

УДК 576.36, 577.25, 616.006.6

В. Кухарчук, студ., А. Хоруженко, канд. біол. наук,
О. Чередник, канд. біол. наук, В. Філоненко, д-р біол. наук

ІМУНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ВМІСТУ S6K У КЛІТИНАХ ЛІНІЇ MCF-7 НА РІЗНИХ СТАДІЯХ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ

Досліджено внутрішньоклітинний вміст і локалізацію кіназ рибосомного білка S6 у кожній фазі клітинного циклу на клітинах лінії карциноми молочної залози людини MCF-7 за умов культури клітин in vitro. Виявлено, що вміст S6K значно зростає під час мітозу, порівняно з інтерфазою.

The subcellular localization and content of the ribosomal protein S6 kinase (S6K) were investigated during cell cycle using human breast cancer cell line. It was revealed, that the content of S6K increased during mitosis, in comparison with interphase.

Вступ. Кінази рибосомного білка S6 (S6K) беруть участь у внутрішньоклітинній сигналізації як нижня ланка PI3 кіназного каскаду [2,6]. У клітинах ссавців функціонує дві гомологічні форми цих кіназ: S6K1 та S6K2 з молекулярними масами відповідно 70 кДа і 54кДа. Для S6K1 та S6K2 характерна наявність як ядерної, так і цитоплазматичної ізоформ – S6K1 I, S6K2 I та S6K1 II, S6K2 II відповідно [5].

Шляхом фосфорилування низки субстратів S6K беруть участь у контролі над процесами, залученими до росту, розвитку, виживання клітин. Достеменно відомо, що фосфорилування S6 кіназою рибосомного білка S6 є важливим для формування полісом і транскрипції 5'TOP іРНК, що кодують рибосомні білки і фактори елонгації трансляції [3, 9]. Завдяки фосфорилуванню інших субстратів, а саме кінази eEF2 (еукаріотичний фактор елонгації трансляції 2), а також eIF4B (еукаріотичний фактор ініціації трансляції 4B), S6K беруть участь у регуляції ініціації та елонгації трансляції [9]. Сучасні дослідження показують, що ці кінази залучені і до регуляції апоптозу, оскільки, одним із субстратів є також проапоптичний білок BAD. Необхідно звернути увагу, що гомологи виконують функції, які переक्रиваються лише частково. Так, S6K2 не впливає на розмір клітин, на відміну від S6K1. Нещодавно отримані результати, які дозволяють припустити, що S6K відіграють важливу роль у проліферації клітин. Так, експериментально показано, що високий вміст S6K1 спостерігається у М фазі клітинного циклу, а S6K2 – у G2 та М фазах [1]. Підвищений вміст S6K1 виявлений у проліферуючих клітинах лінії раку прямої кишки LoVo, SW480, CaCO2, CaRi, DLD-1, COLO205 [7]. Непряме інгібування S6K призводить до зупинки клітинного циклу в G1 періоді [4]. Нещодавно виявлено новий субстрат S6K1 – шаперонін вмісний мульти-субодиничний комплекс TCP-1, що відповідає за фолдинг білка в еукаріотичних клітинах. TCP-1 залучений до фолдингу актину, тубуліну і таких регуляторів клітинного циклу, як циклін Е, cdc20, polo-like kinase 1 (PLK1). Отже, TCP-1 відіграє істотну роль у регуляції клітинного поділу та організації цитоскелету. S6K1 разом з RSK фосфорилує субодиницю β TCP-1 по сайту Ser-260, що призводить до активації даного комплексу [10]. У існуючій літературі не наводиться інформація про вміст, локалізацію та субстратну специфічність S6K1 та S6K2 на різних стадіях клітинного циклу.

Зважаючи на наведені вище дані, метою представленої роботи було дослідження вмісту та особливостей субклітинної локалізації S6K на усіх стадіях проліферації. Особлива увага зверталась на локалізацію і зміну вмісту S6K1 та S6K2 під час різних фаз мітозу.

