідчать про те, що рекомбінантний ESR1-His напевно піддається протеолітичному розщепленню в *E. coli* хоча отримання бактеріальних лізатів проводили в присутності суміші комерційних інгібіторів протеаз, призначених саме для використання під час очистки рекомбінантних протеїнів з лізатів бактеріальних клітин. То ж індукція 1 мМ IPTG призводила до появи двох білкових смуг, які відповідали повнорозмірному ESR1-His та його укороченій формі (рис.3.3 а). Обидві форми ефективно очищувалися на Ni-NTA та розпізнавалися комерційними антитілами проти ESR1 (рис.3.3 б, в), попередньо охарактеризованих нами з використанням лізатів клітин MCF7 (рис. 3.1. дор. 4). Той факт, що співвідношення двох форм рекомбінантного естрогенового рецептора в лізаті клітин безпосередньо після їхнього руйнування і в очищених зразках на користь низькомолекулярної форми свідчить про те, що не зважаючи на присутність інгібіторів протеоліз відбувався і під час очистки рекомбінантного протеїну методом афінної хроматографії (рис. 3.3б). Враховуючи, що обидві форми розпізнавалися комерційними антитілами до С-кінцевого домену, можна припустити, що протеолітичне розщеплення відбувається з N-кінцевої ділянки білка.

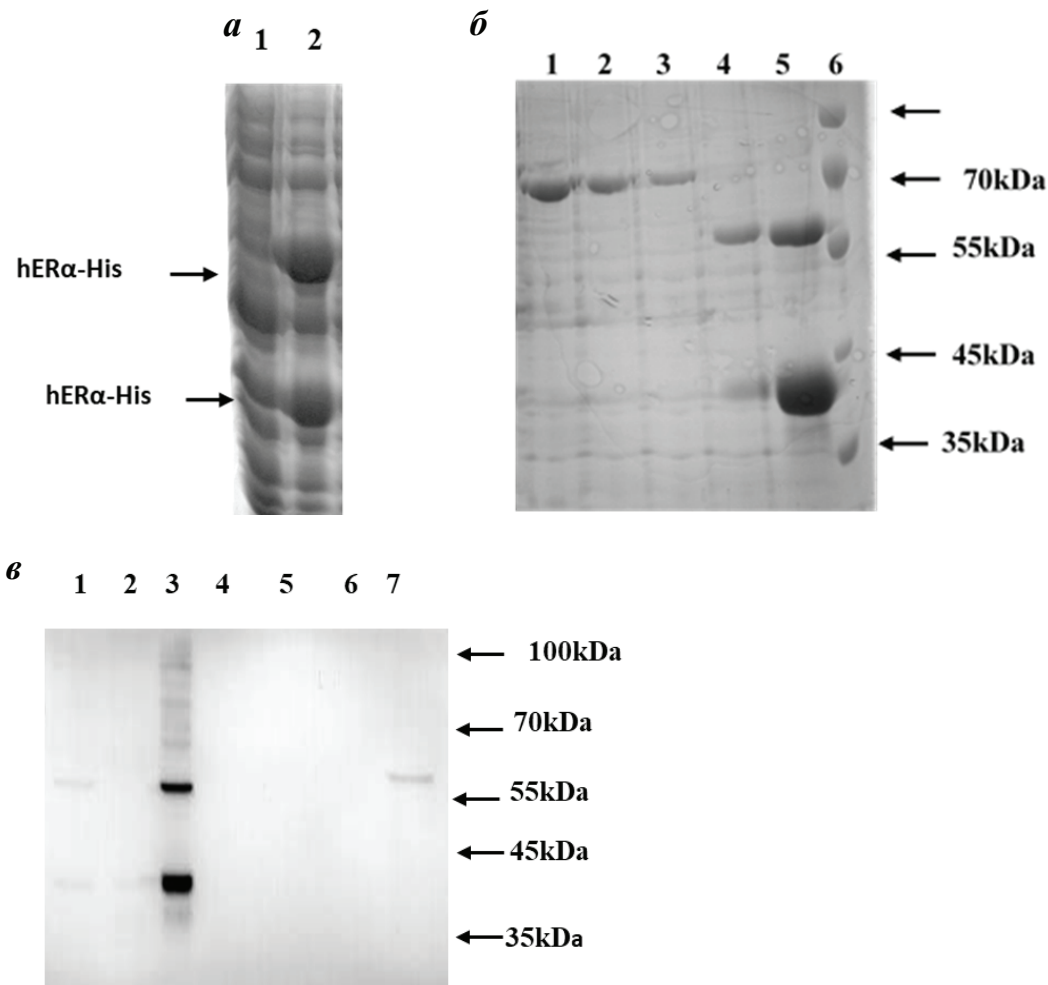


Рис. 3.3. Експресія рекомбінантного hESR1-His у *Escherichia coli*, трансформованій плазмідною рЕТ28а/hESR1: А - SDS-PAGE електрофорез тотальних бактеріальних лізатів отриманих з використанням 8М сечовини до (1) та після індукції IPTG (2); Б - електрофорез очищеного hESR1-His з використанням Ni-NTA хроматографії за денатуруючих умов (присутність 8 М сечовини) : 1-3 - BSA (1,5; 1; 0,5 мкг); 4 - перше елюювання (5 мкл); 5 — друге елюювання (5 мкл); 6 — білкові маркери; В - Вестерн-блот аналіз hESR1-His із використанням антитіл до ESR1 mAbs (Abcam, MA5-14501): 1- лізат бактеріальних клітин (10 мкг) до індукції IPTG; 3- лізат бактеріальних клітин (10 мкг) після індукції 1 мМ IPTG; 4- білкові маркери; 5 і 6 - BSA 1–0,5 мкг; 7 — лізат клітин MCF-7 (15 мкг)

Надалі було проведено вестерн-блот-аналіз зразків лізатів бактеріальних клітин продуцентів та препарату афінно очищеного естрогенового рецептора з використанням анти-His-Tag антитіл (Рис.3.4). Отримані дані підтверджують експресію рекомбінантного білка ESR1 в бактеріальних клітинах. В тотальних лізатах разом з повнорозмірною формою hESR1 була також помітна присутність її протеолітичного фрагмента. Примітно, що після руйнування клітин і солюбілізації протеїнів в буфері з 8М сечовиною частка протеолітичної форми збільшувалася (рис. 3.4 дор.2), а в препараті очищеного hESR1-His-Tag детектувався переважно лише його протеолітичний фрагмент (рис. 3.4 дор.3).

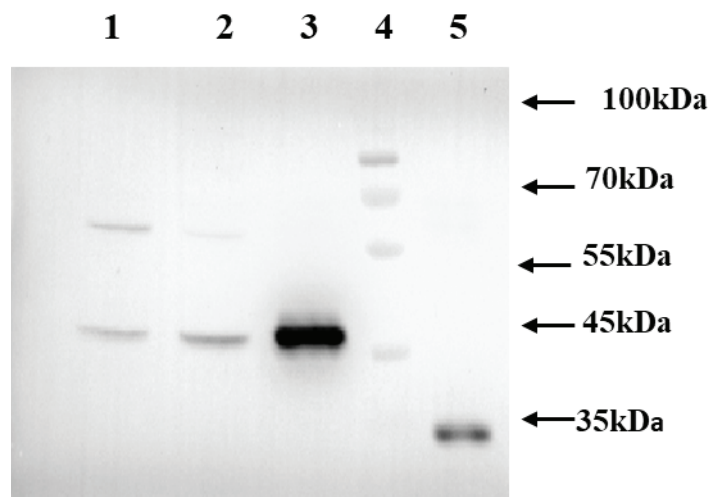


Рис. 3.4. Аналіз ефективності очистки ESR1-His з бактеріальних клітин продуцентів. Вестерн блот аналіз лізатів бактеріальних клітин до (1) та після афінної очистки (2) ESR1-His. Елюат ESR1-His з афінної колонки NiNTA (3). Маркери молекулярної маси (5). Контрольний протеїн з His-tag (6)

Надалі, очищений повнорозмірний ESR1 використовували для імунізації мишей відповідно до стандартного протоколу. Однак слід зазначити, що ми могли бути впевненими лише в присутності в препараті переважно С-кінцевого фрагмента hESR1/His-Tag, згідно з вестерн-блот-аналізом з використанням

комерційних специфічних антитіл як до hESR1, так і до His-Tag. Імунізацію проводили до досягнення титру антитіл  $10^{-5}$ , визначеного методом ELISA з використанням зазначеного препарату hESR1/His-Tag як антигену. Первинний аналіз отриманої антисироватки методом вестерн-блот-аналізу із використанням лізатів клітин MCF-7 показав, що поліклональні антитіла не розпізнають ESR1 у денатурованому стані. Було зроблено припущення про відсутність антитіл, що розпізнають антигенні ієтермінанти лінійного типу в пулі отриманої антисироватки. Однак дані ELISA свідчать про можливу присутність в пулі антитіл, що розпізнають конформаційні детермінанти. Тож у подальшому було досліджено здатність антитіл розпізнавати ESR1 у нативному стані в умовах імунопреципітації. Для імунопреципітації використовували лізати клітин MCF7 із завідомо високим рівнем експресії hESR1. Для вестерн-блот-аналізу імунопреципітатів використовували попередньо перевірені комерційні антитіла (Abcam, MA5-14501) (рис.3.1 дор. 4). Згідно отриманих даних можна зробити висновок, що отримані поліклональні антитіла ефективно імунопреципітували ESR1, який надалі детектувався за допомогою специфічних комерційних моноклональних антитіл рис.3.5. При аналізі результатів імунопреципітації виявлено, що як комерційні, так і щойно отримані антитіла преципітували два протеїни близької молекулярної маси. Лише одна з них за молекулярною масою збігалася за масою з ESR1, що зазвичай ідентифікується в загальному клітинному лізаті. Поява додаткової смуги з вищою молекулярною масою може вказувати на наявність модифікованої або мінорної форми рецептора, яка стає помітною лише після збагачення завдяки імунопреципітації. Характерно, що у реакції імунопреципітації ця форма розпізнавалася нашими поліклональними антитілами навіть ефективніше, ніж основна форма білка, що візуалізується вестерн-блот-аналізом лізату. Це питання потребує більш детального дослідження, адже, можливо, це є свідченням існування невідомої ізоформи ESR1 або ж невідомої раніше модифікації.

Для остаточної верифікації специфічності отриманих анти-ESR1 антитіл було проведено перехресний аналіз із використанням іншої лінії комерційних моноклональних антитіл (Abcam, MA5-15689), які раніше демонстрували неоднозначні результати на вестерн-блотах (рис. 3.1). Відсутність сигналу при детекції імунопреципиту цими антитілами (рис.3.6) підтверджує, що преципітований нашими антитілами білок є саме цільовим ESR1, а не не специфічною домішкою зі схожою масою.

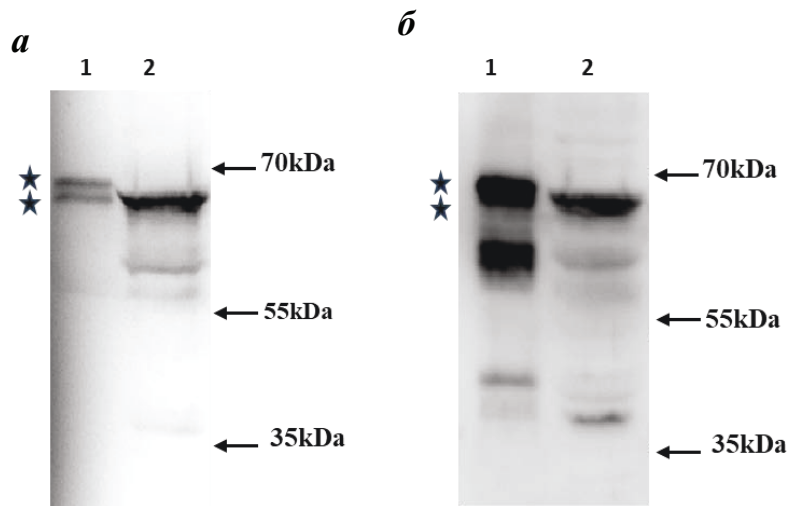


Рис. 3.5. Характеристика поліклональних антитіл миші проти ESR1. Вестерн-блот аналіз ESR1 після імунопреципітації з лізатів клітин MCF-7 із використанням різних антитіл до ESR1: *a* — ESR1, імунопреципітований за допомогою поліклональних мишачих антитіл проти повнорозмірного ESR1; *б* — ESR1, імунопреципітований кролячими моноклональними антитілами проти ESR1 (Abcam, MA5-14501)

Таким чином, отримані поліклональні антитіла демонструють високу специфічність до нативного ESR1 та можуть бути успішно використані в методах, що базуються на розпізнаванні просторової структури антигену, перш за все, імунопреципітації.

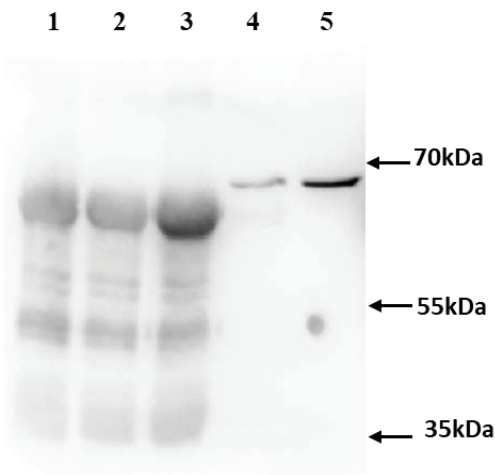


Рис. 3.6. Вестерн-блот-аналіз ESR1, імунопреципітованого за допомогою поліклональних мишачих антитіл проти повнорозмірного ESR1 з: 1 — лізату клітин MCF-7; 2 — MCF-7 (p70<sup>-</sup>, p85<sup>-</sup>, p60<sup>+</sup>/S6K1). 3 - контрольна імунопреципітація без лізату; 4 - лізат клітин MCF-7 (25 мкг); 5 - лізат сублінії MCF-7 (p70<sup>-</sup>, p85<sup>-</sup>, p60<sup>+</sup>/S6K1) (25 мкг). Детекція здійснена за допомогою мишачих моноклональних антитіл (Abcam, MA5-15689)

Оскільки створені поліклональні антитіла виявили активність лише в реакції імунопреципітації, було надалі продовжено роботу щодо отримання антитіл, здатних до розпізнавання ESR1 в умовах вестерн-блот-аналізу. З огляду на можливу деградацію N-кінцевої ділянки рекомбінантного ESR1 в процесі його очистки із лізатів бактерій-продуцентів було очищено окремо рекомбінантний протеїн, що відповідає N-кінцевій ділянці ESR1 і також містить 6xHis-послідовність (рис.3.7). Отриманий препарат використовували для імунізації мишей. На жаль в усіх трьох імунізованих тваринах навіть після п'яти раундів імунізації титр антитіл не сягав навіть  $10^{-2}$  і сироватки імунних тварин не розпізнавали антиген в вестерн блот аналізі. Поясненням може бути лише низька імуногенність N-кінцевої ділянки ESR1.

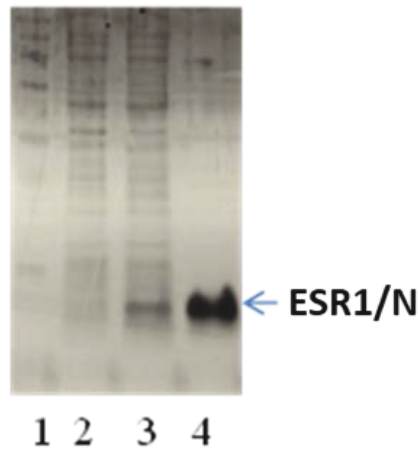


Рис. 3.7. Аналіз ефективності очистки ESR1/N-His з бактеріальних клітин продуцентів. Вестерн-блот-аналіз лізатів бактеріальних клітин до (2) та після індукції ПІТГ (3). Елюат ESR1/N-His з афінної колонки NiNTA (4)

#### 3.1.4. Аналіз можливості існування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1`

Дослідження можливості існування протеїнового комплексу між ізоформами ESR1 та S6K1 проводили з використанням методу імунопреципітації. Гіпотетичний комплекс преципітували як з використанням отриманих поліклональних антитіл проти ESR1, так і отриманих раніше поліклональних антитіл проти S6K1, специфічних до його С-кінцевої ділянки. Отримані преципітати аналізували надалі методом вестерн блот аналізу з використанням відповідно перевірених комерційних анти-ESR1 антитіл, або поліклональних анти-S6K1 антитіл. На жаль згідно представлених на рис. 3.8 даних в преципітаті ESR1 антитіл не було виявлено жодної з ізоформ S6K1, так само, як і в преципітаті анти-S6K1 не було виявлено ESR1 ізоформ навіть за умови використання тривалої експозиції.

