

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ІНЦ«Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИННИХ ЛІНІЙ MCF-7 З
РІЗНОЮ ЕКСПРЕСІЄЮ ER α З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕХНОЛОГІЇ
CRISPR/Cas9**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Квітченко Софії Андріївни

Науковий керівник від кафедри

д-р філософії Нікітіна Н. С.

Робота виконана у відділі сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом ст. наук. співроб. відділу, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Савінської Лілії Олексіївни

Київ – 2026 р.

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі із застосуванням технології CRISPR/Cas9 створено клітинні сублінії карциноми молочної залози MCF-7 з модифікованою експресією ізоформ естрогенового рецептора альфа (ER α). Метою роботи було отримання та характеристика субліній MCF-7 з різною експресією ізоформ ER α для з'ясування ролі окремих ізоформ у регуляції ER α -залежного сигналіngu, епітеліально-мезенхімального переходу та функціональних властивостей клітин.

Об'єктом дослідження були CRISPR/Cas9-модифіковані сублінії MCF-7 з повним (MCF-7/9) та частковим (MCF-7/12) блокуванням ізоформи ER α -66. Для характеристики субліній використовували вестерн-блот аналіз, кількісну ПЛР у реальному часі, МТТ-тест, ресазуриновий тест проліферативної активності та тест ранової поверхні для оцінки міграційної здатності клітин.

Встановлено, що повне блокування ER α -66 супроводжується компенсаторною надекспресією ізоформи ER α -46 та значним зниженням експресії S6K1 на рівні мРНК і білка, що підтверджує роль ER α як транскрипційного фактора для S6K1. Показано, що блокування ER α -66 не призводить до ініціації EMT, що свідчить про можливу участь інших ізоформ ER α у регуляції цього процесу. Виявлено зміну динаміки фосфорилування компонентів шляху mTOR/S6K1 за умов метаболічного стресу, зниження метаболічної активності та підвищення стресостійкості клітин з повним блокуванням ER α -66. Обидві сублінії демонстрували зниження швидкості міграції, та тенденцію до уповільнення проліферації.

Кваліфікаційна робота викладена на 59 сторінках, ілюстрована 13 рисунками та містить 2 таблиці. Список використаних джерел включає 51 найменування.

Ключові слова: естрогеновий рецептор альфа, CRISPR/Cas9, MCF-7, епітеліально-мезенхімальний перехід, S6K1, рак молочної залози.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДСН	–	додecilсульфат натрію;
ЕДТА	–	етилєндіамінтетраоцтова кислота;
АКТ	–	protein kinase B (серин/треонін-специфічна протеїнкіназа);
СЕА	–	carcinoembryonic antigen (карциноємбріональний антиген);
DBD	–	DNA-binding domain (ДНК-зв'язувальний домен);
DMEM	–	Dulbecco's Modified Eagle Medium (модифіковане за Дульбекко середовище Ігла);
E2	–	17 β -estradiol (17 β -єстрадіол);
EGF	–	epidermal growth factor (епідермальний фактор росту);
EMT	–	epithelial-to-mesenchymal transition (епітеліально-мезєнхімальний перехід);
EpCAM	–	epithelial cell adhesion molecule (молекула адгезії епітеліальних клітин);
ERE	–	estrogen response element (єстроген-відповідний елемент);
ER α	–	estrogen receptor alpha (єстрогєновий рецептор альфа);
FBS	–	fetal bovine serum (фєтальна бичача сироватка);
gRNA	–	guide RNA (гїдова РНК);
Hsp90	–	heat shock protein 90 (білок теплового шоку 90);
LBD	–	ligand-binding domain (ліганд-зв'язувальний домен);
MAPK	–	mitogen-activated protein kinase (мітоген-активована протеїнкіназа);
MCF-7	–	Michigan Cancer Foundation-7 (лінія клітин карциноми молочної залози, створєна Мічиганським фондом боротьби з раком);
mTOR	–	mammalian target of rapamycin (мішені рапаміцину у ссавців);
mTORC1	–	mammalian target of rapamycin complex 1 (комплекс 1 мішені рапаміцину у ссавців);

PBS	–	phosphate-buffered saline (фосфатно-сольовий буфер);
PDK1	–	phosphoinositide-dependent kinase 1 (фосфоінозитид-залежна кінза 1);
PI3K	–	phosphoinositide 3-kinase (фосфоінозитид-3-кінза);
S6K1	–	ribosomal protein S6 kinase 1 (кінза рибосомного білка S6);
SERDs	–	selective estrogen receptor degraders (селективні деградатори естрогенових рецепторів);
SERMs	–	SERMs – selective estrogen receptor modulators (селективні модулятори естрогенових рецепторів);
shRNA	–	shRNA – short hairpin RNA (коротка шпилькова РНК);
TGF β	–	TGF β – transforming growth factor beta (трансформуючий фактор росту бета).
ZEB1	–	zinc finger E-box-binding homeobox 1 (транскрипційний фактор EMT).

