

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
(посада)
академік Комісаренко С.В.



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

«Диференційний контроль регуляторних мереж, залучених до підтримання епітелійно-мезенхімної пластичності аденокарциномних клітин молочної залози»

Назва конкурсу: **«Підтримка досліджень провідних та молодих учених»**
Реєстраційний номер Проєкту: **2020.02/0195**

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту): Проєкт №2020.02/0195 **«Диференційний контроль регуляторних мереж, залучених до підтримання епітелійно-мезенхімної пластичності аденокарциномних клітин молочної залози»**

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу **«Підтримка досліджень провідних та молодих учених»**
протокол від **«16-17» вересня 2020 року № 21**

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту
Початок – 20 жовтня 2020 р.;
Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн.: **десять мільйонів гривень**

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік: **один мільйон п'ятсот тисяч гривень**
2-й рік **чотири мільйони п'ятсот тисяч гривень**
3-й рік **чотири мільйони гривень**

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено **10** виконавців, з них:
доктори наук **2**;
кандидати наук **5**;
інші працівники **3**.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач: Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Організація-субвиконавець проєкту: Інститут молекулярної біології і генетики НАН України.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Метою проєкту є з'ясувати молекулярні механізми залучення протеїну Ruk/CIN85 та ізоформ S6K1 до контролю ЕМП та метастазування раку молочної залози, ідентифікувати нові терапевтичні мішені і прогностичні маркери.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

- Виявити регуляторний взаємозв'язок між Ruk/CIN85 та ізоформами S6K1, проаналізувати рівні активності сигнальних шляхів на моделях аденокарциномних клітин молочної залози

Дослідити особливості

- транскриптому,

- метаболізму,

- розвиток ознак CSCs,

асоційованих з ЕМП, залежно від рівнів експресії Ruk/CIN85 та ізоформ S6K1.

- Дослідити вплив інгібіторів сигнальних/метаболічних шляхів, індукторів диференціювання на біологічні відповіді аденокарциномних клітин, асоційовані з ЕМП.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Рак молочної залози відноситься до онкологічних захворювань з найвищим показником смертності серед жінок у всьому світі через посилення хіміорезистентності пухлинних клітин та їх метастазування. Протягом останніх років оборотні процеси, асоційовані з епітелійно-мезенхімною пластичністю (ЕМП), були визнані рушійною силою в метастазуванні епітелійних злоякісних новоутворень. На сьогодні, молекулярні механізми, задіяні у регулюванні епітелійно-мезенхімної осі і, як наслідок, у потенціюванні або пригніченні метастазування *in vivo* досліджені недостатньо.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Молекулярні стратегії, за допомогою яких можна впливати на реверсію специфічного пухлинного фенотипу і різні стадії метастазування через контроль ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, залишаються невідомими. Зважаючи на сказане у проєкті будуть використані створені нами унікальні моделі аденокарциномних клітин молочної залози з up-/down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та ізоформ S6K1, що відрізняються за ступенем малігнізації пухлинних клітин. Зазначені клітинні технології дозволять здійснити широкомасштабний скринінг інгібіторів сигнальних шляхів та метаболічних ензимів, диференціальних факторів і специфічних siRNA з метою розробки комплексних терапевтичних підходів, здатних забезпечити інгібування ЕМП й прогресію до метастатичного раку молочної залози людини.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Реципрокний аналіз експресії Ruk/CIN85 та ізоформ S6K1 в отриманих сублініях буде проведено як на рівнях протеїну, так і мРНК методами Вестерн-блот аналізу (WB) та кількісної ПЛР (qPCR). Стан активності ключових ланок сигнальних мереж, транскриптому, ознаки CSCs та особливості метаболізму, залучених до контролю ЕМП-асоційованих біологічних відповідей клітин раку молочної залози, буде проаналізовано WB з використанням специфічних антитіл, qPCR та відповідних протоколів. Вплив інгібіторів сигнальних/метаболічних шляхів, індукторів диференціювання та їх комбінацій, специфічних siRNA на біологічні відповіді аденокарциномних клітин, асоційовані з ЕМП, буде досліджено за умов *in vitro* та *in vivo*.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Вперше показано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 може функціонувати в аденокарциномних клітинах молочної залози як один із ключових регуляторів епітелійно-мезенхімної пластичності (ЕМП), забезпечуючи зворотне динамічне модулювання стану активності ключових ланок сигнальних мереж, асоційованих з ЕМП, залежно від рівня його експресії.