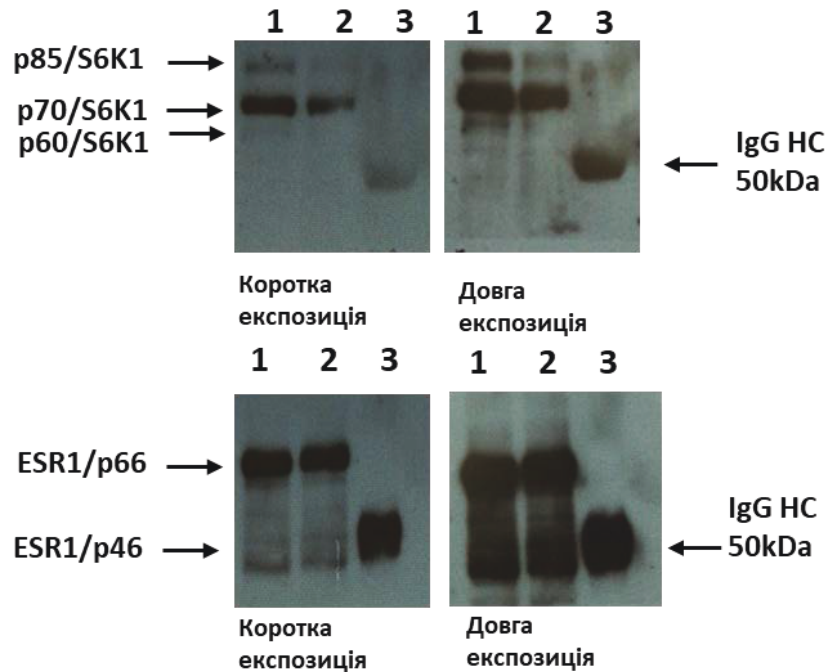


Рис. 3.8 Аналіз можливості існування протеїнового комплексу між ізоформами ESR1 та S6K1. Верхня панель: Вестерн-блот-аналіз іммунопреципітатів анти-ESR1 поліклональних антитіл з використанням анти-S6K1 поліклональних антитіл. Нижня панель: Вестерн-блот-аналіз іммунопреципітатів анти-S6K1 поліклональних антитіл з використанням анти-ESR1 поліклональних антитіл. 1- лізат до преципітації; 2- лізат після преципітації; 3- імунопреципітати

Таким чином, отримані результати свідчать або про низьку афінність взаємодії між протеїнами, або про короткотривалу взаємодію. Тим не менше створені поліклональні антитіла можуть бути використані для аналізу інших типів комплексів ESR1 з іншими протеїнами та ділянками ДНК.

**Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:**

1. A.V. Mazov, I. V. Kroupskaya. Generation and characterization of polyclonal antibodies specific to human estrogen receptor ER $\alpha$ . *Biotechnologia Acta* T. 17, No. 3, 2024, P. 59-65.

### 3.2 Створення та характеристика клітинних моделей MCF-7 із диференційною експресією ESR1 з використанням CRISPR/Cas9-системи редагування геному

**3.2.1. Створення субліній клітин MCF-7 методом CRISPR/Cas9 редагування гена естрогенового рецептора (ESR1).** Для дослідження функціональних зв'язків між естрогеновим рецептором та ізоформами кінази рибосомного білка S6 було створено сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією гена *ESR1*. Для цього було застосовано систему геномного редагування CRISPR/Cas9. Дизайн гідРНК (gRNA) здійснювали з використанням онлайн-інструменту CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu/>).

**3.2.1.1. Генерація субліній клітин MCF-7 із порушеною експресією ESR1 за допомогою системи CRISPR/Cas9.** Для створення субліній клітин MCF-7 ми впровадили систему редагування генів CRISPR/Cas9, використовуючи два набори праймерів gRNA, специфічних до таргетної послідовності ДНК гена ESR1 (окремо та в комбінації), які представлені в табл.3.1, і були розташовані в межах Ex1 гена ESR1. Спочатку нами був проведений дизайн gRNA олігонуклеотидів довжиною 20 п.о. (опис дизайну даний у розділі «Матеріали і методи»).

Таблиця 3.1

Послідовності олігонуклеотидів для клонування gRNA

	Верхній ланцюг	Нижній ланцюг
gRNA1	CACCGCGCGGCGTTGAACTCGTAGG	AAACCCTACGAGTTCAACGCCGCGC
gRNA2	CACCGGCCGTGTACAACSTACCCCGA	AAACTCGGGGTAGTTGTACACGGCC

ДНК в складі вектора pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, який кодує ендонуклеазу Cas9 разом із вбудованими RNA-олігонуклеотидами, за допомогою трансфекції була уведена в клітини MCF7.

Після селекції індивідуальних клонів за допомогою антибіотика ефективність нокауту ESR1 у вибраних клонах аналізували за допомогою вестерн-блот-аналізу лізатів відселектованих клітин з використанням моноклональних антитіл, специфічних до С-кінцевої ділянки білка ESR1. На рис. 3.9, представлено результати аналізу декількох відібраних субліній клітин MCF7 з різним ступенем зниження регуляції ESR1.

Клітини MDA-MB-231 та сублінії MCF-7 з фенотипом S6K1/p85-/p70-/p60+, які проявляють сильні ознаки EMT і при цьому не експресують ESR1, були використані як контрольні клітини. Серед шести відібраних субліній клітин MCF-7, експресія повнорозмірної ізоформи ESR1 (p66) була значно знижена лише у двох сублініях (№7 та №9), створених з використанням gRNA1. У решті відібраних субліній, створених з gRNA2 (№1, №14) або комбінацією gRNA1 та gRNA2 (№12, №13), спостерігалось лише часткове зниження регуляції експресії p66 ESR1.

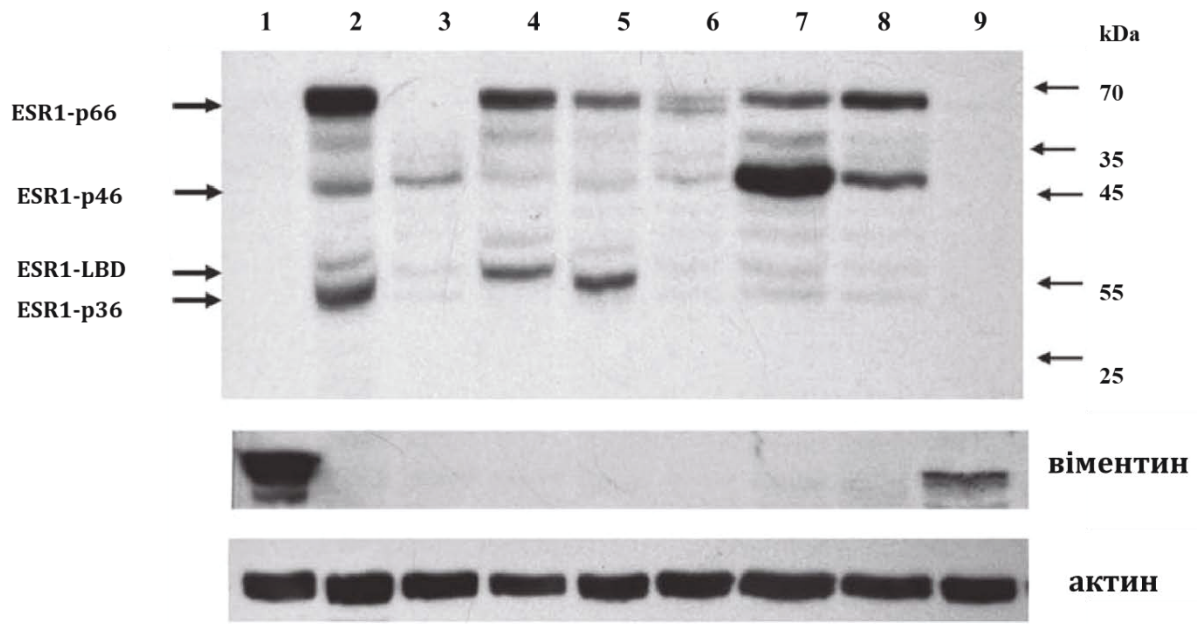


Рис. 3.9 Створення субліній клітин MCF-7 за допомогою CRISPR/Cas9-системи редагування геному з диференційною експресією ізоформ ESR1. Вестерн-блот-аналіз експресії ESR1 у різних клітинних лініях та сублініях MCF-7 з використанням моноклональних антитіл проти ESR1, специфічних до С-кінцевої ділянки (Верхня панель). Середня панель – вестерн-блот-аналіз експресії віментину. Нижня панель – експресія  $\beta$ -тубуліну. 1 - MDA MB 231, 2 - MCF-7, 3-8 - сублінії MCF-7 з диференційною експресією ESR1: 3 - MCF-7/9, 4 - MCF-7/14, 5 - MCF-7/1, 6 - MCF-7/7, 7 - MCF-7/12, 8 - MCF-7/13, 9 - клітини сублінії MCF-7 з фенотипом S6K1/p85-/p70-/p60+. Субклони MCF-7, отримані з використанням: gRNA #1 – 9 та 7; gRNA#2 – 1 та 14; комбінація gRNA №1 та №2 – 12 та 13

Крім того, моноклональні антитіла проти ESR1 виявляли і інші ізоформи ESR1, що мають С-кінцеві ділянки. Зокрема, імунореактивна смуга з електрофоретичною рухливістю близько 46 кДа може відповідати відомій сплайсовій ізоформі ESR1/p46. Інша імунореактивна смуга з рухливістю біля 36

кДа може відповідати відомим ізоформам ESR1/p36 або ESR1-LBD, які дуже схожі за розміром (рис. 3.8).

Експресія ізоформи ESR1 36 кДа зберігалася в сублініях MCF7/1 та MCF7/14 (створених за допомогою gRNA2), але повністю зникла в сублініях, створених за допомогою gRNA1 (№9, №7) або комбінації обох gRNA (№12, №13). Експресія ізоформи p46 ESR1 була дещо знижена у більшості клонів; однак, коли застосовували як gRNA1, так і gRNA2, вміст цієї ізоформи в клітинах збільшувався в декілька разів. Отримані результати демонструють, що різні gRNA, спрямовані на сусідні ділянки Ex1, мають різний вплив на експресію ізоформ ESR1. Приймаючи до уваги існування множинних ізоформ ESR1, що в більшості не охарактеризовані, щодо їхньої функціональної активності, і які утворюються в результаті трансляції сплайсових форм мРНК, можна передбачити, ділянки таргетування gRNA якимось чином впливають на специфіку чи на ефективність сплайсингу мРНК. Крім того, не можна виключити і існування регуляторного механізму на рівні трансляції. Це стосується суттєвого підвищення експресії p46-ізоформи, регуляція якої може відбуватися саме на рівні трансляції.

Для з'ясування цього питання було проведено ПЛР-аналіз кДНК, отриманої з вихідних клітин MCF7 та субліній з CRISPR/Cas9 з редагованою геномною ДНК гена ESR1. Аналіз експресії ESR1 у сублініях MCF-7/9 та MCF7/12, які суттєво відрізнялися за експресією p66 та p46, виявив суттєве підвищення вмісту мРНК для ESR1 лише в сублінії №12 (рис. 3.10) для якої було встановлено підвищення експресії p46 форми. Таким чином, можна зробити висновок, що збільшення вмісту p46 на білковому рівні, згідно даних вестерн блот аналізу (рис. 3.9), ймовірно відбувається через підвищену експресію мРНК ESR1 з подальшим використанням альтернативного старту трансляції для p46 ізоформи.

Основною ж метою цього дослідження було створити сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією естрогенового рецептора ESR1 для подальшого дослідження його впливу на функціональну активність ізоформ S6K1. Слід зазначити, що за даними, отриманими у відділі сигнальних систем клітини раніше, диференційна експресія ізоформ S6K1, а саме p60, p70 та p85, має вплив на експресію естрогенового рецептора. Встановлено, що пригнічення експресії p70 та p85 ізоформ призводить до суттєвого пригнічення експресії ESR1 і до ініціації епітеліально-мезенхімного переходу (EMT). Цікаво, що пригнічення експресії всіх ізоформ чи вибіркоче пригнічення лише p85 ізоформи такого ефекту не мало. Ці дані свідчать про важливу роль ізоформ S6K1 в регуляції активності ESR1 на рівні транскрипції гена, адже ПЛР-аналіз показав, що пригнічення ESR1 на рівні білка супроводжується пригніченням експресії відповідної мРНК ESR1. Створення стабільних субліній з пригніченням або диференційною експресією ESR1 створило можливість перевірки гіпотези, чи відбувається ініціація EMT, індукована змінами в експресії ізоформ S6K1 за участі ESR1. Для з'ясування цього питання ми проаналізували експресію кількох маркерів EMT у клонах №9 та №12, де було виявлено найбільш значущі зміни в експресії ESR1. Спочатку було проаналізовано вміст цитоскелетного білка віментину (рис. 3.9, середня панель), який замінює цитокератини в клітині під час EMT і є одним із ключових маркерів мезинхімальних клітин. Згідно з отриманими даними, віментин було детектовано лише в контрольних клітинних лініях, а саме MDA-MB-231 та MCF-7/S6K1/p85-/p70-/p60+ з попередньо підтвердженим статусом EMT. Віментин не було виявлено в жодній з відібраних субліній, в тому числі і з використанням альтернативного підходу — ПЛР-аналізу кДНК отриманих субліній клітин. Крім того, ПЛР-аналіз показав, що експресія двох інших маркерів EMT, E-кадгерину та N-кадгерину, що кодуються генами *CDH1* та *CDH2*, відповідно, залишилася незмінною (рис. 3.10). Не було виявлено

характерного для ЕМТ зниження експресії гена *CDH1* та підвищення експресії *CDH2*. Натомість експресія маркера епітеліальних клітин гена *CDH1* навіть дещо збільшилася.

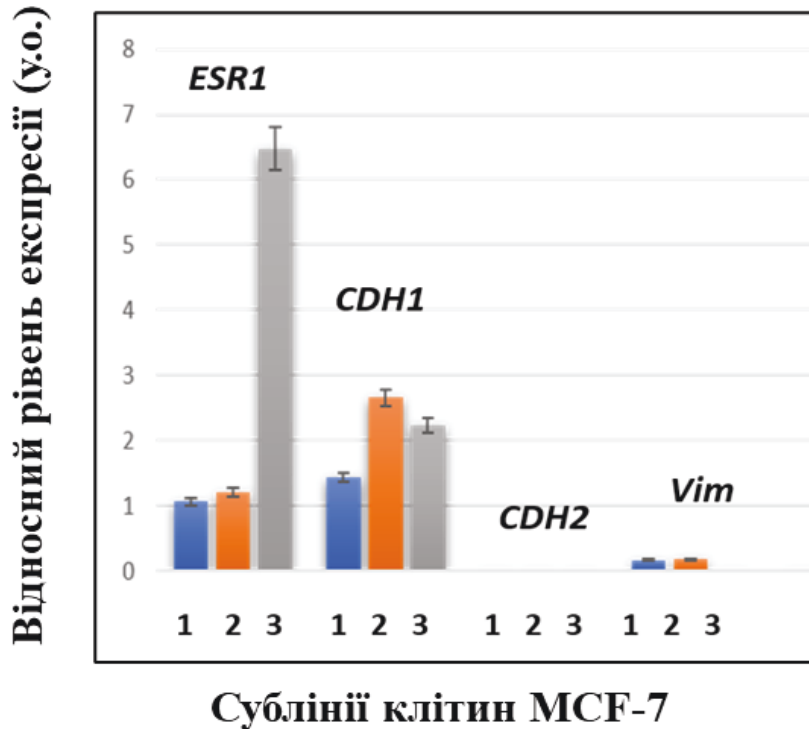


Рис.3.10 ПЛР-аналіз експресії генів, пов'язаних з ЕМТ (*CDH1*, *CDH2* та *Vim*), у клітинах MCF-7 та сублініях MCF-7 з порушеною експресією *ESR1*. 1 – MCF-7; 2 – сублінія MCF-7/9; 3 – сублінія MCF-7/12

Як відомо, *ESR1*-залежний сигнальний шлях відіграє вирішальну роль у прогресуванні раку молочної залози людини та є основною терапевтичною мішенню для *ESR1*-позитивних пухлин, які становлять близько 75% випадків раку грудної залози. *ESR1* має цілу низку сплайсових ізоформ, які завдяки різним комбінаціям функціональних доменів можуть виконувати різні клітинні функції [66]. Однак слід зазначити, що більшість із ідентифікованих сплайсових ізоформ схематично представлених в розділі літературного огляду не досліджені глибоко на рівні протеїну і тобто їхня функціональна активність

є незасованою. Найбільш дослідженою є ізоформа p66 ESR1 яка функціонує як транскрипційний фактор, що регулює експресію численних генів, що беруть участь у канцерогенезі, ліганд-залежним чином. Нещодавно виявлено ізоформу ESR1-LBD, що має молекулярну масу близько 36 кДа і, як було показано, сприяє проліферації раку грудної залози та надає ендокринної резистентності злоякісній пухлині. Крім того, є відомості, що сплайсові ізоформи p36 та p46 ESR1 залучені до передачі сигналу через mTOR/S6K1 сигнальний каскад [66]. Згідно з даними літератури, ESR1, як транскрипційний фактор, може впливати на експресію S6K1, яка, у свою чергу, також може впливати на активність ESR1 шляхом фосфорилування, що призводить до транскрипційної активації ESR1 [67,68].