Низкою досліджень показано, що PI3K сигнальний шлях гіперактивується у різних типах злоякісно трансформованих тканин, саме тому компоненти PI3K каскаду вважаються перспективними мішенями для протира-

кової терапії. Виявлення вмісту S6K наразі використовується як маркер активності даного сигнального шляху та чутливості пухлин до інгібіторів PI3K, mTOR. Але використання рапаміцину, вортманіну та інших інгібіторів призводить до неспецифічного порушення не лише проліферативної активності клітин, але й їх метаболізму, виживання, росту, старіння. Дослідження функцій нижніх ланок PI3K каскаду дозволить більш специфічно регулювати процеси життєдіяльності як нормальних, так і трансформованих клітин.

Об'єкт та методи дослідження. У роботі використовували культуру клітин карциноми молочної залози людини MCF-7, яка характеризується високим рівнем експресії досліджуваних кіназ і тому не потребує систем підсилення імуноцитохімічної реакції. Візуалізацію вмісту та локалізації S6K на кожній стадії клітинного циклу проводили за допомогою імуноцитохімічного методу з наступною флюоресцентною мікроскопією.

Культивування клітин. Лінію клітин карциноми молочної залози людини MCF-7 вирощували в середовищі DMEM, з додаванням 10% телячої ембріональної сироватки (ТЕС). Після досягнення моношару, клітини перенесли на покривні скельця, які попередньо кип'ятили у бідистильованій воді протягом 30 хвилин та автоклаували за температури 120°C протягом 1 години.

Подвійний імуноцитохімічний аналіз клітин MCF-7. Клітини, культивовані на покривних скельцях, промивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) і фіксували метанолом протягом 10 хв за кімнатної температури. Клітинні мембрани пермеабілізували розчином 0,2 % Triton X-100 на ФСБ протягом 15 хв. Автофлюоресценцію пригнічували шляхом інкубації з розчином CuSO₄ (10 mM), CH₃COONH₄ (50 mM), pH 5,0 протягом 30хв за кімнатної температури. Для уникнення неспецифічного зв'язування антитіл, клітини інкубували з 10% ТЕС в ФСБ протягом 40хв при 37°C. Суміш первинних антитіл наносили у розчині 10 % ТЕС в ФСБ у розведеннях: моноклональні мишачі проти Ki-67 1:1000, поліклональні кролячі проти S6K1/S6K2 1:100. Інкубацію з первинними антитілами проводили протягом 60хв при 37°C у вологій камері. Після інкубації зразки промивали ФСБ та наносили суміш вторинних антитіл у розчині 10% ТЕС в ФСБ у розведеннях: анти-мишачі антитіла, мічені FITC 1:400, анти-кролячі антитіла, мічені Texas Red 1:400 та інкубували протягом 40хв за температури 37°C у вологій камері. Препарати промивали ФСБ та заключали у середовище, що містило 0,1 М лимонну кислоту, 0,2 М Na₂HPO₄, 50% гліцерину, pH 5,5.

Імуноцитохімічне дослідження клітин MCF-7 з наступним дофарбовуванням Hoechst 33258. Як було описано вище, клітини фіксували метанолом, інкубували з Triton X-100, буфером для пригнічення автофлюоресценції, 10% телячої ембріональної сироватки. Первинні моноклональні мишачі антитіла проти S6K1

використовували у розведенні 1:50, а проти S6K2 – 1:100. Вторинні анти-мишачі антитіла, мічені FITC, наносили у такому ж розведенні як і для подвійної імуноцитохімії. Після інкубування з вторинними антитілами, для детекції клітин на стадії поділу, препарати дофарбовували Hoechst 33258 у розведенні 0,25 мкг/мл протягом 3 хв.

Для морфологічних досліджень використовували люмінесцентний мікроскоп Leica DM 1000, обладнаний цифровою фотокамерою Canon Power Shot S70.

Статистичну обробку проводили за допомогою тетрагоричного показника кореляції. Для цього підраховували кількість Ki-67-позитивних клітин та клітин з підви-

щеною імунохімічною реакцією на S6K у трьох ділянках препарату з кількістю клітин не менше 300. $p < 0,01$ вважали статистично вірогідним.

