

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор
Інституту молекулярної біології і генетики НАН
України
Михайло ТУКАЛО



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2021 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

№ 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

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 29 квітня 2021 року

Закінчення – 15 грудня 2021 року

Загальна вартість Проєкту, грн. 8 971 200,00

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 513 400,00

2-й рік 3 802 600,00

3-й рік 3 655 200,00

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 9 виконавців, з них:

доктори наук 1;

кандидати наук 4;

інші працівники 4.

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

- 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 клітинах раку кишечника *in vitro*.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми

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

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

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, зокрема:

Методами флуоресцентної спектроскопії, часороздільної спектроскопії, ізотермічної калориметрії титрування та спектрометрії кругового дихроїзму було вивчено взаємодії цитозольної лейцил-тРНК синтетази (*HscЛейРС*) з лейцином та його непротеїногенними аналогами, норваліном, норлейцином та гомоцистеїном. Встановлено, що в усіх випадках реакція зв'язування була екзотермічним процесом, у присутності кожного з лігандів відбувались зміни у вторинній структурі білка та змінювався час життя останнього, найбільш сильне зв'язування відбувалося з норваліном і найслабше - з лейцином, що підтверджується різними експериментальними підходами. Методами молекулярної динаміки ми показали, що зв'язування лейцину практично не впливає на рухливість С-кінцевого домена *HscЛейРС* і структуру білка в цілому. В той же час наявність в активному сайті каталітичного домена проміжного продукту аміноацилювання, лейцил-аденілату, призводить до зростання ригідності елементів вторинних структур, які формують активний центр *HscЛейРС*, що впливає на структуру ферменту в цілому, а саме до зменшення рухливості С-кінцевого домена та змін у взаємному розташуванні С-кінцевого та каталітичного доменів.

Моделювання методами молекулярного білок-білкового докінгу та молекулярної динаміки взаємодії *HscЛейРС* з білками – учасниками лейцин-залежних сигнальних шляхів mTORC1 виявило, що *HscЛейРС* може утворювати комплекси як з гетеродимером RagB/RagD ГТФаз, так і з комплексом фолікулін (FLCN) – фолікулін взаємодіючий білок 2 (FNIP2). При взаємодії з RagB/RagD стабільними були лише комплекси, утворені за участю димеру, що знаходиться в активному стані. FLCN-FNIP2 контактує, імовірно, неспецифічно з каталітичним доменом *HscЛейРС*, але енергії взаємодії достатньо для утримання елементів ансамблю разом, що говорить не тільки про можливість формування комплексу, але його тривалого існування в такій формі. В усіх випадках стабільність утворених комплексів не залежала від наявності в активному центрі *HscЛейРС* лігандів: лейцину або лейцил-аденілату.

Було проведено оптимізацію нуклеотидних послідовностей генів ГТФази RagB і ГТФази RagD та на базі вектору pETDuet1 отримано генетичну конструкцію для одночасної експресії білків димеру RagB/RagD в клітинах *E.coli*. Здійснено мутагенез, експресію та очищення ГТФаз RagA/RagC. Отримано по пів міліграма високоочищених білків RagA(T21N)/RagC та RagA/RagC(S75N). На базі плазмиди [pSK24] pACYCDuet His-c7orf59|HBXIP (Shen et al., 2018) ми створили нову плазмиду pACYCDuet His-cMyc-c7orf59|HBXIP для експресії білка c7orf59, який містить додаткову мітку cMyc, що дозволить використовувати комплекс Ragulator в якості «наживки» при вивченні його білків-партнерів методом pull-down. Але умови очищення комплексу, який містить новий варіант субодиноці His-cMyc-c7orf59 потребують подальшої оптимізації. Було відпрацьовано методику експресії в клітинах HEK293T комплексу білків FLCN-FNIP2 та їх очищення. Вихід складав приблизно 10 мкг сумарного білка з однієї культуральної чашки діаметром 6 см. Здійснено експресію рекомбінантного білка Sestrin2 у клітинах HEK293T та отримано препаративні кількості високоочищеного білка (в середньому 15 мкг з однієї культуральної чашки діаметром 6 см). Отримано сублінію клітин з постійною експресією FLAG-WDR24 (компонента мультибілкового комплексу GATOR2) через лентивірусну трансдукцію у клітинний геном відповідної рекомбінантної кДНК та відпрацьовано умови експресії у цих клітинах білка Sestrin2 з наступною екстракцією комплексу Sestrin2-GATOR2.

Методом pull-down аналізу досліджено *in vitro* взаємодії *HscЛейРС* з білками RagA/RagC та FLCN-FNIP2. Встановлено, що утворення потрібного комплексу відбувається лише за участі RagA/RagC, який перебуває в активному стані. Наявність лейцину або лейцил-аденілату в активному центрі *HscЛейРС* не впливає на комплексоутворення.

Методом МТТ-тесту здійснено аналіз життєздатності клітин лінії HEK293T у присутності лейцину або його непротеїногенних аналогів (L-норлейцин та L-норвалін). Виявлено, що обидва аналоги спричиняють токсичну дію на життєздатність клітин, з найбільш виразним ефектом, характерним для L-норваліну.

Аналіз експресії генів білків-сенсорів лейцину, Sestrin2 (ген *SESN2*) та лейцил-тРНК синтетази (ген *LARS1*), в клітинах HEK293T після дозо- та часо-залежної обробки L-лейцином або його аналогами

виявив, що лише L-норвалін викликав зміни в експресії *SESN2* (стимуляцію) і лише L-гомоцистеїн – в експресії *LARS1* (стимуляцію).

Проведено Вестерн-блот аналіз фосфорилування кіназ S6K1 та ULK1 в клітинах лінії HEK293T за умови обробки L-лейцином L-норлейцином, L-норваліном та L-гомоцистеїном після періоду культивування в умовах дефіциту лейцину. Показано, що L-лейцин викликає стимуляцію фосфорилування як кінази S6K1, так і кінази ULK1, тоді як непротеїногенні аналоги лейцину не мають впливу на фосфорилування кінази S6K1, але стимулюють фосфорилування кінази ULK1.

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

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

Дослідження, здійснені в межах виконання проєкту, носять фундаментальний характер.

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

Дослідження, здійснені в межах виконання проєкту, носять фундаментальний характер.

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

Отримані результати можуть бути використані для фундаментальних досліджень сигнальних каскадів у клітинах людини, а також при розробці нових лікарських засобів на основі амінокислот – непротеїногенних аналогів лейцину.

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

Науковий керівник Проєкту

Директор Інституту

Михайло ТУКАЛО

(підпис)