Як вже було зазначено, в відділі сигнальних систем клітини було продемонстровано, що зміна балансу в експресії ізоформ S6K1, зокрема p85, p70 та p60, через CRISPR/Cas9-опосередковане таргетування альтернативної трансляції мРНК S6K1 в лінії клітин аденокарциноми грудної залози MCF-7, має виражений негативний вплив на експресію гена ESR1. Ця зміна призводила до нокаута ізоформ ESR1, що супроводжувалося ініціацією EMT [59, 60]. Наші висновки частково підтверджуються іншими дослідженнями, які показують, що EMT може бути ініційований експресією активованої форми S6K1 як у клітинах карциноми грудної залози, так і яєчників [57, 69,70]. Примітно, що незалежні дослідження також показують, що пригнічення ESR1, опосередковане siRNA, може ініціювати EMT в тих самих лініях клітин раку грудної залози [71,72]. Однак жодне із досліджень не було зосереджене на змінах в експресії ізоформ ESR1. У цьому дослідженні ми створили сублінії клітин MCF-7 з порушеною експресією ESR1 за допомогою системи редагування генів CRISPR/Cas9. Застосовуючи дві різні послідовності, що націлюють gRNA, в Ex1, ми створили клітинні лінії з майже повним або частковим зниженням регуляції ізоформи p66 ESR1. Цікаво, що у випадках

сильного пригнічення експресії ESR1-p66 також були порушені варіанти сплайсингу, що розпізнаються С-кінцевими антитілами (36 та 46 кДа). У випадках часткового зниження рівня p66, ймовірно, через таргетування лише на одного алеля, вміст ізоформи ESR1 36 кДа залишався незмінним, тоді як експресія ізоформи ESR1 p46 була значно підвищеною, що продемонстровано як вестерн-блоттингом, так і ПЛР в реальному часі. Підвищення експресії ізоформи p46 також корелювало зі зниженням вмісту ізоформи ESR1 36 кДа. Ці результати свідчать про те, що ізоформа ESR1 p66 може впливати на сплайсинг та транскрипцію мРНК ESR1, як показано аналізом кількісного ПЛР з використанням олігонуклеотидного зонда, що охоплює область з'єднання Ex4 та Ex5, присутнього в ізоформах мРНК p66 та p46 (рис. 1.3). Ми передбачали, що використання олігонуклеотиду, спрямованого на ділянку з'єднання екзонів Ex1 та Ex2 в мРНК ESR1, які відсутні в мРНК ізоформи ESR1 p46 кДа, не виявить підвищеної експресії ESR1 у сублінії №12. Натомість таке підвищення було виявлено і свідчить про існування компенсаторного механізму, спрямованого на підвищення транскрипції гена ESR1 і водночас на ефективне використання альтернативного старту трансляції для синтезу більшої кількості p46-ізоформи ESR1.

Несподівано, наш аналіз впливу зниження експресії ESR1 не виявив ознак ЕМТ і не виявив помітного впливу на експресію маркерів ЕМТ, всупереч попереднім твердженням літератури [71, 72]. Цю розбіжність з даними літератури можна пояснити використанням різних методів порушення експресії ESR1. В нашому дослідженні ми застосовували систему редагування генів CRISPR/Cas9 як альтернативу мРНК-інтерференції опосередкованої shRNA на яке є посилання в літературі. Враховуючи, що старту трансляції мРНК-ізоформ ESR1 46 кДа та 36 кДа розташовані поза Ex1 (рис.1.2), це може пояснити, чому їхня експресія менш чутлива до редагування генів, ніж у p66. Можливо, що будь-яка з виявлених ізоформ ESR1, експресія яких не зазнала

впливу редагування генів, може бути вирішальною для ініціації EMT, хоча ця гіпотеза потребує подальшого підтвердження.

Загалом, з використанням системи редагування геному CRISPR/Cas9 було створено сублінії клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ ESR1. В сублінії MCF-7/9 було повністю пригнічено експресію головної форми ESR1 – p66. В сублінії клітин MCF-7/12, експресію p66/ESR1 було пригнічено майже на 50%. Пояснити це можна тим, що редагування відбулося лише в одному алелі гена. В цій же сублінії було суттєве збільшення експресії p46 ESR1 на рівні протеїну і мРНК, за даними ПЛР-аналізу. Створені клітинні моделі будуть використані надалі для оцінки активності ізоформ ESR1, зокрема в контексті регуляції EMT та їх функціонального зв'язку з ізоформами S6K1.

### **Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:**

1. L. O. Savins'ka, S. A. Kvitchenko, S.S. Palchevskiy, I. V. Kroups'kaya, A. V. Mazov, O. M. Garifulin, V. V. Filonenko. Generation of the MCF-7 cell sublines with CRISPR/Cas9 mediated disruption of estrogen receptor alfa (ESR1) expression. Ukr. Biochem. J., (2024); 96(6):29-35.
2. A. V. Mazov Differential effects of S6K1 isoforms on EMT-related gene expression in MCF-7 cells. Proceedings of the XVI Annual Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics (Kyiv, 2021). Biopolymers and Cell. 2021. Vol. 37. N3.

### **3.3. Вплив редагування гена *ESR1* на S6K1-залежне сигналювання в клітинах MCF-7**

В попередньому підрозділі 3.2 були представлені дані стосовно створення субліній MCF-7 з повним блокуванням та частковим зниженням

експресії повнорозмірної ізоформи p66 ESR1 (клони MCF-7/9 та MCF-7/12, відповідно). Важливо нагадати, що в сублінії MCF-7/12 додатково зі зниженням експресії p66 ESR1 було виявлено значне збільшення вмісту ізоформи p46 ESR1, що свідчить про створення моделей клітин для визначення функціональної ролі двох ізоформ ESR1, а саме для аналізу впливу пригнічення експресії ESR1/p66 та підвищення експресії p46 ESR1 ізоформ на поведінку клітин. Враховуючи існуючий за даними літератури функціональний зв'язок між ESR1 та S6K1, ми мали на меті в першу чергу проаналізувати, як зміни в експресії ізоформ ESR1 впливають на S6K1-залежну сигналізацію, включаючи експресію S6K1. Для цього було досліджено сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією ESR1 за різних умов росту, за яких відбуваються зміни в S6K1-залежному сигналюванні.

Згідно даних представлених на рис. 3.11, зниження експресії ізоформи p66 ESR1 супроводжує пригнічення експресії S6K1 у клітинах MCF-7 (клон №9), що було виявлено за допомогою антитіл проти S6K1.

Ймовірно, це головна причина, чому рівень фосфорилювання обох ізоформ S6K1 (p70 та p85) за ключовим для їхньої активності сайтом фосфорилювання (Thr389) також пропорційно знижувався. У випадку часткового зниження експресії p66 ESR1 та підвищення регуляції експресії ізоформи p46 у клоні №12, рівень експресії S6K1 та його загальний статус фосфорилювання залишалися незмінними.

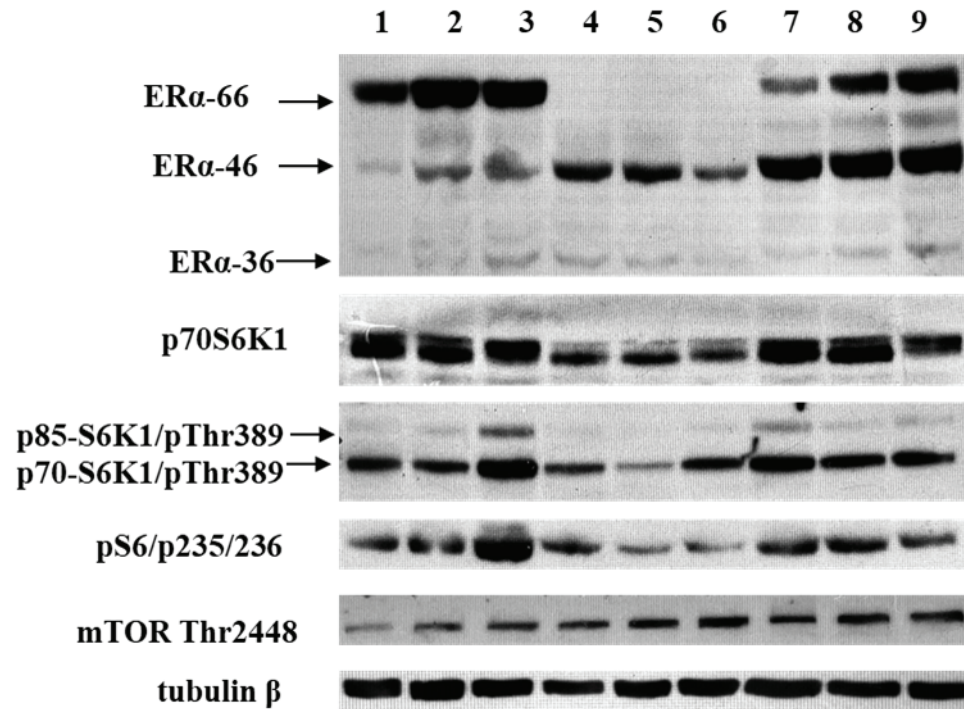


Рис. 3.11 Аналіз впливу ESR1 на mTOR/S6K1-залежну сигналізацію в сублініях MCF-7 з CRISPR/Cas9-опосередкованим редагуванням гена ESR1 за різних умов росту клітин. Вестерн-блот-аналіз експресії ESR1 та S6K1, а також фосфорилування S6K1, S6 та mTOR за зазначеними сайтами у різних сублініях MCF-7. Експресію  $\beta$ -тубуліну використовували як контроль навантаження. Доріжки: 1, 4, 7 — інтактні клітини, що ростуть у середовищі з 10% FBS; 2, 5, 8 — клітини після 18 годин росту в середовищі, збідненому на FBS (1%); 3, 6, 9 — клітини після 18 годин росту в середовищі, збідненому на FBS (1%), з подальшою 1-годинною стимуляцією FBS (10%). MCF-7 wt — лінії 1–3. Клітини сублінії MCF-7/9 — доріжки 4–6. Клітини сублінії MCF-7/12 — доріжки 7–9

Подальші дослідження показали, що зниження S6K1 на рівні білка корелює зі зниженням експресії його мРНК. Згідно з даними кількісної ПЛР (рис. 3.12), експресія двох основних сплайсових мРНК S6K1, відповідальних

за трансляцію всіх трьох ізоформ S6K1 (p60, p70, p85) або лише p60 ізоформ S6K1, була знижена.

Незважаючи на пригнічення експресії фосфорилювання S6K1 в клітинах сублінії MCF-7/9 порівняно з вихідними клітинами MCF-7 динаміка активації S6K1 в них після голодування була досить схожою з контрольними клітинами і як і очіувалося, продемонструвала збільшення рівня фосфорилювання одного з ключових сайтів для її активності (Тре389) після стимуляції FBS порівняно з інтактними клітинами. Примітно, що в клітинах сублінії MCF-7/12 з підвищеною експресією p46 ESR1 було виявлено уповільнену динаміку активації S6K1 за умови стимуляції клітин FBS після росту в середовищі, збідненому за FBS. Навіть після 1 години стимуляції FBS, рівень фосфорилювання був нижчим, ніж в інтактних клітинах на відміну від вихідних клітин MCF-7 та клітин сублінії MCF-7/9. Варто зазначити, що водночас динаміка фосфорилювання рибосомного білка S6, який є найбільш вивченим субстратом S6K1, зазнала подібного впливу в обох сублініях, що демонструє затримку активації після стимуляції FBS.

Враховуючи, що mTOR є ключовим регулятором фосфорилювання S6K1 у положенні Thr389, ми проаналізували, як зміни експресії ESR1 впливають на активність mTOR. Згідно з даними на рис. 3.11 суттєвих відмінностей у фосфорилюванні mTOR між MCF-7 wt та MCF-7 сублініями MCF-7/9 і MCF-7/12 не було виявлено.

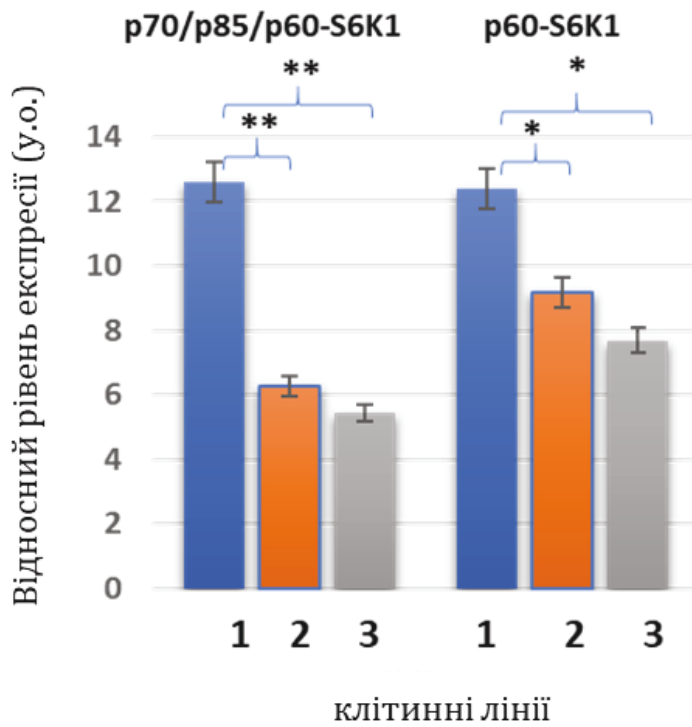


Рис. 3.12. ПЛР-аналіз експресії ізоформ S6K1 (p70/p85/p60 та p60) у клітинах MCF-7 та сублініях MCF-7 з порушеною експресією ESR1. 1 — MCF-7 wt; 2 - сублінія MCF-7/9; 3 – сублінія MCF-7/12. (\*) —  $p < 0,05$ . (\*\*) —  $p < 0,01$

Подальші дослідження показали, що зниження експресії S6K1 та його загального фосфорилування у положенні Тре389 у MCF-7 сублінії №9 негативно впливало на проліферацію клітин. Однак статистично значуща різниця була продемонстрована лише між сублініями №12 та №9 (рис. 3.13).

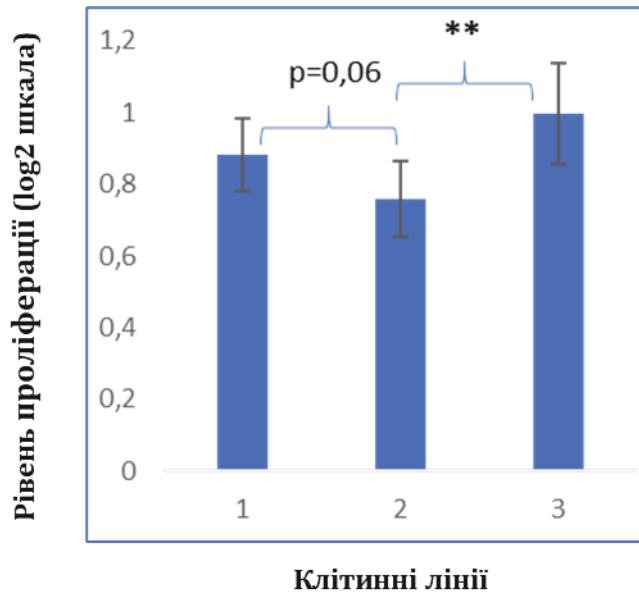


Рис.3.13. Вплив диференційної експресії ізоформ ESR1 на проліферацію клітин MCF7. Визначення рівня проліферації клітин субліній MCF-7 - MCF-7 wt (1); MCF-7/9 (2); MCF-7/12 (3). Швидкість проліферації базується на нахилах лінійної шкали  $\log_2$  проліферації відповідних клітинних ліній у різні моменти часу (0 год, 24 год, 48 год, 72 год) та відображає їх індекс часу подвоєння. Для оцінки життєздатних клітин було використано аналіз резазурину. Коефіцієнти швидкості проліферації представляють індекс часу подвоєння відповідної клітинної лінії. (\*\*) —  $p < 0,01$

Водночас зміни в експресії ESR1 негативно впливали на міграцію обох клонів, зі статистично значущою різницею між клітинами MCF-7 wt та клітинами сублінії MCF-7/9, що свідчить про причетність р66 ESR1 до цього процесу (рис. 3.14).

Згідно з нашими попередніми дослідженнями, зміни в експресії ізоформ S6K1 можуть спричинити повне пригнічення експресії ESR1 та ініціювати EMT, що було підтверджено за змінами в експресії основних маркерів EMT [60]. Тим не менш, як було продемонстровано в розділі 3.2, пряме зниження експресії ESR1 шляхом редагування його гена з використанням системи

геномного редагування CRISPR/Cas9 недостатньо для ініціації EMT за аналізом ключових маркерів EMT.

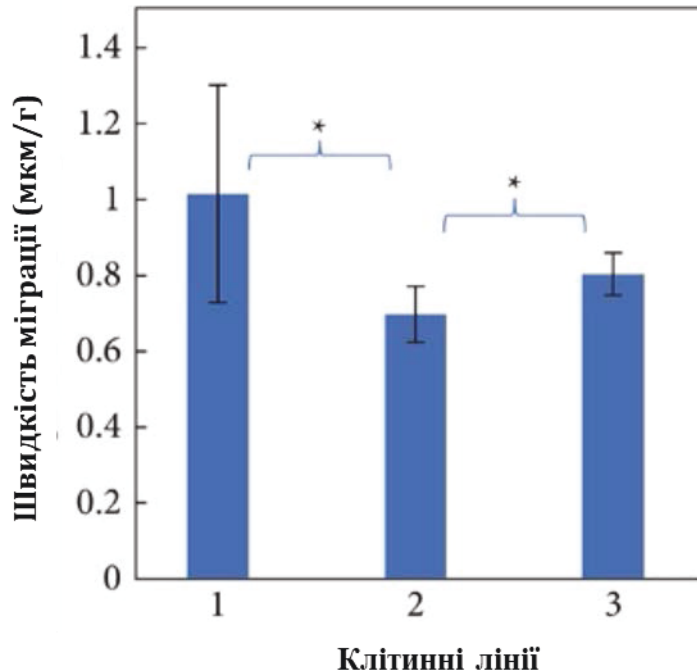


Рис. 3.14. Вплив експресії ізоформ ESR1 на рухливість клітин MCF7.