Результати та обговорення. Для проведення імуноцитохімічного дослідження були використані клітини, що досягли 70-відсоткового конфлюентного моношару. Імунофлюоресцентна реакція виявила, що клітинам, які знаходяться на стадії інтерфази, властива переважно цитоплазматична локалізація S6K1 та S6K2, у ядрах спостерігається незначна позитивна імунохімічна реакція (Рис.1).

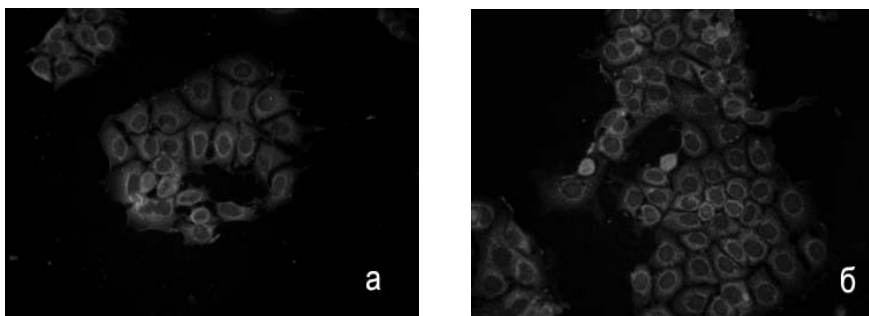


Рис.1. Локалізація S6K у клітинах MCF-7 на стадії інтерфази. а-імунохімічна реакція на S6K1, б-імунохімічне виявлення S6K2. Ок.10х, об. 40х

Отримані дані можуть свідчити про те, що на цій стадії клітинного циклу S6K фосфорилують цитоплазматичні субстрати, а саме рибосомний білок S6, eEF2K, eIF4B [9]. Отже, припускається, що основною функцією S6K під час інтерфази є регуляція апарату біосинтезу білка [3]. Проте, роль S6K1 та S6K2 у цитоплазмі клітин дещо відрізняється. Так, відомо, що для S6K2, на відміну від S6K1, характерна перичентросомна локалізація протягом усього клітинного циклу, але причина цього явища наразі невідома [8].

Незначна позитивна імуноцитохімічна реакція на S6K у ядрах клітин MCF-7 може бути спричинена транспортуванням кіназ у ядро та їх взаємодією з ядерними субстратами, а саме транскрипційним фактором CREM, субодиноцею кеп-зв'язувального комплексу CBP80, білком SKAR [9]. Механізми релокалізації S6K1 та S6K2 у ядро та зворотного експорту в цитоплазму відрізняються. Так, попередні дослідження виявили, що

транспортування S6K2 у ядро регулюється фосфорилуванням даної кінази по сайту Сер 486, що розміщується у С-кінцевому сигналі ядерної локалізації, протеїнкіназою С (PKC). Також відомо, що S6K1 експортується з ядра внаслідок опосередкованого казеїнкіназою 2 (CK2) фосфорилування Сер17 в межах послідовності сигналу ядерної локалізації, що розташований на N-кінці. Причини та наслідки релокалізації S6K достеменно не відомі і зараз активно досліджуються.

Подвійна імунофлюоресцентна реакція дозволила виявити, що клітинам MCF-7 на стадії поділу властиве суттєве підвищення вмісту S6K1 та S6K2, порівняно з інтерфазними клітинами (Рис.2). Аналіз кореляції присутності антигену Ki-67 та посиленої реакції на S6K1/S6K2 підтвердив наявність зв'язку між процесом активації проліферації та зростанням вмісту кіназ рибосомного білка S6.

