

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор  
Інституту молекулярної біології і генетики  
НАН України  
Гукало М.А.



## АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

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

Вплив непротеїногенних аналогів лейцину на лейцин-залежні сигнальні шляхи mTORC1 у клітинах людини

Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0244

**Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок**

№ 2020.02/0244 «Вплив непротеїногенних аналогів лейцину на лейцин- залежні сигнальні шляхи mTORC1 у клітинах людини»

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 – 23 жовтня 2020 року;  
Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн. 9 175 200

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік	1 513 400
2-й рік	4 006 600
3-й рік	3 655 200

### 2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 8 виконавців, з них:

доктори наук	1;
кандидати наук	5;
інші працівники	2.

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

Грантоотримувач – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.  
Субвиконавці не залучаються.

#### **4. ОПИС ПРОЄКТУ**

##### **4.1. Мета Проєкту**

Вивчити вплив непротеїногенних амінокислот-аналогів лейцину на лейцин-індуковані сигнальні шляхи mTORC1 у нормальних та ракових клітинах людини *in vitro*

##### **4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)**

- 1) Перевірити гіпотезу щодо лейцил-тРНК синтетази людини (LRS) як сенсора лейцину для RagB/RagD;
- 2) Перевірити гіпотезу щодо LRS як сенсора лейцину для FLCN/FNIP2;
- 3) З'ясувати специфічність LRS та Sestrin2 до непротеїногенних аналогів лейцину;
- 4) Визначити вплив непротеїногенних амінокислот на mTORC1 у клітинах HEK293T
- 5) Дослідити вплив непротеїногенних амінокислот на mTORC1 у нормальних клітинах та клітиннах раку кишечника *in vitro*.

##### **4.3. Детальний зміст Проєкту:**

###### **- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)**

Комплекс mTORC1 регулює метаболічні процеси у клітинах ссавців у відповідності до концентрації доступних амінокислот, зокрема лейцину. Багато деталей щодо функціонування клітинних сенсорів лейцину - цитоплазматичної лейцил-тРНК синтетази (LRS) та Sestrin2 - залишаються нез'ясованими. Протеїногенні лейцин-подібні амінокислоти можуть брати участь у лейцин-залежних сигнальних шляхах, але вплив непротеїногенних аналогів майже не досліджували.

###### **- Новизна Проєкту (до 400 знаків)**

Вперше буде здійснено всебічне дослідження функціонування цитоплазматичної лейцил-тРНК синтетази людини як сенсора лейцину в лейцин-залежних сигнальних шляхах mTORC1 методами біохімічного аналізу, молекулярного докінгу і молекулярної динаміки; визначено специфічність сенсора лейцину Sestrin2 щодо непротеїногенних амінокислот; тестування *in vitro* дії непротеїногенних аналогів лейцину на клітини ліній HEK293T, епітелію кишечника і раку кишечника.

###### **- Методологія дослідження (до 400 знаків)**

Методами молекулярного докінгу і молекулярної динаміки, а також біохімічними методами ми визначимо здатність LRS утворювати комплекси з ГТФазами Rag, з FLCN-FNIP2 і з лізосомальним комплексом фолікуліну та модулювати їхній стан; специфічність LRS і Sestrin2 щодо непротеїногенних аналогів лейцину. Вплив аналогів лейцину на клітини людини *in vitro* вивчатимемо на основі моніторингу експресії генів *LARS1* і *SESN2* та рівня фосфорилування білків-мішеней mTORC1.

## 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)

Для експериментів з молекулярного докінгу і молекулярної динаміки цитозольної лейцил-тРНК синтетази людини (*HscЛейРС*) та ГТФаз Rag білкових комплексів було обрано два силових поля, AMBER 99 і SIRAN2.0, що дозволило проводити симуляції різного масштабу. Реконструйовані моделі із різним набором субстратів показали відповідність фінальних конформацій довготривалих молекулярних динамік відомим експериментальним спостереженням. До того ж, ми змогли продемонструвати коректність переходу між силовими полями та ідентичність отриманих результатів для обох типів симуляцій. Досліджуючи поведінку відомих регуляторних елементів ГТФаз Rag, ми змогли виявити тенденцію до їх структуризації у ГТФ-зв'язаному стані та якісні зміни у ГДФ-зв'язаному стані. Шляхом перебору симуляції різних моделей ми перевірили актуальність додавання ліганду для коректної симуляції *HscЛейРС*. Механізм відбору конформацій шляхом кластерінгу та візуальної інспекції був використаний для аналізу стабільних станів *HscЛейРС*, димерів RagA/RagC та RagB/RagD. Траєкторія останнього свідчить про те, що після порівняння із відомими структурами наша повністю реконструйована модель RagB<sup>ГТФ</sup>/RagD<sup>ГДФ</sup> продемонструвала таку ж поведінку, що і активний RagA<sup>ГТФ</sup>/RagC<sup>ГДФ</sup>. Надалі ми будемо використовувати цей алгоритм для визначення імовірності взаємодії досліджуваних об'єктів.