Визначення швидкості міграції клітинних субліній MCF-7 з використанням методу ранової поверхні. 1 — MCF-7 wt; 2 — сублінія MCF-7/9; 3 — сублінія MCF-7/2; (\*) —  $p < 0,05$

Однак крім них зміни в експресії ізоформ S6K1, крім пригнічення експресії ESR1 та експресії маркерів EMT, призводили до змін експресії інших маркерів пухлинного росту, а саме карциноембріонального антигену (CEA/CD66e) та молекули адгезії епітеліальних клітин (EpcAM/CD326). Приймаючи це до уваги, нами було перевірено, чи можливо ці зміни пов'язані зі змінами експресії ESR1. Для цього було перевірено експресію зазначених протеїнів в сублініях MCF-7 з диференційною експресією ізоформ ESR1 - MCF-7/9 та MCF-7/2 порівняно з MCF-7 wt. Згідно з даними вестерн-блот-

аналізу було виявлено суттєве зниження СЕА у сублініях MCF-7/9 та помірне зниження ЕрСАМ в обох сублініях (рис. 3.15).

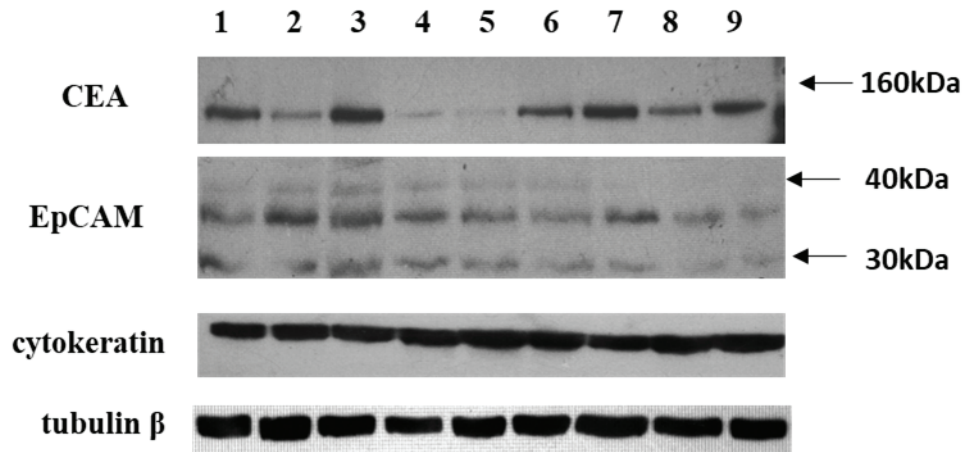


Рис.3.15. Вплив диференційної експресії ізоформ ESR1 на експресію клітинних маркерів, що експресують клітини MCF-7. Вестерн-блот-аналіз СЕА, ЕрСАМ та цитокератину-18 у клітинах MCF-7 різних субліній. Доріжки: 1, 4, 7 — інтактні клітини, що культивували у середовищі з 10% FBS; 2, 5, 8 — клітини після 24 годин росту у середовищі, збідненому на FBS (1%); 3, 6, 9 — клітини після 18 годин росту у середовищі, збідненому на FBS (1%) і з подальшою 1-годинною стимуляцією FBS (10%); MCF-7 wt (1-3); сублінія MCF-7/9 (4-6); сублінія MCF-7/12 (7-9)

Таким чином, проаналізовано вплив змін експресії гена ESR1 в клітинах MCF-7 на активність та експресію S6K1 за різних умов росту, а також на функціональні показники клітин, як то проліферація та міграція, що є одними з вирішальних факторів пухлинного росту. Для цього було досліджено модельні лінії клітин MCF-7 з диференційною експресією ESR1.

Враховуючи існуючі дані, щодо функціонального зв'язку між ESR1 та S6K1, які стосуються в першу чергу регуляції з ESR1 з боку S6K1 шляхом фосфорилування Ser167, що задіяний в регулюванні ядерно-

цитоплазматичної локалізації ESR1 [53, 73], на меті було дослідити як зміни в експресії ізоформ ESR1 впливають на S6K1-залежну сигналізацію та як це може впливати на ініціацію EMT, на експресію молекул клітинної адгезії важливих для процесів інвазії та метастазування пухлинних клітин, а також на проліферацію та міграцію, що визначають пухлинну прогресію. Представлені результати (рис. 3.9, 3.10) демонструють, що інактивація повнорозмірної ізоформи p66 ESR1 у клітинах MCF-7 призводить до значного зниження експресії S6K1 як на рівні мРНК, так і білка. За нашими даними, експресія двох основних мРНК S6K1, відповідальних за трансляцію ізоформ S6K1 (p60, p70 та p85), або мРНК, що кодує лише ізоформу p60S6K1, була знижена. Ці результати узгоджуються з встановленою функцією ESR1 як ліганд-активованого ядерного рецептора, який прямо чи опосередковано регулює транскрипцію численних генів, задіяних у проліферації та виживанні клітин раку молочної залози [74, 75]. Наші дані надають додаткові докази того, що ESR1 може безпосередньо впливати на експресію S6K1 на транскрипційному рівні. Зниження рівня експресії S6K1 та його фосфорилування як ключового компонента сигнального шляху mTOR, відповідального за регуляцію біосинтезу білка та росту клітин [76], може пояснити зміни в проліферації та міграції клітин, що спостерігалися в цьому дослідженні для сублінії MCF-7/9. На противагу цьому, в сублінії MCF-7/12, яка характеризується лише частковим зниженням експресії основної p66 форми ESR1 та підвищеною експресією ізоформи p46 ESR1, експресія S6K1 залишилася незмінною і без суттєвих змін у її загальному статусі фосфорилування. Це свідчить про те, що ізоформа p46 ESR1 або не впливає на базальний рівень експресії S6K1, або здатна компенсувати дефіцит p66 ESR1 у цьому відношенні. Ізоформа p46 ESR1, яка може походити з внутрішнього, альтернативного сайту ініціації трансляції, часто асоціюється з відмінними функціональними властивостями порівняно з p66, включаючи відсутність ліганд-зв'язуючої домену та

потенціал для ліганд-незалежної сигналізації, що може впливати на проліферацію пухлинних клітин, а отже і на ефективність відповіді на терапію на рівні пухлини грудної залози [76, 77].

Незважаючи на відсутність змін в експресії S6K1 у сублінії MCF-7/12, ми виявили значні зміни в динаміці активації S6K1 у відповідь на стимуляцію FBS після культивування в середовищі, збідненому на FBS. Фосфорилування за Тре389 є прямим та широко використовуваним індикатором активації S6K1 за допомогою mTORC1 [76, 78], і цей результат є дуже цікавим, оскільки він свідчить про те, що ізоформа p46 ESR1 може впливати на чутливість або ефективність активації S6K1, впливаючи на ефектори S6K1 на тлі незмінного рівня експресії S6K1, і тим самим впливати на сигналізацію S6K1. Це може бути пов'язано з порушенням інтеграції сигналів від рецепторів факторів росту або зміною внутрішньоклітинних механізмів, що регулюють активацію S6K1, потенційно через зміни кінетики взаємодії з mTOR або іншими регуляторними білками.

Також було досліджено, як зміни в експресії ESR1 впливають на активність mTOR, оскільки mTOR є ключовим регулятором S6K1 шляхом фосфорилування S6K1 у положенні Тре389 [17, 78]. Згідно з даними, представленими на рис. 3.9, не було виявлено суттєвих відмінностей у фосфорилуванні mTOR у положенні Сер2448, що вказує на його активність, між клітинами дикого типу MCF-7 та їх сублініями. Це свідчить про те, що порушення активації S6K1, що спостерігаються у сублінії MCF-7/12, ймовірно, не зумовлені прямими змінами самої активності кінази mTOR. Натомість вони можуть відображати зміни в доступності S6K1 для фосфорилування mTOR, зміни в локалізації білка або інші посттрансляційні модифікації, що впливають на взаємодію S6K1 з mTOR або іншими регуляторами.

Як відомо ранні дослідження спочатку визначили Akt як основного кандидата для фосфорилування mTOR за Сер2448; однак, пізніші, більш

детальні дослідження встановили, що кіназа p70S6 (S6K1) є основною кіназою в цьому процесі [79]. Тому, наші поточні результати є дещо несподіваними, оскільки вони не виявили кореляції між пригніченням S6K1 та фосфорилюванням mTOR за Ser2448.

Натомість, наші дані свідчать про те, що за певних умов Akt може компенсувати відсутність S6K1 шляхом фосфорилювання mTOR за Ser2448. Крім того, деякі дослідження вказують на те, що інші кінази, такі як ERK1/2 (MAPK), можуть бути залучені до фосфорилювання Ser2448, особливо в певних контекстах або у відповідь на певні стимули [78, 80].

Зниження експресії S6K1 та його загального фосфорилювання за Тре389 у сублінії MCF-7/9 було пов'язане з уповільненням руху клітин та зменшенням росту клітин (рис. 3.11, 3.12). Це вказує на важливу роль S6K1 у цих ключових процесах в пухлинах грудної залози, що добре підтверджується попередніми дослідженнями [81-83]. Згідно з нашими даними [60], зміни в експресії ізоформи S6K1, пов'язані зі зниженням експресії ESR1, можуть ініціювати епітеліально-мезенхімальний перехід, що було підтверджено змінами в експресії ключових маркерів EMT [60] і супроводжувалось втратою епітеліальних рис, підвищеною інвазивністю та прогресуванням пухлини [82, 83]. Ми спостерігали зниження СЕА у сублінії MCF-7/9 та зниження ЕрСАМ в обох сублініях (рис. 3.13). Ці результати додатково підтверджують, що зміни в експресії ESR1 можуть впливати на EMT через експресію генів, що беруть участь у регуляції клітинної адгезії, що є вирішальним фактором метастатичного потенціалу, і що різні ізоформи ESR1 можуть мати різні ефекти.

Таким чином, отримані дані підтверджують існування складного та багатогранного зв'язку між ізоформами ESR1, сигнальним шляхом S6K1 та ключовими аспектами поведінки клітин MCF-7. Повна інактивація p66 ESR1 призводить до значного зниження експресії S6K1, що, у свою чергу, негативно

впливає на проліферацію та рухливість клітин. Цікаво, що підвищена експресія ізоформи p46 ESR1, незважаючи на збереження загального рівня S6K1, порушує динаміку її активації, що свідчить про можливу регуляторну роль p46 ESR1 у модуляції клітинних відповідей на фактори росту. Ці висновки важливі для розуміння того, як різні ізоформи рецепторів естрогену впливають на ріст, агресивність та метастатичний потенціал клітин раку грудної залози, впливаючи на епітеліально-мезенхімальну пластичність клітин пухлини. Необхідні подальші дослідження для уточнення молекулярних механізмів, за допомогою яких ESR1 модулює активність S6K1 та впливає на EMT.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

L.O. Savinska, S.A. Kvitchenko, M.Ye. Martsynyuk, I.V. Kroupskaya, A.P.Pogribna, A. M. Mazov, O.M. Garifulin, V.V. Filonenko. ESR1 Gene Editing and its Impact on S6K1 Signaling and Cell Behavior. *Biopolymers and Cell*. 2025; 41(3):181.

#### **3.4. Вплив фосфорилування ESR1 за Сер 167 на S6K1-залежне сигналювання в клітинах MCF7**

Фосфорилування залишку серину в позиції 167 є другою за важливістю модифікацією рецептора естрогену альфа (ESR1), яка тісно взаємодіє з Сер 118, але має свої унікальні механізми активації. Як відомо, регуляція фосфорилування ESR1 за Сер118 переважно пов'язана зі шляхом MAPK,

натомість фосфорилування за Ser167 є головною мішенню для шляха PI3K/Akt/mTOR/S6K1.

Фосфорилування Ser118 та Ser167 відіграє критичну роль у «життєвому циклі» рецептора ESR1, зокрема в його здатності проникати в ядро та утримуватися там для регуляції експресії генів як транскрипційний фактор. Хоча ESR1 має власний сигнал ядерної локалізації (NLS), який дозволяє йому потрапляти в ядро навіть без впливу естрогену, фосфорилування значно прискорює цей процес. Ser118 та Ser167 змінюють конформацію рецептора, роблячи NLS більш «відкритим» для транспортних білків — імпортинів. Активація шляхів MAPK (для Ser118), або S6K1 (для Ser167) факторами росту стимулює швидке переміщення рецептора з цитоплазми до ядра, навіть якщо рівень естрогену в організмі мінімальний.

Як вже було зазначено, Ser167 фосфорилується переважно протеїнкіназою S6K1, хоча є відомості щодо такої активності і для Akt. Це створює прямий зв'язок між сигналами виживання клітини та гормональною активністю. Коли клітина отримує сигнали від інсуліну або факторів росту, активується S6K1, який фосфорилує Ser167, що, у свою чергу, призводить до активації ESR1 навіть за низької концентрації естрогену. Це пояснює, чому пухлини з гіперактивним mTOR часто демонструють високу активність естрогенових рецепторів, що сприяє швидкому росту ракових клітин. На відміну від деяких інших ділянок, фосфорилування Ser167 безпосередньо підвищує афінність (спорідненість) рецептора до естроген-чутливих елементів (ERE) на ДНК. Це робить рецептор «ефективнішим» у пошуку та зв'язуванні своїх генів-мішеней. Це також стабілізує комплекс рецептор-коактиватор.

Фосфорилування Ser167 часто вважається позитивним прогностичним маркером відповіді на ендокринну терапію (наприклад, за дії інгібіторів ароматази). Клітини, де ESR1 активується через Ser167, зазвичай залишаються «залежними» від рецептора. У лабораторній діагностиці рівень p-Ser167

використовується як непрямий показник того, що в пухлині активований mTOR/S6K1 сигнальний каскад. Оскільки Ser167 активується через mTOR, поєднання гормональної терапії з інгібіторами mTOR (наприклад, еверолімус) допомагає подолати стійкість, спричинену надмірним фосфорилуванням цього залишку. Хоча Ser118 і Ser167 можуть фосфорилуватися незалежно, часто вони працюють у тандемі. Подвійне фосфорилування за обома залишками призводить до максимальної транскрипційної активності ESR1.

З огляду на те, що ESR1 є субстратом для S6K1, а з іншого боку за представленими в попередніх підрозділах даними впливає на експресію S6K1, наступним завданням було проаналізувати роль фосфорилування ESR1 за ключовими для його активності сайтами Ser118 та Ser 167 в регуляції S6K1.

Для досягнення цієї мети на основі клітин сублінії MCF-7/9 з пригніченою експресією ESR1 було створено сублінії з відновленою експресією двох типів мутантних форм ESR1. В першій формі було мімікровано стан фосфорилування за Ser 167 шляхом її заміни на глютамінову кислоту (Ser167/Asp167). В другій формі було зроблено заміну Ser167 на Ala167 і таким чином унеможливлено фосфорилування за цим сайтом, що призводило б до зміни заряду і локальних перебудов, пов'язаних з активацією ESR1.

Результати представлені на рис. 3.16 свідчать про вплив фосфорилування ESR1 Ser167 на функціональний стан S6K1-сигналювання.

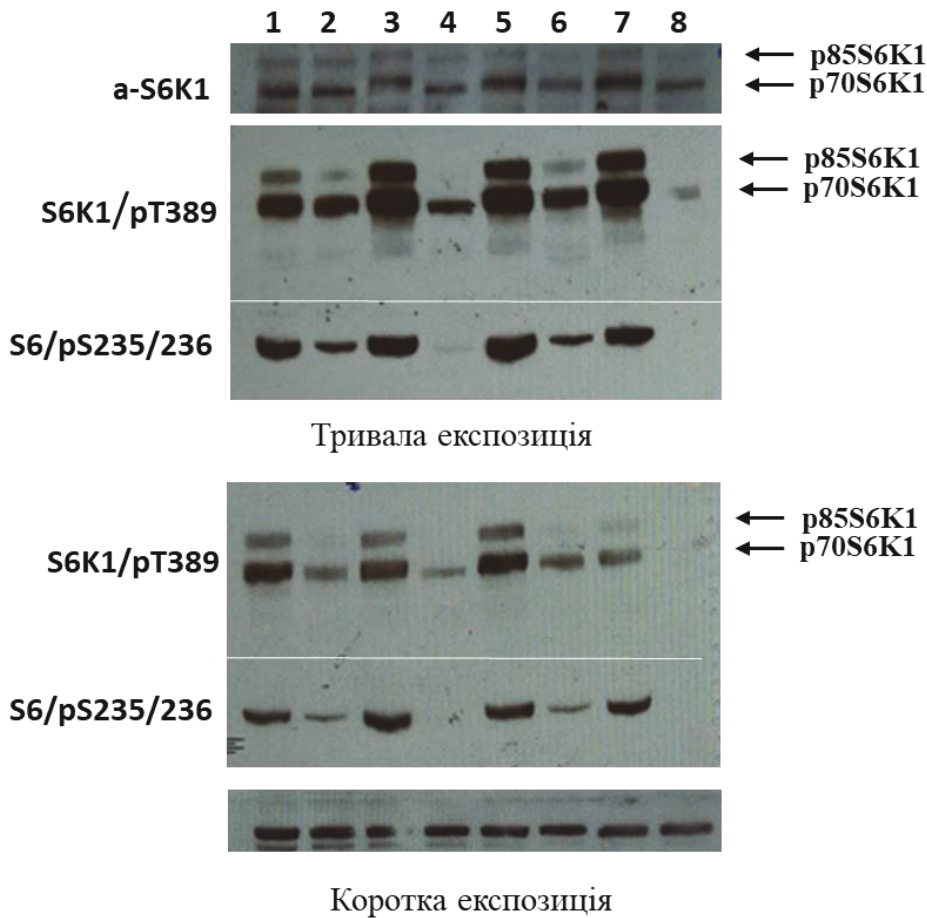


Рис.3.16. Роль фосфорилування ESR1 за Ser167 в регуляції активності S6K1. Вестерн блот аналіз лізатів клітин MCF7 (1-4) та сублінії MCF7/9 (5-8) з пригніченою експресією ендогенної форми ESR1 і стабільною експресією рекомбінантної мутантної форми ESR1/S167D за різних умов культивування: 1, 5 –інтактні клітини; 2,6 – культивування без ФБС; 3,7 – стимуляція ФБС; 3,8 – стимуляція ФБС з рапаміцином

Згідно з отриманими даними, за умови експресії мутантної форми ESR1 (Сер167/Асп167), що мімікрує стан фосфорилування за цим сайтом, відбувається підвищення фосфорилування S6K1 за ключовим для його активності сайтом Thr389. Однак при цьому знижується динаміка активації кінази після активації сироваткою в бік її уповільнення. Цікавим фактом є також те, що S6K1 стає більш чутливою до дії інгібітора mTOR рапаміцину,

що відображається як на фосфорилюванні S6K1, так і на фосфорилюванні її субстрата рибосомного білка S6.