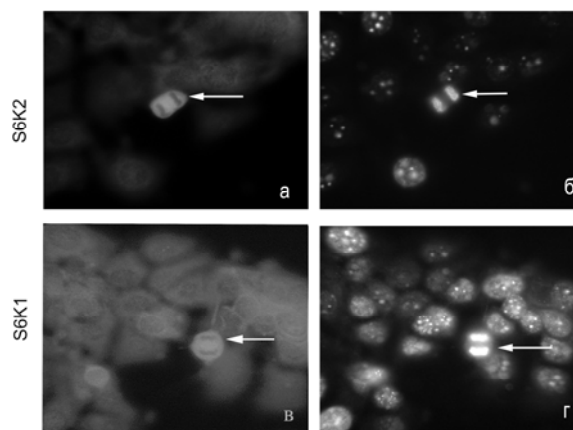


Рис. 2. Імунофлюоресцентна реакція на Ki-67, S6K1, S6K2 у клітинах лінії MCF-7. а, в – виявлення S6K1/S6K2; б, г – виявлення Ki-67; Клітини на стадії поділу позначені стрілками. Ок. 10х, об. 100х

Імуноцитохімічний аналіз вмісту S6K1 та S6K2 на кожній фазі мітозу показав, що під час профази спостерігається незначне підсилення реакції, хоча у цей період відбувається зниження кількості полісом у цитоплазмі та рибосом на грЕПС, що свідчить про пониження рівня синтезу білка. Виявлено, що протягом метафази, анафази та телофази вміст досліджуваних кіназ суттєво зростає. Відзначається посилення реакції у цитоплазмі клітин, при цьому зв'язування із хромосомами відсутнє (Рис. 3). На рис.3 представлені результати лише для S6K1, для S6K2 отримані подібні дані. Під час ме-

тафази, анафази та телофази у клітині має місце міграція хромосом до полюсів клітини, внаслідок реорганізації веретена поділу, а також відновлення ядерної мембрани у телофазі. Відомо, що один із субстратів S6K – TCP1, бере участь у фолдингу актину і тубуліну, які залучені до формування веретена поділу під час мітозу [10]. Показано, що мутації в генах, які кодують TCP1, призводять до аномалій у ході каріокінезу, порушення взаємодій мікротрубочок веретена поділу із хромосомами і втрати частини хромосом.

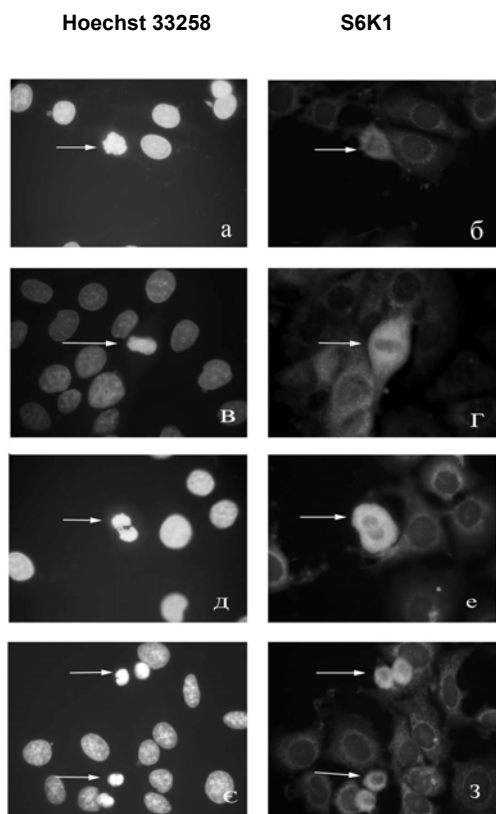


Рис. 3. Імунофлуоресцентне виявлення S6K1 у клітинах MCF-7 на різних стадіях мітозу.

а, б – профаза; в, г – метафаза; д, е – анафаза, з – телофаза. Клітини на відповідних стадіях позначені стрілками.
а, в, д, з – морфологічне визначення різних фаз мітозу. ДНК дофарбовано Hoechst 33258.
б, г, е, з – локалізація та вміст S6K1 на відповідних стадіях поділу. Ок. 10х, об. 100х

Отримані нами результати співпадають із даними дослідження, у якому за допомогою проточної цитофотометрії виявлено підвищення вмісту S6K у М-фазі клітинного циклу [1]. Однак, у нашій роботі вперше проаналізовано характер субклітинної локалізації та вмісту S6K на різних стадіях мітозу. Явище зростання вмісту досліджуваних кіназ під час поділу клітин у доступній літературі поки що не висвітлено. Зважаючи на відкриття нового субстрату S6K – TCP-1, який відповідає, у тому числі, за фолдинг цикліну Е та отриманих у нашій лабораторії даних про взаємозв'язок MAPK сигнального каскаду і S6K, можна зробити припущення про безпосередню участь S6K у регуляції клітинного циклу.