Зокрема, встановлено регуляторну взаємозалежність між сигнальними протеїнами Ruk/CIN85 і ізоформами S6K1 в аденокарциномних клітинах з високим агресивним потенціалом. Порівняно вищий рівень фосфорилування Thr369 p70 S6K1 виявлено в клітинах 4T1 RukUp-1, які характеризуються вищим ступенем агресивності, тоді як в клітинах RukDown з вираженим епітелійним фенотипом, навпаки, мало місце зниження фосфорилування у порівнянні з відповідними контрольними зразками. У субклоні G4 аденокарциномних клітин молочної залози людини лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 детектовано вищий рівень фосфорилування залишку Thr369 у всіх ізоформах S6K1 (p85, p70, p60), тоді як вміст їх загальних форм практично не відрізнявся. Таким чином, нами продемонстровано, що як вміст, так і рівень активності p60 S6K1 в клітинах MCF-7 з up-регулюванням адаптерного протеїну корелюють з їх малігнізованим фенотипом.

В клітинах 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 виявлено високий вміст конститутивно активних фосфоформ кіназ Erk1/2, mTOR, cSrc та фосфоформи транскрипційного фактора NF-κB порівняно з відповідними даними у контрольних клітинах. Встановлено також більш потужне та тривале сигналювання, залежне від цих сигнальних компонентів, при стимуляції клітин епідермальним фактором росту (EGF), яке може бути залученим до контролю системних відповідей пухлинних клітин. Подібно до клітин 4T1, в клітинах лінії MCF-7 з найвищим рівнем експресії даного адаптера детектовано конститутивну активацію кіназ Erk, p70 S6K, Akt, Src, mTOR, NF-κB і його регуляторних компонентів, зміни динаміки їх EGF-опосередкованої активації, від тимчасової в контрольних клітинах до тривалої в клітинах з up-регулюванням Ruk/CIN85.

За результатами проведених досліджень, найбільш високий рівень вільного активатора плазміногену (uPA) спостерігався у клітинах сублінії 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 (RukUp), тоді як клітини 4T1 з пригніченою експресією Ruk/CIN85 характеризувались найбільш низьким вмістом активатора. Найменше співвідношення між вмістом вільного uPA до його комплексу з PAI-1 серед усіх досліджених субліній виявлено у клітинах RukUp. Підвищений вміст комплексу uPA/PAI-1 у клітинах RukUp може бути результатом надекспресії PAI-1 клітинами цієї сублінії. Встановлено, що в клітинах MCF-7, які стабільно на високому рівні надекспресують Ruk/CIN85, вміст рецептора uPAR також значно підвищений у порівнянні з „mock”-трансфікованими клітинами.

Продемонстровано, що у клітинах MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 вміст є значно вищим (в 3,3 рази) у порівнянні з контрольними клітинами. Натомість, пригнічення експресії адаптерного протеїну призводило до нормалізації рівня VDR. На основі отриманих даних можна зробити припущення про існування регуляторної взаємозалежності між морфофункціональним станом аденокарциномних клітин молочної залози, що модулюється у залежно від рівня експресії Ruk/CIN85, і вмістом сигнальної ланки, рецептора вітаміну D₃, з диференціальним потенціалом.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Запропоновані нами унікальні клітинні та молекулярні інноваційні технології дозволили отримати принципово нову інформацію стосовно особливостей стану активності окремих ланок сигнальних мереж, асоційованих з контролем міграційної активності, інвазивності та метастазування аденокарциномних клітин молочної залози залежно від рівнів експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та ізоформ кінази S6K1, що потенційно відкриває шлях до розробки нових індивідуалізованих підходів до лікування метастатичного раку молочної залози людини, і, як наслідок, що матиме вагоме медико-соціальне значення.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту
Завідувач відділу сигнальних механізмів
клітини ІБХ НАН України

(посада)

Дробот Людмила Борисівна

ПБ



(підпис)