Приймаючи до уваги представлені дані, щодо ролі фосфорилювання ESR1 за Ser167, надалі було перевірено вплив експресії іншої мутантної форми ESR1 (Ser167/Ала167) на активність S6K1. Ми сподівалися побачити протилежний результат, натомість виявилось, що експресія мутантної форми, для якої не передбачено фосфорилювання за Ser167, мала аналогічний ефект (рис.3.17). Таким чином, отримані результати вказують, що вирішальним у підвищенні активності S6K1 не є експресія форми ESR1, що мімікрує її фосфорилюваний стан і тим самим впливає на активність, в першу чергу сприяючи її транслокації до ядра. Мабуть, ефект, що спостерігається, пов'язаний насамперед з відновленням експресії ESR1 в клітинах сублінії MCF-7/9, де її експресія була попередньо блокована завдяки CRISPR/Cas9 редагуванню послідовності гена ESR1.

Отримані результати є багатообіцяючими в сенсі подальшого аналізу ролі ESR1 в регуляції активності S6K1, і вони є ще одним доказом взаємозв'язку між ESR1 та S6K1.

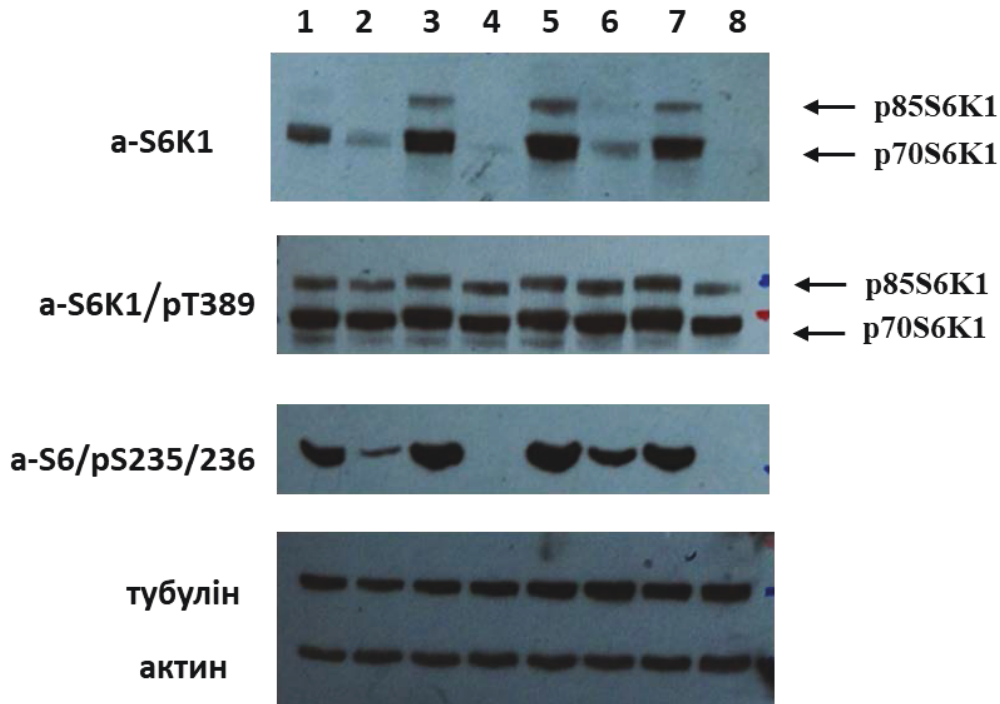


Рис.3.17. Роль фосфорилювання ESR1 за Сер167 в регуляції активності S6K1. Вестерн блот аналіз лізатів клітин MCF7 (1-4) та сублінії MCF-7/9 (5-8) з пригніченою експресією ендогенної форми ESR1 і стабільною експресією рекомбінантної мутантної форми ESR1/S167A за різних умов культивування: 1, 5 –інтактні клітини; 2,6 – культивування без ФБС; 3,7 – стимуляція ФБС; 3,8 – стимуляція ФБС з рапаміцином

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

1. Mazov, L.O., Savinska, S.S., Palchevskii, S.A., Kvitchenko, V.V., Filonenko. The role of S6K1 isoforms in regulating ESR1 phosphorylation at Ser118 and Ser167 sites crucial for its activity, and the reciprocal effect on S6K1 activity. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.

### 3.5. Вплив експресії ізоформ S6K1 на експресію та фосфорилування ESR1 за ключовими для активності сайтами - Ser118 та Ser167

В попередніх розділах було представлено дані, щодо впливу експресії ESR1 та її ізоформ на функціональний стан кінази рибосомного білка S6K1. Тож подальші дослідження були спрямовані на з'ясування зворотного зв'язку, а саме ролі ізоформ S6K1 в регуляції функціональної активності ESR1.

Як вже неодноразово було зазначено у відділі сигнальних систем клітини з використанням системи геномного редагування CRISPR/Cas9 було отримано сублінії клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ S6K1, а саме з фенотипами: p85<sup>-</sup>, p70<sup>+</sup>, p60<sup>+</sup>/S6K1 (скорочено F1), p85<sup>-</sup>, p70<sup>-</sup>, p60<sup>+</sup>/S6K1 (F2), p85<sup>-</sup>, p70<sup>-</sup>, p60<sup>-</sup>/S6K1 (F3). Саме в клітинах сублінії F2, де зберігалася експресія лише p60-ізоформи S6K1, було виявлено повне пригнічення експресії ESR1 [59], що супроводжувалося ініціацією EMT. В клітинах субліній F1 з пригніченням експресії лише p85 S6K1 та в клітинах сублінії F3, з пригніченням експресії всіх ізоформ, змін в експресії ESR1 не було виявлено. Було зроблено висновок, що ключовим є не просто пригнічення чи активація експресії тієї чи іншої з ізоформ S6K1, а саме зміна балансу в їхній експресії. Відповідно, нами було надалі проаналізовано експресію ESR1 в клітинах зазначених субліній методом вестерн-блот-аналізу, в тому числі і з відновленням експресії тієї чи іншої ізоформи. Результати досліджень представлено на рис. 3.18.

Як видно з представлених даних, як вже було раніше показано в клітинах з фенотипом p85<sup>-</sup>, p70<sup>+</sup>, p60<sup>+</sup>/S6K1 (F1) та p85<sup>-</sup>, p70<sup>-</sup>, p60<sup>-</sup>/S6K1 (F3) не відбувається змін в експресії ESR1. Натомість такі зміни відбулися в разі відновлення експресії ізоформ в клітинах з пригніченою експресією всіх ізоформ p85<sup>-</sup>, p70<sup>-</sup>, p60<sup>-</sup>/S6K1 (F3), однак вони стосувалися не всіх ізоформ.

Так, відновлення експресії p85 не впливало на експресію ESR1. Натомість відновлення експресії p70 чи p60 ізоформ помітно підвищувало вміст ESR1. Вміст рибосомного білка S6 використовували як контроль навантаження зразків на гель.

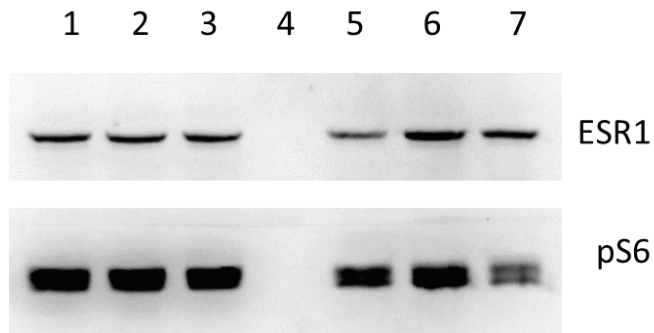


Рис. 3.18. Вплив експресії ізоформ S6K1 на експресію ESR1 на рівні протеїну. Вестерн-блот-аналіз лізатів клітин субліній MCF7 з диференційною експресією ізоформ S6K1 з використанням антитіл відповідної специфічності. 1 - MCF7wt, 2 - MCF/F1, 3 - MCF/F3, 4 - протеїнові маркери, 5 - MCF/F3 + p85/S6K1, 6 - MCF/F3 + p70/S6K1, 7 - MCF/F3 + p60/S6K1

Як відомо, одним із факторів регуляції активності ESR1 як транскрипційного фактора є його фосфорилування за Сер 167. Хоча точки зору на функціональне значення цієї події є досить протиречивими. Однак переважає думка, що це є одним із елементів активації ESR1, оскільки сприяє димеризації ESR1, що є запорукою його транспортування з цитоплазми до ядра. Так само є розбіжності щодо протеїнкіназ, відповідальних за фосфорилування. І знову переважає думка, що це саме S6K1, хоча є відомості і про спроможність за певних обставин виконувати цю функцію AKT1.

Щоб перевірити, чи впливає експресія S6K1 і, що важливо, яких ізоформ на фосфорилування ESR1, було проаналізовано лізати субліній MCF-7 з

відновленою експресією окремих ізоформ S6K1 за рівнем фосфорилування ESR1 за Ser 167. Згідно з даними, представленими на рис.3.19, лише відновлення експресії p70 та p60 ізоформ S6K1 призводить до підсилення фосфорилування ESR1 Ser 167.

Інше цікаве спостереження — те, що рівень фосфорилування підсилюється за умови росту клітин на збідненому за ростовими факторами середовищі.

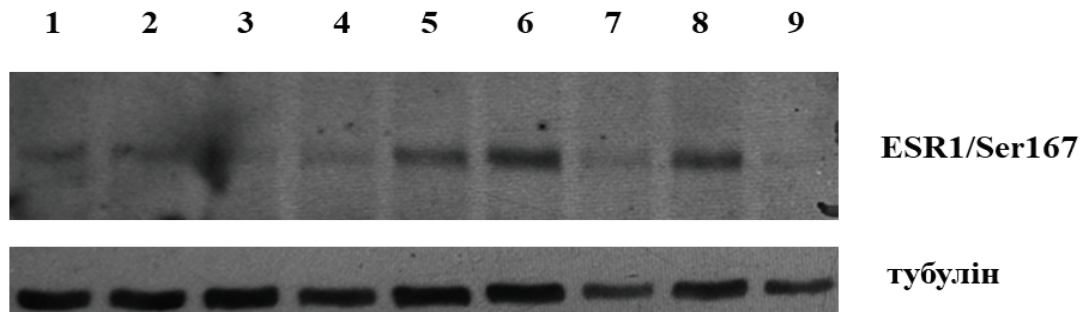


Рис.3.19. Роль диференційної експресії ізоформ S6K1 ESR1 в фосфорилуванні ESR1 за Ser 167. Вестерн-блот-аналіз лізатів субліній клітин MCF7 з диференційною експресією ізоформ S6K1 з використанням антитіл відповідної специфічності. 1 – MCF-7wt; 2 - MCF-7/F1; 3- MCF-7/F3; 4 - MCF-7/F3+p85, 5 - MCF-7/F3+p70, 6 - MCF-7/F3 +p60; 7 - MCF-7 інтактні; 8 - MCF-7 (-/-) - 18 г. культивування в середовищі без FBS ; 9- MCF-7 (-/+) стимуляція 60 хв. FBS після 18г. голодування

Таким чином, наші дані свідчать на користь того, що, можливо, ізоформи S6K1, а саме p70 та p60, залучені до фосфорилування ESR1. Інший несподіваний висновок полягає в тому, що фосфорилування підвищується за умови відсутності ростових факторів, що мало б пригнічувати S6K1-залежне фосфорилування. Однак цей висновок є попереднім, і він потребує більш детального аналізу, в першу чергу, з використанням специфічного ліганду

ESR1 — естрогену. Не виключено, що різні фактори можуть активувати різні ланки сигнальних каскадів і мати різний регуляторний вплив.

Фосфорилування залишку серину в позиції 118 (Ser118) є також одним із ключових механізмів регуляції ESR1. Це своєрідний «вимикач», який визначає, наскільки активно рецептор буде стимулювати транскрипцію генів. Зазвичай ESR1 активується при зв'язуванні з естрогеном. Однак фосфорилування Ser118 дозволяє рецептору ставати активним навіть за відсутності гормону. Це відбувається під дією факторів росту (наприклад, EGF або IGF-1). Сигнал передається через шлях MAPK/ERK, де кіназа ERK безпосередньо фосфорилує Ser118.

Рецептор має два основні домени активації: AF-1 (на N-кінці) та AF-2 (на C-кінці), а Ser118 знаходиться саме в домені AF-1, і його фосфорилування призводить до посилення транскрипційної активності (AF-1). Фосфорилування цього залишку критично важливе для повноцінної роботи AF-1. Воно сприяє залученню коактиваторів (наприклад, білків сімейства SRC-1/p160), які допомагають рецептору «розгортати» ДНК і запускати синтез РНК.

Як не парадоксально, фосфорилування Ser118 одночасно і активує рецептор і мітить його для подальшого знищення, що прискорює його деградацію. Після виконання своєї функції як транскрипційного фактора, фосфорильований ESR1 швидше піддається убіквітинуванню та протеасомній деградації. Це необхідно для того, щоб клітина не отримувала безперервний сигнал до поділу, і саме це є ключовим принципом дискретності в передачі сигналу. Саме порушення таких механізмів і призводить до неконтрольованої активації певних процесів, що і призводять до розвитку патологій.

Дійсно, фосфорилування Ser118 є критичним у патогенезі раку грудної залози. Є дані, що підвищений рівень фосфорилування Ser118 часто пов'язаний з тим, що пухлина перестає реагувати на гормональну терапію.

Оскільки рецептор активується через MAPK-залежний сигнальний каскад, блокада самого естрогену стає неефективною.

Таким чином, підвищений рівень p-Ser118 зазвичай корелює з кращою відповіддю на терапію на початкових етапах, але також вказує на активність сигнальних шляхів факторів росту, що може призвести до рецидива.

З огляду на існування перехресного зв'язку між MAP-кіназа-залежним та S6K1-залежними шляхами було перевірено статус фосфорилування Сер 118 в контексті диференціальної експресії ізоформ S6K1.

На рис.3.20 представлено аналіз лізатів різних субліній MCF7 з диференційною експресією ізоформ S6K1.

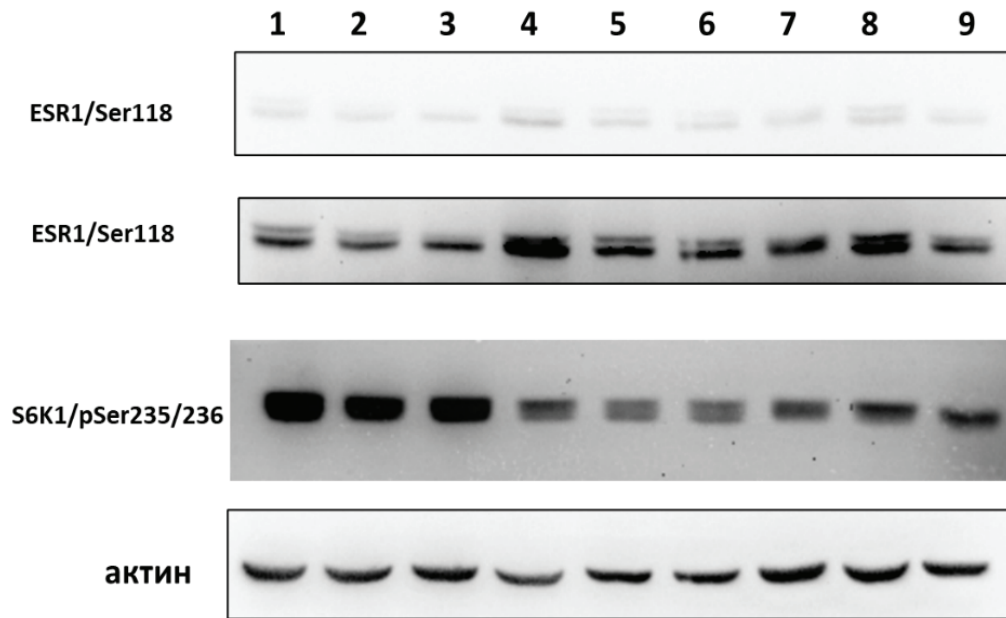


Рис. 3.20. Роль диференційної експресії ізоформ S6K1 ESR1 в фосфорилуванні ESR1 за Сер118. Вестерн блот аналіз лізатів субліній клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ S6K1 з використанням антитіл відповідної специфічності. 1 – MCF-7 інтактні; 2- MCF-7/F1; 3- MCF-7/F3; 4 - MCF-7/F3 + p85, 5 - MCF-7/F3 + p70, 6 - MCF-7/F3 + p60; 7- MCF-7 інтактні; 8 - MCF-7 (-/-) - 18г. культивування в середовищі без FBS ; 9- MCF-7 (-/+) стимуляція 60 хв. FBS після 18г. голодування

Згідно з отриманими даними, відновлення експресії лише p85-ізоформи S6K1 в клітинах з фенотипом p85-, p70-, p60-/S6K1 (F3) призводить до підвищення фосфорилування ESR1 за Ser118. Натомість відновлення експресії p60 та p70 ізоформ S6K1 такого ефекту не мало. Таким чином, цілком можливо, що зв'язок MAP-кіназа-залежними та S6K1-залежними сигнальними шляхами відбувається через p85-ізоформу. Важливо, що за даними літератури p85 ізоформа може мати ядерну локалізацію, де і може відбуватися регуляція фосфорилування ESR1.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах:

1. Mazov, L.O., Savinska, S.S., Palchevskii, S.A., Kvitchenko, V.V., Filonenko. The role of S6K1 isoforms in regulating ESR1 phosphorylation at Ser118 and Ser167 sites crucial for its activity, and the reciprocal effect on S6K1 activity. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.