Висновки. Виявлено, що вміст S6K у клітинах карциноми молочної залози людини MCF-7 значно зростає при переході до мітозу. За допомогою тетрахоричного показника кореляції підтверджено зв'язок між підвищеною імунофлуоресцентною реакцією на S6K та наявністю позитивної реакції на антиген проліферації Ki-67. Вперше досліджено особливості субклітинної локаліза-

ції та вмісту S6K1 і S6K2 на різних стадіях мітозу. Показано, що найяскравіша імуноцитохімічна реакція спостерігається під час метафази, анафази та телофази, тоді як у профазі підсилення реакції є незначним, порівняно з інтерфазними клітинами. Посилення імуноцитохімічної реакції відбувається в цитоплазмі клітин, зв'язування з хромосомами відсутнє. Це дозволяє зробити висновок про залучення S6K до процесу регуляції клітинного циклу. Отримані дані ідентичні для S6K1 та S6K2, що може свідчити про участь обох форм кіназ рибосомного білка S6 у регуляції проліферації. Розробка даного напрямку потребує подальших досліджень з метою з'ясування механізмів описаного явища.

1. Boyer D., Quintanilla R., Lee-Fruman K. Regulation of catalytic activity of S6 kinase 2 during cell cycle // *Mol. Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 307. – № 2. – P. 59-64.
2. Carracedo A., Pandolfi P. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 5527-5541.
3. Dufner A., Thomas G. Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation // *Experimental Cell Research.* – 2000. – Vol. 253. – P. 100-109.
4. Francesc V., Chambard J., Pouyssegur J. p70 S6 Kinase-mediated Protein Synthesis Is a Critical Step for Vascular Endothelial Cell Proliferation

// J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – № 38. – P. 26776-26782. 5. Gout I., Minami T., Hara K., Filonenko V. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – № 46. – P.3061-3064. 6. Hanks S., Hunter T. Protein kinases 6. Jastrzebski K., Hannan K. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function // Growth Factors. – 2007. – Vol. 25. – № 4. – P. 209-226. 7. Nozawa H., Watanabe T., Nagawa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer // Cancer Letters. – 2007. – Vol. 251. – P. 105-113.

8. Rossi R., Pester J., McDowell M. Identification of S6K2 as a centrosomelocated kinase // FEBS Lett. – 2007. – Vol.581. – P. 4058-4064. 9. Ruvinsky I., Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size // Trends Biochem Sci. – 2006. – Vol.31. – P. 342-348. 10. Yuki Abe, Sang-Oh Yoon, Kazuishi Kubota. RSK and S6K link phosphorylation of the eukariotic chaperonin containin TCP-1 (CCT) to growth factor, insulin and nutrient signaling // JBS. – 2009. – Vol. 280. – P. 10654-10662.

Надійшла до редколегії 16.10.09

УДК 599.722 (477)

М. Ільєнко, д-р біол. наук, Г. Романюк, асп.

ПОРІВНЯННЯ ЖУВАЛЬНОГО АПАРАТУ ПРЕДСТАВНЕКІВ РОДИНИ СОБАЧИХ ТА ПЛЯМИСТОЇ ГІЄНИ (*CROCUTA CROCUTA*)

Наше дослідження вивчає пристосування хижаків до розгризання кісток. Для цього проведений біомеханічний аналіз щелепного апарату собак у порівнянні з плямистою гієною.

This investigation research crack bone adaptation of carnivorous mammals. For that biomechanical analysis of jaw apparatus of canine relatively with spotted hyena are discussed.