Виконання проєкту передбачає використання значних кількостей очищеної *HscЛейРС*, тому було проведено дослідження з оптимізації умов експресії та/або схеми очищення цього ферменту. Отримані результати показали відсутність суттєвої різниці у рівнях експресії рекомбінантної *HscЛейРС* при культивуванні клітин *E.coli* у LB або 2xYT середовищі. Крім того, при індукції протягом п'яти годин приблизно 50% від загальної кількості експресованої *HscЛейРС* перебуває у водорозчинній фракції клітинного лізату незалежно від виду середовища для культивування, а при експресії протягом 20 годин *HscЛейРС* у водорозчинній фракції практично відсутня. Отже, запропоновані зміни в умовах експресії не надали жодних переваг для отримання більших кількостей рекомбінантного білка у розчинній фракції лізату, тому наступним кроком була модифікація схеми очищення білка. Введення додаткових стадій очищення, а саме, іон-обмінної хроматографії на колонці з ДЕАЕ-сефарозою ексклюзивної хроматографії з використанням колонок Zeba™ Spin Desalting Columns (Thermo Scientific) дозволило отримати препаративні кількості високоочищеного препарату *HscЛейРС* і значно подовжити термін зберігання рекомбінантного білка без істотного зниження його активності.

Було проведено експресію ГТФаз RagA і RagC, клонованих у вектор для коекспресії білків pETDuet1. Плазмиди pETDuet RagA-RagC і pETDuet RagA(D130N)-RagC були люб'язно надані професором D.M. Sabatini (Whitehead Institute for Biomedical Research and Massachusetts Institute of Technology, USA) за посередництвом депозитарію Addgene (USA). Отримані результати свідчать про те, що при культивуванні у LB-середовищі та індукції експресії 0,5 мМ IPTG протягом 21 години при 20°C у клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysS відбувається експресія рекомбінантних ГТФаз RagA і RagC, але рівень експресії невисокий. Для ГТФази RagA показано, що вона перебуває переважно у розчинній фракції клітинного лізату, тому може бути отримана очищеною при застосуванні процедур, що зберігають нативну структуру білків. На наступних етапах виконання проєкту ми плануємо здійснити клонування кодон-оптимізованих послідовностей генів ГТФаз RagB і RagD у вектор pETDuet1, тому одержані на цьому етапі результати будуть корисними при вивченні експресії димеру RagB-RagD у клітинах *E.coli*.

Для встановлення рівня експресії генів *LARS1* і *SESN2*, які кодують *HscЛейРС* і Sestrin2 відповідно, проводився метод кількісної ПЛР (кПЛР) у реальному часі з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів до генів інтересу. Аналіз дозо- та часо-залежної стимуляції експресії *LARS1* в клітинах НЕК293Т виявив, що найбільша активуюча «відповідь» на присутність норваліна та лейцина в повному клітинному середовищі DMEM була в часовому проміжку 2,5 хв -15 хв і в концентраційному діапазоні 5 мкг/мл - 50 мкг/мл. На противагу цьому,

стимуляція клітин через підвищення концентрації обох амінокислот мала ефект пригнічення експресії сенсора *SESN2*. Таким чином, отримані результати вказують на можливість впливу норваліна на процеси біосинтезу білка, через активацію експресії гена *LARS1*, що кодує *HscЛейРС*, а також регуляцію *SESN2*-опосередованного mTORC сигнального каскаду.

**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.**

Порушення функціонування сигнальних шляхів, і серед них ланки mTOR-кінази, характерне для низки важких патологій людини включаючи онкологічні та нейродегенеративні захворювання. Виконання поставлених у проєкті завдань поглиблюють розуміння ролі лейцин-залежних шляхів mTORC1 в регуляції та координації клітинних функцій, а також їх ролі у туморогенезі з точки зору таргетної протипухлинної терапії, що є запорукою розробки нових терапевтичних препаратів та підходів в лікуванні хворих. Отримані нами результати вказують на можливість впливу норваліна на процеси біосинтезу білка, через активацію експресії гена *LARS1*, що кодує *HscЛейРС*, а також регуляцію *SESN2*-опосередованного mTORC сигнального каскаду. Тому у якості молекулярних мішеней можуть бути найважливіші учасники переносу сигналу на вказаних сигнальних шляхах, як з боку лейцил-тРНК синтезу так і з боку другого сенсору лейцину – білка Sestrin2. Такі спроби вже зроблені. Нещодавно вчені з Південної Кореї знайшли хімічну сполуку, BC-LI-0186, яка зв'язується з взаємодіючим з RagD доменом *HscЛейРС*, тим самим інгібуючи лізосомальну локалізацію активності *HscЛейРС* та mTORC1.

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

**Науковий керівник Проєкту**

Директор Інституту

Тукало М.А.



---