### **3.6. Аналіз експресії мРНК ізоформ S6K1 - p85/70S6K1 та p60S6K1 у пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів**

Представлені в попередніх підрозділах результати свідчать не лише про існування функціональних зв'язків між ізоформами ESR1 та S6K1, а й про відмінності цих функцій. Як відомо, експресія ESR1 відіграє важливу роль у формуванні фенотипових ознак пухлин грудної залози людини. В сучасній онкологічній практиці визначення експресії естрогенового рецептора є одним із ключових факторів для молекулярного субтипуювання пухлин грудної залози, що в свою чергу є першочерговою важливістю для визначення стратегії лікування та прогнозування перебігу захворювання і чутливості до терапії.

Однак слід зауважити, що роль навіть відомих і на сьогодні найбільш досліджених ізоформ ESR1 не є визначеною остаточно в прогресії раку грудної залози і в його чутливості до протипухлинної терапії. З іншого боку, факт підвищеної експресії кінази рибосомного білка S6 є також визначеним ще більше трьох десятиріч тому, що в першу чергу пов'язували з ампліфікацією гена S6K1 і не проводили кореляцію з експресією окремих ізоформ, а саме відомих на той час – p70 та p85. З огляду на існування вже трьох ізоформ S6K1, що мають каталітичну активність і відрізняються лише будовою N-кінцевої регуляторної ділянки нашим завданням було з'ясувати особливості експресії мРНК ізоформ кінази S6K1 — p70/85S6K1 та p60S6K1 у пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів, а саме Люмінального А, Люмінального Б (HER2+) та потрійно-негативного порівняно з контрольною групою, а також оцінити їхній можливий вплив на формування агресивного пухлинного фенотипу. Відокремити рівень експресії всіх трьох ізоформ на рівні мРНК є важким і майже неможливим з огляду на той факт, що ключова мРНК S6K1, що містить 15 екзонів здатна до трансляції всіх трьох ізоформ S6K1 – p60, p70 та p85 завдяки використанню альтернативних стартів трансляції, то ж ПЛР аналіз буде виявляти мРНК, що забезпечує експресію на рівні протеїну всіх трьох ізоформ. Не виключено, що регуляція при цьому може відбуватися і на рівні ініціації трансляції з того чи іншого старту трансляції. Однак як було зазначено в літературному огляді, існує сплайсова форма мРНК S6K1, що має додатковий екзон (1a). Саме присутність цього екзону призводить до зсуву рамки зчитування під час трансляції p85 та p70 S6K1, старт трансляції для яких розташований в екзоні 1. Однак це не повинно впливати на експресію p60-ізоформи, оскільки її старт трансляції розташований в межах екзону 2 вже позаду екзону 1a.

З огляду на зазначене, а саме існування двох сплайсових мРНК, де перша здатна транслювати всі три ізоформи, а інша лише p60, було розроблено

олігонуклеотиди для визначення експресії цих двох мРНК-ізоформ, що містять відповідно 15 та 16 екзонів гена S6K1. Зі зрозумілих причин для визначення експресії мРНК специфічної лише для р60-ізоформи один із олігонуклеотидів був специфічним до ділянки ДНК додаткового екзону 1а.

Крім того, в подальших дослідженнях акцент було зроблено також на наявність кореляції між рівнями експресії ізоформ S6K1 та рівнями експресії прогностичних маркерів, серед яких безумовно ESR1 та рецептор епідермального фактора росту HER2, визначення якого є також ключовим для молекулярного субтипуювання пухлин грудної залози людини. Дослідження проводили на зразках пухлинної тканини пацієнтів, що належать до різних молекулярних субтипів карциноми грудної залози, та тканини пухлинного оточення, які були отримані в Національному інституті раку. Всі суб'єкти дослідження надали свою інформовану добровільну згоду. Розподіл зразків за групами було попередньо верифіковано з використанням методу імуногістохімічного аналізу в профільній лабораторії (табл.3.2).

З метою валідації та верифікації попереднього розподілу зразків за молекулярними субтипами було проаналізовано рівні експресії генів *ESR1* та *HER2* у цих зразках пухлин методом ПЛР в реальному часі. Це дозволило встановити відповідність молекулярних профілів пухлин їхньому клінічному статусу перед початком подальших етапів дослідження.

Табл.3.2

Розподіл зразків пухлин карциноми молочної залози людини за молекулярними субтипами

Тип зразку	Кількість зразків
Люмінал А	10
Люмінальний Б HER2/neu+	11
Тричі негативний	10
Контрольні зразки	10

На рис.3.21 представлено дані ПЛР-аналізу рівня експресії мРНК-генів *ESR1* та *HER2*, який засвідчив, що профіль експресії досліджувальних генів узгоджується з клінічними характеристиками молекулярних субтипів пухлин. В контрольній групі були виявлені низькі рівні експресії *ESR1*, *HER2*, тоді як Luminal A характеризувався високим рівнем *ESR1* та низьким рівнем *HER2*, що відповідає менш агресивному гормонозалежному фенотипу. Luminal B демонстрував одночасне підвищення *ESR1* та *Her2*, а TNBC-підтип відрізнявся відсутністю *ESR1* та низьким *Her2*, завдяки чому він є найбільш агресивним і складним для протипухлинної терапії типом пухлин.

Слід зазначити, що в поодиноких випадках було виявлено неузгодженість між експресією *ESR1* та *HER2* та розподілом за молекулярними субтипами за даними імуногістохімічного аналізу. Так, у разі ПЛР-аналізу зразка T42 (рис. 3.21б), що належить до TNBC, було виявлено високий рівень експресії *HER2+*, співставний з таким у пухлинах Luminal B (*HER2+*) субтипу (рис.3.14б). Це може свідчити як про можливі розбіжності в експресії *HER2* на рівні мРНК та протеїну, що не можна виключати. Крім того, не можна виключати і помилковість висновків імуногістохімічного тесту.

Аналіз експресії *ESR1* в зразках оточуючої тканини виявився також гетерогенним з досить високим рівнем в деяких з них (N85, N89, N15-2). Це може бути пояснено інвазією пухлинних клітин в оточуючу тканину, і такий висновок може бути додатковим важливим показником для діагностики, особливо в контексті визначення прогнозу.

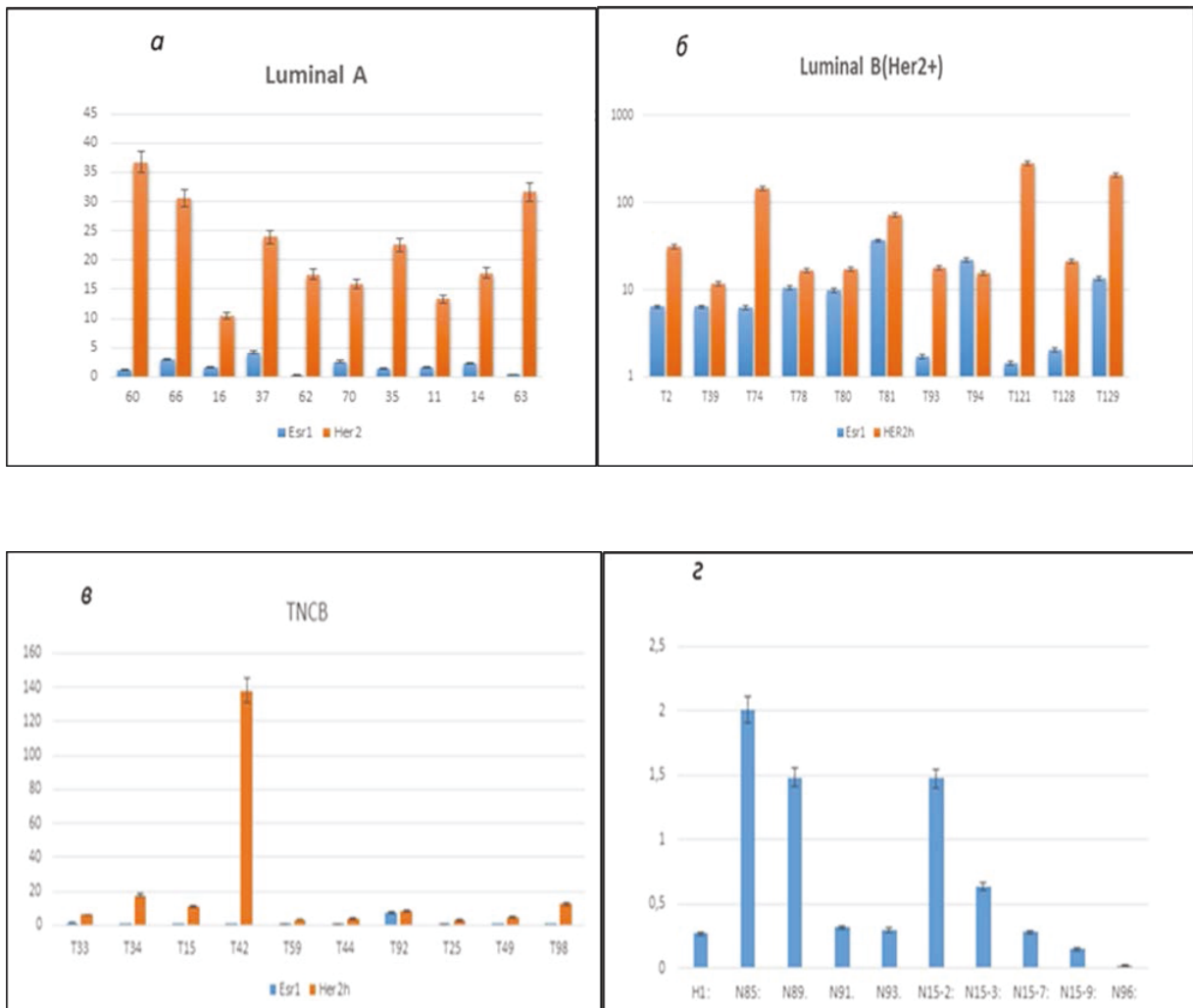


Рис.3.21 . Аналіз експресії генів ESR1 та HER2 в зразках пухлин грудної залози людини різних молекулярних субтипів. ПЛП-аналіз рівня експресії мРНК ESR1 та HER2 в пухлинах люмінального А субтипу (а); люмінального Б (HER2-) субтипу (б); потрійно-негативного субтипу (в) та оточуючій пухлину тканині (з).  $p < 0.001$

В цілому ж аналіз усереднених значень свідчить про відповідність експресії маркерних генів розподілу пухлин за молекулярними субтипами згідно з даними рис. 3.22.

Підтвердивши відповідність зразків пухлин грудної залози людини молекулярним субтипам за класичними маркерами, на наступному етапі було досліджено особливості експресії ізоформ RPS6KB1, а саме експресії мРНК,

що відповідає гіпотетично за експресію всіх трьох ізоформ S6K1, чи виключно p60/S6K1 ізоформи в зразках пухлин різних молекулярних субтипів.

Як вже було зазначено вище, на модельних клітинах карциноми грудної залози MCF-7, що походять від пухлин Luminal A субтипу, нами було встановлено, що вибіркоче пригнічення експресії різних ізоформ S6K1 з використанням системи геномного редагування CRISPR/Cas9 призводить до ініціації EMT, що супроводжується драматичним пригніченням експресії ESR1. Саме тому ідея полягала в перевірці можливої кореляції між експресією різних ізоформ S6K1, насамперед p60S6K1, в пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів.

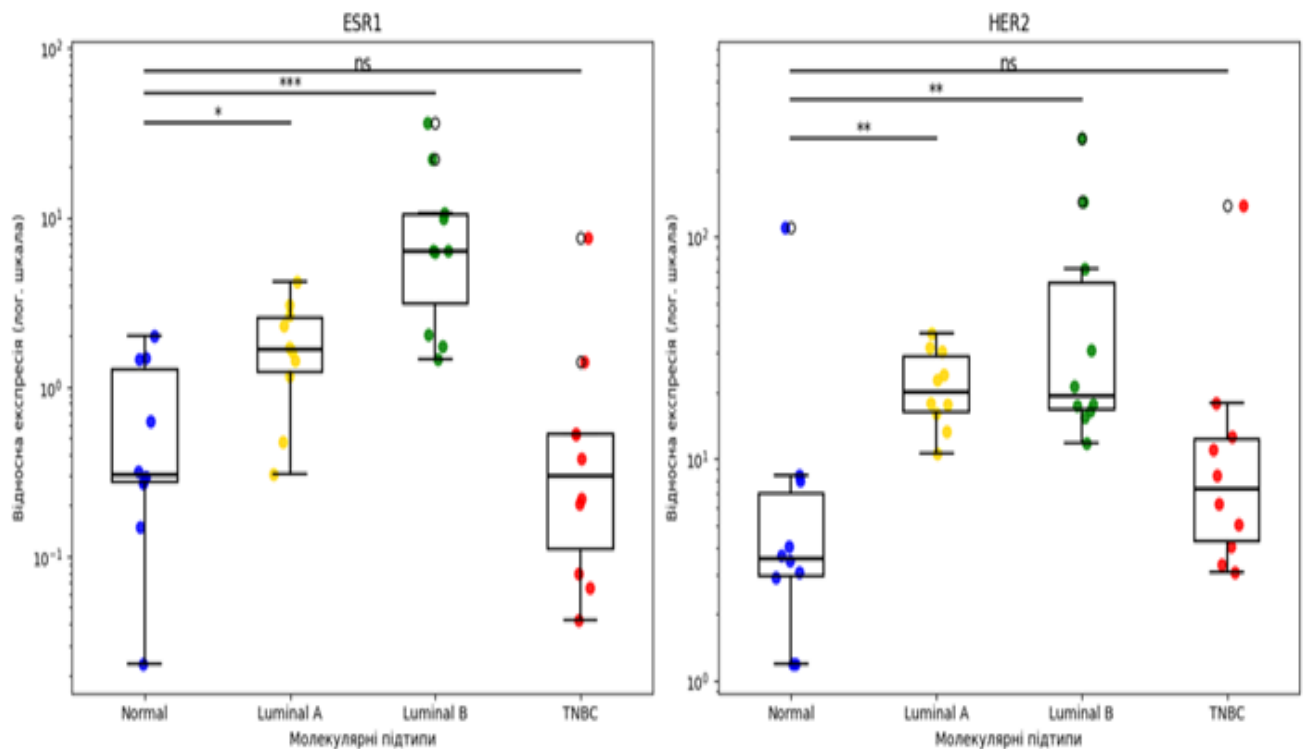


Рис.3.22 Рівні експресії ESR1 та HER2, визначені методом кількісної ПЛР, у умовно-нормальній тканині молочної залози та пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів. Дані представлені у вигляді boxplot (медіана та міжквартильний інтервал) з нанесенням індивідуальних значень. Використано логарифмічну шкалу. Статистичну значущість оцінено за допомогою тесту Краскела–Уоліса з пост-хок тестом Данна (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ns — незначуще)

Методом кількісного ПЛР було виявлено суттєві відмінності у рівнях експресії мРНК S6K1 у пухлинах трьох підтипів раку грудної залози в порівнянні з контрольною групою (рис.3.21). Було встановлено загальне підвищення рівня експресії S6K1 в пухлинах Luminal A та Luminal B (HER2+) субтипів. Крім того, спостерігалася тенденція до підвищення рівня експресії S6K1 зі збільшенням агресивності пухлин, а саме експресія S6K1 в Luminal B (HER2+) була дещо вищою порівняно з Luminal A (рис.3.23).