Вступ. Хижі представники ряду *Carnivora* живляться переважно хребетною здобиччю. При цьому вони стикаються з рядом проблем, пов'язаних з захватом, вбивством та подрібненням здобичі, що спричинюють навантаження на жувальний апарат хижаків. Різні трофічні стратегії впливають на черепно-лицьовий скелет ссавців і форму окремих кісток в ньому [1, 3]. Дослідивши зв'язок морфо-функціональних параметрів жувального апарату з трофічною спеціалізацією тварин можна передбачити його принципові функціональні можливості, що може бути використане в палеозоології та для систематики.

Особливістю трофічних стратегій собак та гієнових є розгризання кісток великого діаметру. Для цього собаки використовують премолляри (P_4), а гієнові – моляри (M_1). Метою цього дослідження є порівняння жувального апарату представників родини собак та плямистої гієни у

зв'язку з пристосуванням до поїдання твердої їжі. Для цього нижня щелепа моделювалася як консольна балка, що дозволяє аналізувати конструкцію щелепи, використовуючи механічні принципи роботи важеля.

Об'єкти та методи дослідження. Досліджувалися нижні щелепи 9 видів родини *Canidae* (*Alopex lagopus*, *Canis latrans*, *C. lupus*, *Speothos venaticus*, *Lycaon pictus*, *Chrysocyon brachyurus*, *Nyctereutes procyonoides*, *Vulpes vulpes*, *V. corsac*) та 1 вид родини *Hyaenidae* (*Crocota crocuta*).

В даному дослідженні нижні щелепи собак та гієни розглядалися як важелі. Були виміряні довжини робочої і балансуєчої сторони плеча важеля (рис. 1).

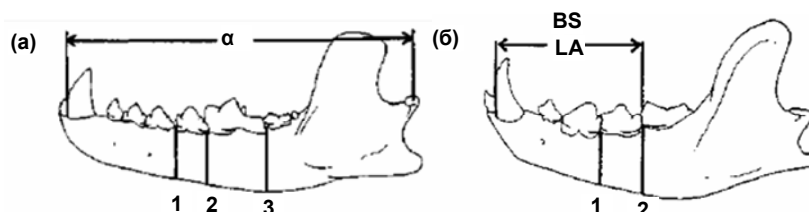


Рис. 1. Лінійні проміри та розташування міжзубних проміжків у а) собак та б) гієнових.

Скорочення: DL – довжина нижньої щелепи (ДНЩ); WSLA – робоча сторона плеча важеля (РСПВ); BSLA – балансуєча сторона плеча важеля (БСПВ). Плечі важеля ілюстровані для міжзубного проміжку P_4M_1 . Міжзубні проміжки: 1) P_3P_4 , 2) P_4M_1 та 3) M_1M_2

Довжина робочої сторони плеча важеля (РСПВ) вимірювалася як відстань від центра обертання нижньощелепного відростка до міжзубного проміжку між P_4 та M_1 (далі РМ) у собак та до проміжку між M_1 та M_2 (далі ММ) у гієни. Довжина балансуєчої сторони плеча важеля (БСПВ) вимірювалася як відстань від відповідного міжзубного проміжку (РМ для собак, ММ для гієни) до міжзубного проміжку між I_3 та нижнім іклом. Були виміряні також такі показники як ширина нижньої щелепи (ШНЩ) та довжина нижньої щелепи (ДНЩ).

Результати та їх обговорення. Собаки мають досить багато морфологічно примітивних щічних зубів (у більшості). Переважне місце обробки кісток у них локалізоване в молярах, що дозволяє збільшити оклюзійну

силу, порівняно з премоллярами, оскільки довжина робочої сторони важеля до молярів коротша, ніж до премоллярів. Однак, каудальна позиція молярів зменшує діаметр кісток, які можуть оброблятися цими зубами.

Гієни використовують техніку вбивства собак [2] і мають подібну до них довжину нижньої щелепи. Нижні щелепи гієни, з іншого боку, демонструють значну адаптацію до поїдання твердої їжі. Кількість кутніх зубів у неї зменшена. Кістки обробляються премоллярами, що дає змогу розгризати кістки великого діаметру, завдяки можливості збільшити розкриття щелеп. Дійсно, досліджуючи відношення РСПВ до ДНЩ, плече важеля від нижньощелепного суглоба до премоллярів у гієни більше, ніж у собак до молярів (рис. 2).