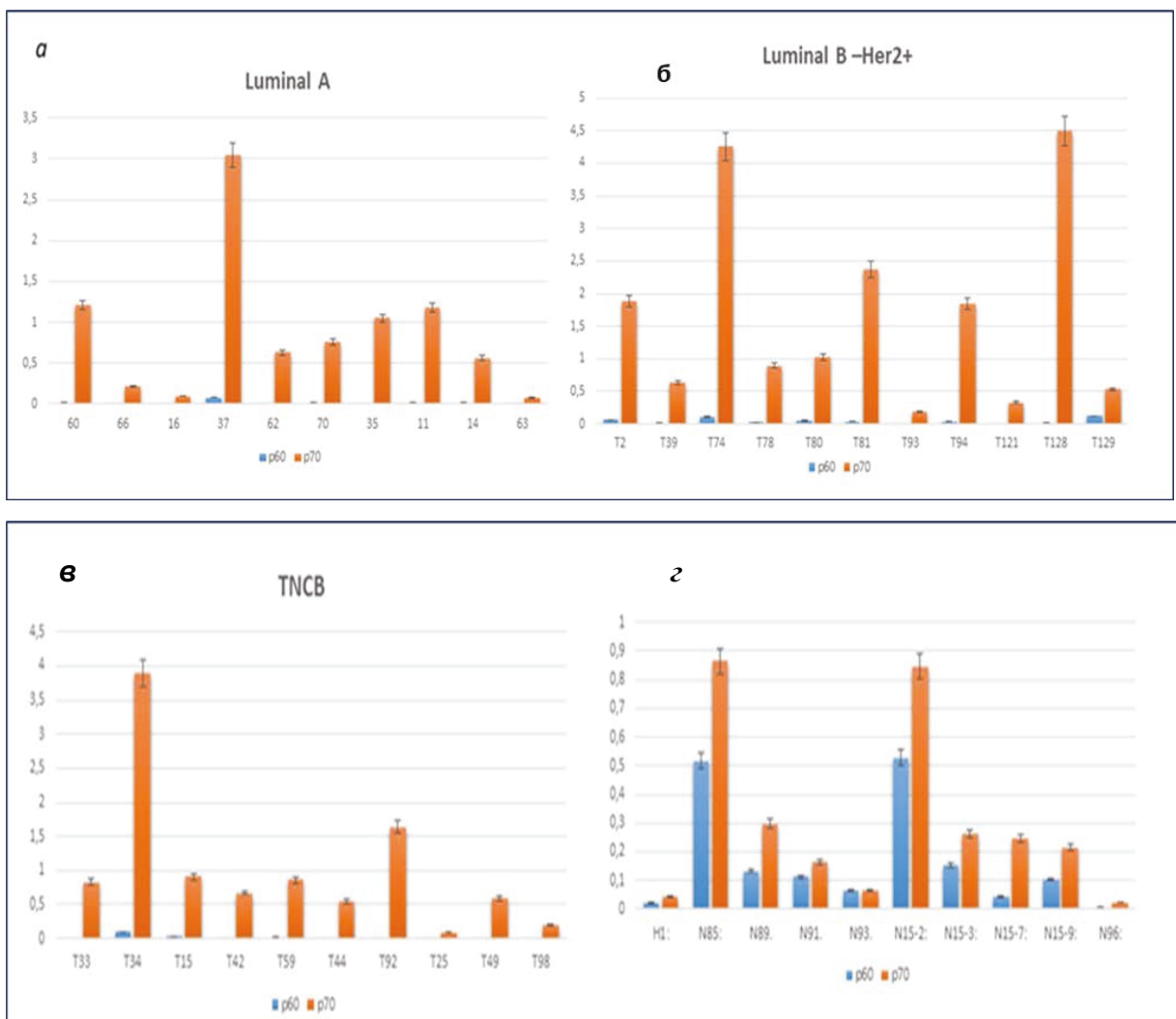


Рис.3.23. Аналіз експресії різних ізоформ S6K1 у зразках пухлин грудної залози різних молекулярних субтипів. ПЛР-аналіз експресії мРНК різних ізоформ S6K1 в пухлинах різних молекулярних субтипів: люмінальному А (а); люмінальному Б з HER2<sup>+</sup> (б); потрійно-негативному (в) та оточуючій пухлину тканині (г)

Розрахунок середнього рівня експресії мРНК між ізоформами p70S6K1 та p60S6K1 виявив існування статистично достовірних відмінностей між різними підтипами раку грудної залози (рис.3.24). Встановлено підвищення експресії мРНК, що відповідає за експресію всіх трьох ізоформ в пухлинах люмінального А-субтипу. В пухлинах люмінального Б-субтипу підвищення експресії відповідної мРНК було ще більш значущим. Цікаво, що в найбільш агресивних пухлинах потрійно-негативного субтипу спостерігалось зниження експресії S6K1 майже до рівня характерного для оточуючої тканини (рис. 3.17)

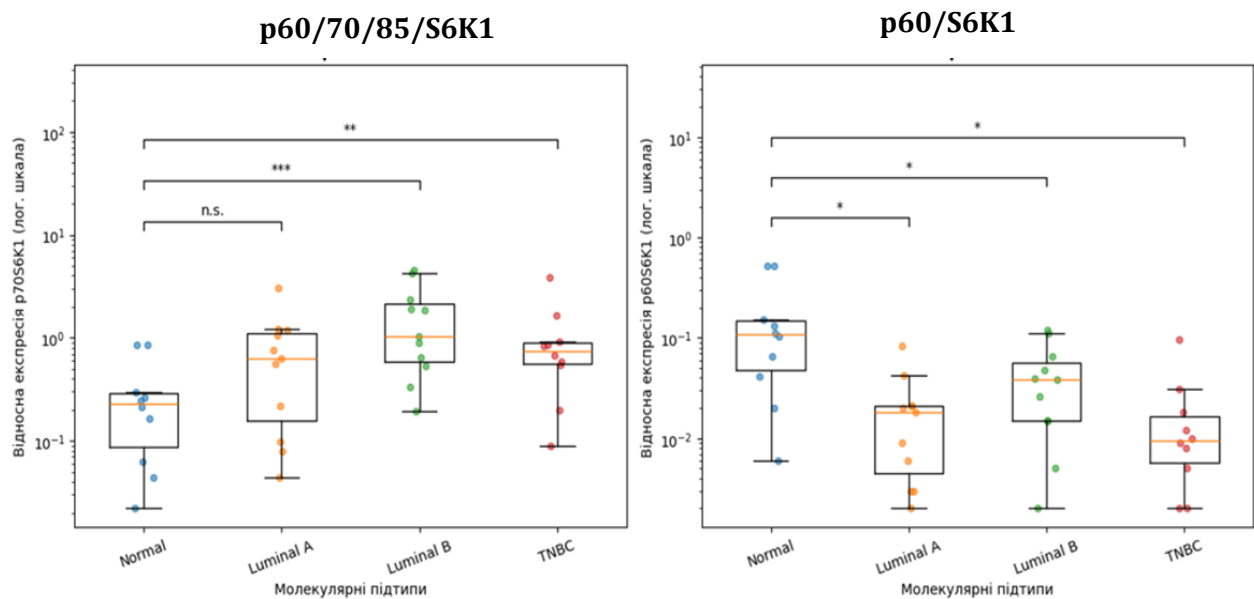


Рис.3.24. Рівні експресії мРНК-ізоформ S6K1, визначені методом кількісної ПЛР в реальному часі, в умовно-нормальній тканині молочної залози та різних молекулярних підтипах пухлин грудної залози. Дані представлені у вигляді boxplot (медіана та міжквартильний інтервал) з нанесенням індивідуальних значень. Використано логарифмічну шкалу. Статистичну значущість оцінено за допомогою тесту Краскела–Уоліса з пост-хок тестом Данна (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ns — незначуще)

Дещо іншу картину спостерігали для експресії мРНК, відповідальної виключно за експресію p60-ізоформи S6K1. З'ясувалося, що для всіх типів

пухлин характерним є пригнічення експресії цієї мРНК. У разі, якщо р60 ізоформа S6K1 транлюється виключно з цієї мРНК, то можна передбачити можливі антионкогенні властивості р60 ізоформи. Однак з отриманих даних важко зробити остаточний висновок.

Подальший аналіз співвідношення між експресією двох типів мРНК S6K1 (рис. 3.25) в пухлинах різних молекулярних субтипів підтвердив суттєве пригнічення експресії мРНК специфічної для р60 ізоформи S6K1 в усіх типах пухлин порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози. Цікаво, що суттєвих відмінностей цього показника між різними субтипами пухлин не було виявлено, хіба що він був найбільшим в пухлинах потрійно-негативного субтипу.

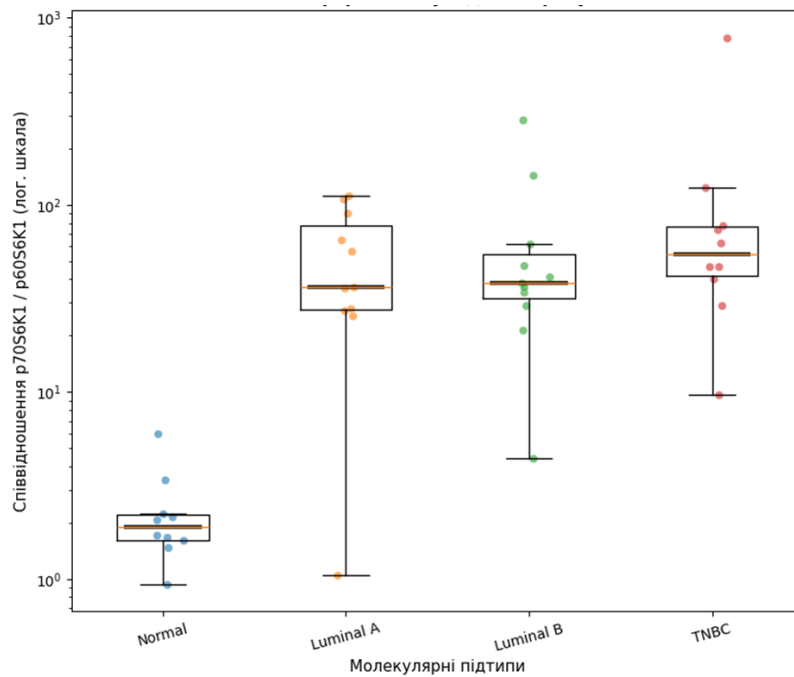


Рис.3.25 Співвідношення p70S6K1/p60S6K1 в умовно-нормальній тканині молочної залози та пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів. Дані представлені у вигляді boxplot (медіана та міжквартильний інтервал) з нанесенням індивідуальних значень. Використано логарифмічну шкалу

З огляду на встановлене існування функціонального зв'язку між ESR1 та S6K1, а також на встановлений вплив ESR1 на експресію S6K1, було проведено кореляційний аналіз співвідношення експресії ESR1 до окремих ізоформ S6K1 в пухлинах грудної залози різних молекулярних субтипів. Результати аналізу представлено на рис.3.26. Згідно з отриманими даними, в пухлинах люмінального типу, що мають найбільш сприятливу чутливість до терапії, співвідношення мРНК ESR1 до S6K1 не змінювалося порівняно з контролем. В пухлинах люмінального Б-субтипу співвідношення дещо змінювалося на користь ESR1. Натомість в пухлинах потрійно-негативного типу співвідношення суттєво змінювалося на користь S6K1.

Аналіз співвідношення ESR1 до p60 ізоформи S6K1 вказує на дещо протилежну тенденцію. Вже в пухлинах люмінального А типу співвідношення суттєво змінювалося на користь ESR1 і збільшувалося далі в пухлинах люмінального Б типу. В пухлинах потрійно-негативного субтипу співвідношення наближалось до показників умовно-нормальної тканини, однак лишалося суттєво відмінним.

Таким чином, отримані результати демонструють чіткі відмінності між експресією ізоформ S6K1 в пухлинах різних молекулярних субтипів порівняно з контрольною умовно-нормальною тканиною (табл.3.3).

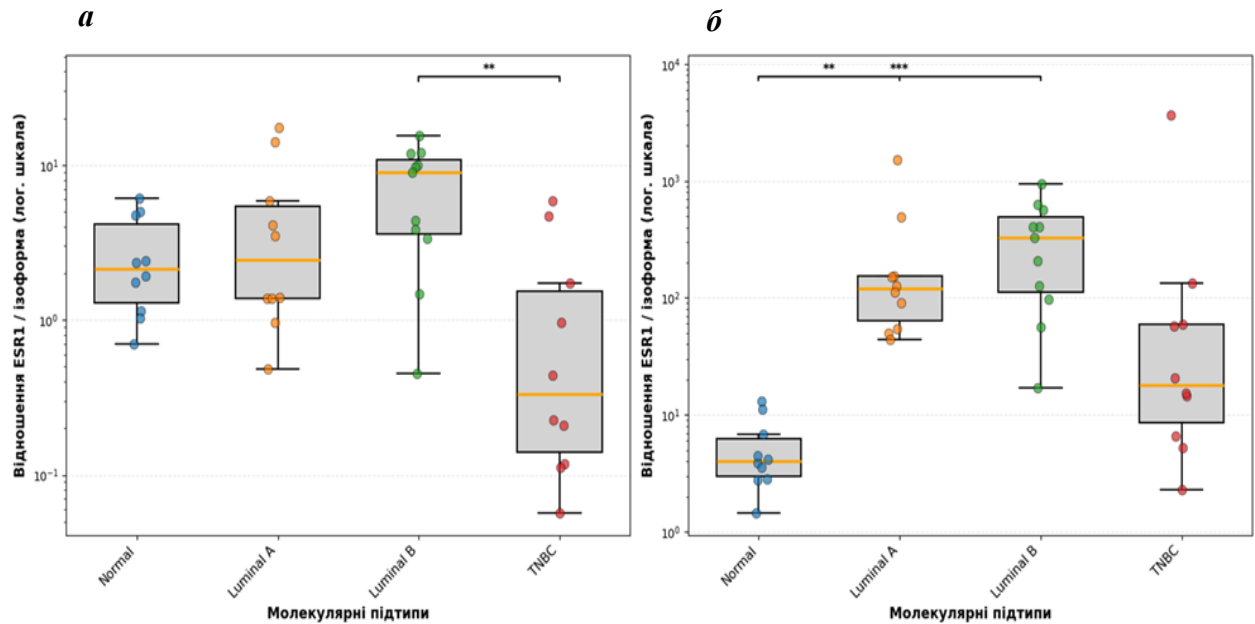


Рис. 3.26 Співвідношення експресії мРНК ESR1 та S6K1 у різних молекулярних субтипах раку грудної залози:

*а* - співвідношення рівнів мРНК *ESR1* до ізоформи p70S6K1 (ESR1/p70S6K1);  
*б* - співвідношення рівнів мРНК *ESR1* до ізоформи p60S6K1 (ESR1/p60S6K1)

Суттєве підвищення експресії мРНК специфічної для всіх ізоформ виявлено для люмінального А- та люмінального Б-субтипів. Для найбільш агресивного потрійно-негативного субтипу пухлин було виявлено лише незначне підвищення експресії. Ці дані свідчать на користь того, що функціональна активність S6K1 може відрізнятися залежно від типу пухлини грудної залози і не є показником агресивності. Навпаки, рівень експресії S6K1 в найбільш агресивному типі пухлин був найменшим порівняно з іншими типами, хоча і перевищував показники в оточуючій умовно-нормальній тканині. Крім того, саме в цьому типі пухлин виявлено як найбільше пригнічення експресії мРНК p60-ізоформи, так і її найменше співвідношення порівняно з іншими типами. Дані по експресії ізоформ на рівні пухлини частково узгоджуються з даними, отриманими нами на рівні тканини. Адже

нами встановлено, що зміна балансу в експресії ізоформ S6K1, а саме пригнічення експресії p70 та p85 на тлі незмінної експресії p60 ізоформи призводить до ініціації ЕМТ. Важливо, що саме для пухлин потрійно-негативного субтипу характерна ініціація ЕМТ. Інший важливий фактор — це кореляція між пригніченням експресії як ESR1, так і S6K1 в цьому типі пухлин, так само, як і їхнє підвищення експресії в пухлинах люмінального субтипу. Це ще раз є непрямим доказом функціонального зв'язку між ESR1 та S6K1.

Таблиця 3.3

Співвідношення рівнів експресії мРНК між ізоформами S6K1 та p60-S6K1

Тип зразку	Співвідношення p70/p60
Люмінал А	1.8
Люмінальний Б HER2/neu+	34
Тричі негативний	36
Контрольні зразки	57

Різницю в експресії генів між підтипами раку грудної залози спочатку оцінювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Через ненормальний розподіл та наявність викидів також застосовували непараметричний тест Краскела-Уоліса. Значні відмінності спостерігалися для ESR1 та p70S6K1, тоді як експресія p60S6K1 суттєво не відрізнялася між групами, але була нижчою в порівнянні з контрольними зразками.

Отримані дані свідчать, що ключовою особливістю регуляції S6K1 у раку молочної залози є не лише підвищення активності канонічної ізоформи p70S6K1, але й суттєве зниження або функціональне пригнічення короткої ізоформи p60S6K1. Саме зменшення внеску p60S6K1 призводить до значного зміщення співвідношення p70/p60, особливо в підтипах Luminal B та triple-negative, де також відзначається виражена міжзразкова гетерогенність. На

відміну від нормальної тканини молочної залози, де баланс ізоформ є відносно стабільним, пухлинні зразки характеризуються широким діапазоном значень, що вказує на порушення механізмів, які контролюють утворення або стабільність p60S6K1. З огляду на те, що p60S6K1 розглядається як продукт альтернативних механізмів ініціації трансляції, її зниження може відображати пригнічення цих процесів на фоні гіперактивації mTOR signaling pathway, яка віддає перевагу кап-залежному синтезу повнорозмірної ізоформи p70S6K1 [17,78]. Таким чином, зміна співвідношення p70/p60 є не лише наслідком активації сигнального шляху, а й прямим відображенням втрати регуляторного внеску p60S6K1. Функціонально p60S6K1 може відігравати важливу роль як негативний або стримуючий регулятор клітинного росту, потенційно виконуючи відмінні або навіть антагоністичні функції порівняно з p70S6K1 [28]. Втрата або зниження активності p60S6K1 може сприяти неконтрольованій проліферації, підвищенню пластичності пухлинних клітин та їх адаптації до стресових умов мікрооточення. Особливо показово, що найбільш виражене зниження внеску p60S6K1 спостерігається у потрійно-негативному субтипі, що узгоджується з його високою агресивністю та несприятливим прогнозом [84]. У сукупності ці дані дозволяють розглядати p60S6K1 не лише як компонент сигнального шляху, а як потенційно ключовий регулятор пухлинної прогресії. Відповідно, співвідношення ізоформ кінази S6K1p70/p60 може бути інтерпретоване як інтегральний показник функціонального стану трансляційного апарату, тоді як зниження рівня p60S6K1 — як один із можливих механізмів втрати контролю над клітинним ростом у пухлинах грудної залози, а також може бути запропоноване як потенційний маркер агресивності клітин, що пройшли епітеліально-мезенхімальний перехід. Найвищий показник зафіксовано у підтипі потрійно-негативному субтипі пухлин, що корелює з відомим високим проліферативним потенціалом та несприятливим клінічним прогнозом.

Результати даного підрозділу опубліковані в наступних роботах.

1. A.V. Mazov, I.V. Kroupskaya, V.V. Filonenko. Expression features of S6K1 isoforms at the mRNA level in human breast tumors of different molecular subtypes. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.

## ВИСНОВКИ

1. Створено поліклональні антитіла миші проти естрогенового рецептора людини ESR1. Як антиген використовували рекомбінантну повнорозмірну форму ESR1, експресовану в клітинах бактерій.

2. Методом ко-імунопреципітації досліджено можливість існування протеїнового комплексу між ESR1 та S6K1, однак доказів його існування не отримано, що, скоріш за все, пов'язано з низькою афінністю взаємодії або короткотривалістю її існування.

3. З використанням системи геномного редагування CRISPR/Cas9 створено низку субліній клітин MCF-7 з диференційною експресією ізоформ ESR1 і встановлено, що пригнічення експресії ESR1 не призводить до індукції ЕМТ.

4. Вперше досліджено вплив експресії естрогенового рецептора ESR1 на стан S6K1-залежного сигналювання. Встановлено, що пригнічення експресії ESR1 негативно впливає на експресію кінази рибосомного білка S6K1 і, як наслідок, на її загальну активність.

5. Встановлено, що пригнічення експресії ESR1 в клітинах MCF-7 призводить до пригнічення локомоторної активності клітин MCF-7, однак не впливає на їхню проліферативну активність.

6. Вперше досліджено роль окремих ізоформ S6K1 в регуляції фосфорилування ESR1 за ключовими для його активності сайтами — Сер 118 та Сер 167. Встановлено, що експресія p70 та p60, але не p85, ізоформ S6K1 корелює з підвищеним фосфорилуванням за Сер 167. Натомість експресія ізоформи p85, але не p60 та p70, корелює з підвищеним фосфорилуванням ESR1 за Сер118.

7. З використанням створених мутантних субліній клітин MCF-7 з мімікрією сайту фосфорилування шляхом заміни Сер 167 на аспарагінову

кислоту та блокуванням сайту фосфорилування шляхом заміни Сер 167 на аланін встановлено, що фосфорилування ESR1 за цим сайтом не має регуляторного впливу на активність S6K1.

8. Вперше визначено особливості експресії ізоформ S6K1 у пухлинах грудної залози людини. Виявлено пригнічення експресії ключових ізоформ S6K1 (p70 та p85) в пухлинах потрійно-негативного субтипу поряд з підвищенням в пухлинах люмінальних А- та Б-субтипів порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.

9. Вперше виявлено пригнічення експресії мРНК-ізоформи p60/S6K1 в пухлинах раку грудної залози всіх молекулярних субтипів порівняно з умовно-нормальною тканиною грудної залози.

10. Вперше досліджено та виявлено кореляційний зв'язок між експресією ESR1 та ізоформ S6K1 в пухлинах грудної залози людини різних молекулярних субтипів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Siegel R.; Ma J.; Zou Z and Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 2014, 64, 9-29. [doi.org/10.3322/caac.21208](https://doi.org/10.3322/caac.21208)
2. Shen L, Li X, Wang Y, et al. ER $\alpha$ 36 activates the PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathway to promote breast cancer progression and endocrine resistance. *Oncogene.* 2020;39(28):5123–5137.
3. Harvey J.M. ;Clark G.M.; Osborne C.K.; Allred D.C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting. *J Clin Oncol.* 1999, 17(5), 1474-81, DOI: [10.1200/JCO.1999.17.5.1474](https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.5.1474)
4. Siersbæk R, Kumar S, Carroll JS. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor  $\alpha$  function in breast cancer. *Genes Dev.* 2018;32(17-18):1141-1154.
5. Francis I. M.; Altemaimi R. A; Al-Ayadhy B.; Alath P.; Jaragh M.; Mothafar F. J.; Kapila K. Hormone Receptors and Human Epidermal Growth Factor (HER2) Expression in Fine-Needle Aspirates from Metastatic Breast Carcinoma – Role in Patient Management. *Journal of Cytology,* 2019, 36(2), 94-100. doi: [10.4103/JOC.JOC\\_117\\_18](https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_117_18).
6. Habara M.; Shimada M.; Estrogen receptor  $\alpha$  revised: Expression, structure, function, and stability. *Bioessays,* 2022, 44(12):e2200148.2022, DOI: [10.1002/bies.202200148](https://doi.org/10.1002/bies.202200148).
7. He Y.; Sun M. M.; Zhang G.G.; Yang J.; Chen K.S.; Xu W.W.; Li B. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021, 6, 425. DOI: [10.1038/s41392-021-00828-5](https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5)
8. Khatpe A. S.; Adebayo A. K.; Herodotou C. A.; Kumar B. and Nakshatri H. Nexus between PI3K/AKT and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers,* 2021, 13, 369. doi: [10.3390/cancers13030369](https://doi.org/10.3390/cancers13030369)
- 9 Bernstein L. & Lacey J. V. Jr. J. Receptors, Associations, and Risk Factor

Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative? *Natl Cancer Inst.* 2011, 103, 451–453. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr046>

10 Strillacci, A., Sansone, P., Rajasekhar, V.K. et al. ER $\alpha$ -LBD, an isoform of estrogen receptor alpha, promotes breast cancer proliferation and endocrine resistance. *npj Breast Cancer*, 2022, 8, 96. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00470-6>.

11. Strillacci A, Sansone P, Rajasekhar VK, Turkecul M, Boyko V, Meng F, et al. ER $\alpha$ -LBD, an isoform of estrogen receptor alpha, promotes breast cancer proliferation and endocrine resistance. *npj Breast Cancer*. 2022;8(1):96. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00470-6>

12. Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

13. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

14. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphorylation of ER $\alpha$  and endocrine resistance. *J Clin Oncol.* 2011;29(27):3750–3757. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.4873>.

15. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 phosphorylates ER $\alpha$  at Ser167. *J Biol Chem*. 2010;285(30):23133–23142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123737>

16. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.

17. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K1). *Biochem J.* 2012;441(1):1–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20110897>.

18. Wang Z, Zhang X, Shen P, et al. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(4):1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.226>.
19. Zhang X, Deng H, Wang Z. Estrogen activation of the MAPK/ERK pathway via ER $\alpha$ 36. *Steroids.* 2011;76(9):906–909. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.019>.
20. Lin SL, Yan LY, Zhang XT, et al. ER- $\alpha$ 36, a variant of ER $\alpha$ , promotes tamoxifen resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;120(2–3):154–161. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.070>.
21. Anbalagan M, Rowan BG. Post-translational modifications of the estrogen receptor alpha. In: *Signaling Pathways in Breast Cancer.* Cham: Springer; 2015. p. 3–31. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16366-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16366-6_1).
22. Ishii H, Hattori Y, Ozawa H. Estrogen Receptor  $\alpha$  Isoforms Generated by Alternative Use of Cryptic Exons. *J Nippon Med Sch.* 2023;90(5):364–371. [https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2023\\_90-507](https://doi.org/10.1272/jnms.JNMS.2023_90-507).
23. Kang L, Zhang X, Xie Y, et al. Involvement of ER $\alpha$ 36 in estrogen signaling. *Steroids.* 2010;75(10):792–798. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.019>.
24. Zhang XT, Kang LG, Ding L, et al. A positive feedback loop of ER $\alpha$ 36/EGFR promotes breast cancer progression. *Oncogene.* 2011;30(7):770–780. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>.
25. Bärlund M, Monni O, Kononen J, et al. Multiple genes at 17q23 undergo amplification in breast cancer. *Cancer Res.* 2000;60(19):5340–5344.
26. Couch FJ, Wang XY, Wu GJ, et al. Localization of breast cancer susceptibility gene candidates to 17q23. *Cancer Res.* 1999;59(6):1408–1411.
27. van der Hage JA, van den Broek LJ, Legrand C, et al. Overexpression of p70 S6 kinase in breast cancer. *Br J Cancer.* 2004;90(8):1546–1550.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601739>.

28. Rosner M, Hengstschläger M. Nucleocytoplasmic localization of S6K1 isoforms. *Cell Signal*. 2011;23(10):1607–1615. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>.
29. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 phosphorylates ER $\alpha$  at Ser167. *J Biol Chem*. 2010;285(30):23133–23142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123737>.
30. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphorylation of ER $\alpha$  and endocrine resistance. *J Clin Oncol*. 2011;29(27):3750–3757. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.4873>.
31. Joel PB, Traish AM, Lannigan DA. Estradiol-induced phosphorylation of ER $\alpha$  via MAPK pathway. *Mol Endocrinol*. 1998;12(12):1919–1929. <https://doi.org/10.1210/mend.12.12.0216>.
32. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2021;72:233–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-060619-022342>.
33. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, et al. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutant breast cancer. *Ann Oncol*. 2020;31(3):377–386. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.006>.
34. Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and mechanisms of resistance. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00407-3>.
35. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(9):631–643. <https://doi.org/10.1038/nrc2713>.
36. Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2020;37(4):496–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.009>.

37. Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(7):2554–2559. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3913>.
38. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>.
39. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):307–318. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>.
40. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor–positive advanced breast cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:520–529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa110965>.
41. Clark DE, Pickett CA, Eisenberg BL, et al. Phosphorylation of estrogen receptor  $\alpha$  at Ser167. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44741–44746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105789200>.
42. Toy W, Shen Y, Won H, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet.* 2013;45(12):1439–1445. <https://doi.org/10.1038/ng.2822>.
43. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>.
44. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.004>.
45. Rosner M, Hengstschläger M. Nucleocytoplasmic localization of S6K1 isoforms. *Cell Signal.* 2008;20(7):1300–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.02.005>.

46. Filonenko VV, Khoruzhenko AI, Hotsuliak NY, et al. Identification of novel S6K1 isoforms in breast cancer cells. *Biopolym Cell*. 2014;30(1):14–22. <https://doi.org/10.7124/bc.000879>.
47. Savinska LO, Filonenko VV, Khoruzhenko AI. Alternative splicing of S6K1 and functional diversity. *Exp Oncol*. 2012;34(3):209–214.
48. Wang Z, Zhang X, Liu H, et al. A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , ER $\alpha$ 36: transduction of estrogen signaling and its clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(24):9063–9068. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603339103>.
49. Zhang XT, Kang LG, Ding L, et al. A positive feedback loop of ER $\alpha$ 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene*. 2011;30(7):770–780. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>.
50. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
51. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial–mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.
52. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>.
53. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol*. 2014;4:64. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064>.
54. Zhou HY, Huang S. mTOR signaling regulates cytoskeleton and motility. *J Biol Chem*. 2010;285(5):3159–3166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060186>.
55. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(1):9–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008>.
56. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the PI3K pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>.

57. Ip CKM, Cheung AN, Ngan HY, Wong AS. p70S6K in the control of breast cancer cell growth and metastasis. *Oncogene*. 2011;30(24):2697–2709. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.1>.
58. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor  $\alpha$  serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett*. 2010;584(1):124–128. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.11.034>.
59. Kosach VR, Hotsuliak NYa, Zaiets IV, et al. Alterations in expression of S6K1 isoforms in MCF7 cells have a strong impact on the locomotor activity as well as on S6K1 and Akt signaling. *Biopolym Cell*. 2020;36(2):110–121. <https://doi.org/10.7124/bc.000A7E>.
60. Garifulin OM, Zaiets IV, Kosach VR, et al. Alterations in S6K1 isoforms expression induce Epithelial to Mesenchymal Transition and Estrogen Receptor 1 Silencing in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Biopolym Cell*. 2023;39(3):189–200. <https://doi.org/10.7124/bc.000A9D>.
61. Zaiets, I. V., Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I. et al. The p60-S6K1 isoform of ribosomal protein S6 kinase 1 is a product of alternative mRNA translation. *Ukr Biochem J*, 2018; 90(4), pp. 25-35.
62. Zaiets, I. V, Holiar, V. V., Sivchenko, A. S. et al. p60-S6K1 represents a novel kinase active isoform with the mode of regulation distinct from p70/p85-S6K1 isoforms. *Ukr Biochem J*. 2019; 91(4), pp. 17-25.
63. Garifulin O. M., Filonenko V. V. , Bdzhola A. V. et al Expression of Ribosomal Protein S6 Kinase (S6K1) Isoforms in Different Types of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cytology and Genetics*. 2023;57( 4), pp. 305–311/
64. Zaiets, I. V., Sivchenko, A. S., Khoruzhenko, A. I., Filonenko V. V. Generation of HEK-293 stable cell lines with disrupted expression of ribosomal protein S6 kinase (S6K1) isoforms using the CRISPR/Cas9 genome editing system. *Biopolym Cell*. 2017;33(5), pp. 356-366.
65. 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. *Biopolym Cell*. 2019; 35(4), pp. 303-312
66. Faltas CL, LeBron KA, Holz MK. Unconventional estrogen signaling in health and disease. *Endocrinology*. 2020; 161(4)
67. Maruani DM, Spiegel TN, Harris EN. et al. Estrogenic regulation of S6K1 expression creates a positive regulatory loop in control of breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2012; 31(49): 5073-5080.
68. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC. et al. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem*. 2009; 284(10): 6361-6369.
69. Pon YL, Zhou HY, Cheung AN. et al. p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2008; 68(16): 6524-6532.
70. Artemenko M, Zhong SSW, To SKY, Wong AST. p70 S6 kinase as a therapeutic target in cancers: More than just an mTOR effector. *Cancer Lett*. 2022; 535: 215593.
71. Al Saleh S, Al Mulla F, Luqmani YA. Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PLoS One*. 2011; 6(6): e20610.
72. Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z. et al. Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol*. 2015; 43: 42-60.
73. Yamnik N, Liu S. Estrogen receptor  $\alpha$  and the PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer: a complex interplay. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 348(2):226—34.
74. Osborne CK. Estrogen receptors in breast cancer: Clinical utility and biology. *Steroids*. 1998; 63(5—6):287—93.
75. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al., and Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007; 87(3):905—31

76. Konno Y, Nagai Y, Ohta M, Tanaka H, Hayashi S. The N-terminal isoform of estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ -36, acts as a dominant-negative regulator of the full-length ER $\alpha$ 66 in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013;138:439–446. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.08.006>
77. Zhang X, Ding L, Kang L, Wang ZY. ER $\alpha$ 36, a variant of ER $\alpha$ , mediates the non-genomic actions of estrogen and antiestrogens. *Steroids.* 2010;75(6):629–634. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.022>
78. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017; 168(6):960–76.
79. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 2005; 280(27):25485–90.
80. Figueiredo VC, Markworth JF, Cameron-Smith D. Considerations on mTOR regulation at serine 2448: implications for muscle metabolism studies. *Cell Mol Life Sci.* 2017; 74(14):2537–45.
81. Feng H, McGovern E, Zhang J, Guo W, Moss A, Zhou X, et al. S6K1 is required for growth and proliferation in breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2011;9(12):1735–1744. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0313>
82. Duffy MJ. 2001. Carcinogen-embryonic antigen as a marker for cancer: From the laboratory to the clinic. *Clinica Chimica Acta.* 2001; 308(1–2):1–10.
83. Münz M, Kieu C, Gires O. The carcinoma-associated antigen Ep-CAM: a novel target for cancer therapy? *J Mol Med (Berl).* 2001;79(12):669–680. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0278-7>
84. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178–196.

## ДОДАТОК А

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

#### Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у Scopus

1. *A.V. Mazov, I. V. Kroupskaya*. Generation and characterization of polyclonal antibodies specific to human estrogen receptor ER $\alpha$ . *Biotechnologia Acta* T. 17, No. 3, 2024, P. 59-65.
2. *L. O. Savins'ka, S. A. Kvitchenko, S.S. Palchevskiy, I. V. Kroups'kaya, A. V. Mazov, O. M. Garifulin, V. V. Filonenko*. Generation of the MCF-7 cell sublines with CRIS PR/Cas9 mediated disruption of estrogen receptor alfa (ESR 1) expression. *Ukr. Biochem. J.*, (2024); 96(6):29-35.
3. *L.O. Savinska, S.A. Kvitchenko, M.Ye. Martsynyuk, I.V. Kroupskaya, A.P.Pogribna, A.V. Mazov, O.M. Garifulin, V.V Filonenko*. ESR1 Gene Editing and its Impact on S6K1 Signaling and Cell Behavior. *Biopolymers and Cell*. 2025; 41(3):181.

#### Публікації у матеріалах доповідей наукових конференцій

1. *A. V. Mazov* Differential effects of S6K1 isoforms on EMT-related gene expression in MCF-7 cells. Матеріали XVI річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2021). *Biopolymers and Cell*. 2021. Vol. 37. N3.
2. *A.V. Mazov, I.V. Kroupskaya, V.V. Filonenko*. Expression features of S6K1 isoforms at the mRNA level in human breast tumors of different molecular subtypes. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.
3. *A.B.Mazov, L.O.Savinska, S.S., Palchevskii, S.A., Kvitchenko, V.V., Filonenko*. The role of S6K1 isoforms in regulating ESR1 phosphorylation at Ser118 and Ser167 sites crucial for its activity, and the reciprocal effect on S6K1 activity. Матеріали XX річної конференції молодих вчених ІМБіГ (Київ, 2026). Збірка тез.