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. Естрогеновий рецептор альфа: структурно-функціональна організація та значення у патогенезі раку молочної залози	9
1.1. Структурна організація та ізоформи естрогенового рецептора альфа	9
1.2. Механізми геномної та негеномної сигналізації за участю ER α	13
1.3. ER α -залежна регуляція епітеліально-мезенхімального переходу	17
1.4. Терапевтичні стратегії таргетування естрогенового рецептора при раку молочної залози	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	25
2.1. Матеріали та обладнання	25
2.2. Культивування клітин ссавців	26
2.3. Отримання CRISPR/Cas9-модифікованих стабільних клітинних ліній ...	27
2.4. Приготування клітинних лізатів	28
2.5. Визначення концентрації білка методом Бредфорда	28
2.6. Диск-електрофорез білків у системі Лемлі	29
2.7. Вестерн-блот аналіз	30
2.8. Кількісна ПЛР у реальному часі	31
2.9. Аналіз виживаності клітин з використанням МТТ-тесту	32
2.10. Визначення проліферативної активності клітин ресазуриновим методом	32
2.11. Визначення міграційної активності клітин методом раневої поверхні..	33
2.12. Статистичний аналіз даних	34
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	35
3.1. Характеристика CRISPR/Cas9-модифікованих субліній MCF-7 за рівнем експресії ER α та S6K1	35
3.2. Оцінка статусу епітеліально-мезенхімального переходу у сублініях зі зміненою експресією ER α	38

3.3. Динаміка ER α -залежного сигналіngu за умов метаболічного стресу: аналіз фосфорилування компонентів шляху mTOR/S6K1	42
3.4. Оцінка проліферативної активності клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ER α	46
3.5. Аналіз міграційної активності клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ER α	48
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	53

ВСТУП

Рак молочної залози залишається найпоширенішим онкологічним захворюванням серед жіночого населення у світі. Здатність пухлинних клітин до метастазування та набуття резистентності до терапії зумовлює високий рівень смертності від цього захворювання. Первинні карциноми молочної залози здебільшого піддаються хірургічному лікуванню, натомість метастатичне ураження кісткової тканини, головного мозку, легень та печінки суттєво ускладнює лікування і погіршує прогноз [1].

Естрогеновий рецептор альфа ($ER\alpha$) є основною терапевтичною мішенню приблизно у 80 % випадків раку молочної залози. ER -позитивні пухлини відзначаються повільним ростом, сприятливим прогнозом та чутливістю до гормональної терапії. На противагу цьому, ER -негативний рак молочної залози характеризується агресивним перебігом, резистентністю до гормонотерапії та високою частотою рецидивів [2].

$ER\alpha$ належить до надродина ядерних рецепторів – транскрипційних факторів, активність яких регулюється зв'язуванням з естрогеном або естрадіолом. Біологічна дія естрогенів здійснюється через геномний та негеномний механізми. Геномний шлях полягає у регуляції транскрипції генів-мішеней після зв'язування ліганду, димеризації рецептора та його транслокації до ядра. Негеномна сигналізація ініціюється зв'язуванням естрогену з мембранно-асоційованим рецептором і призводить до активації каскадів MAPK та PI3K-AKT-mTOR. Ці шляхи здатні активувати $ER\alpha$ ліганд-незалежним способом через фосфорилування за залишками Ser118 та Ser167, що забезпечує транскрипційну активність рецептора навіть за відсутності ліганду і сприяє розвитку гормональної резистентності [3 – 8].

Сучасні методи ендокринної терапії потребують удосконалення через розвиток резистентності та виникнення рецидивів. Існування декількох ізоформ $ER\alpha$ з різними функціональними властивостями додатково ускладнює розуміння механізмів естрогенової сигналізації [3]. Застосування технології

CRISPR/Cas9 з гідовими РНК до першого екзону гена ESR1 дозволяє селективно блокувати повнорозмірну ізоформу ER α -66, зберігаючи експресію вкорочених ізоформ ER α -46 та ER α -36.

Наукова новизна роботи полягає у створенні клітинних субліній MCF-7 з модифікованим співвідношенням ізоформ ER α та характеристиці їхнього впливу на ER α -залежний сигналінг. Вперше показано взаємозв'язок між селективним блокуванням ER α -66 та зміною експресії S6K1, досліджено вплив модифікації на статус епітеліально-мезенхімального переходу, вивчено динаміку фосфорилювання компонентів сигнального шляху mTOR/S6K1 та функціональні властивості клітин.

Практичне значення отриманих результатів визначається можливістю використання створених клітинних субліній як моделей для дослідження специфічних функцій окремих ізоформ ER α у канцерогенезі та для тестування нових терапевтичних підходів, спрямованих на подолання резистентності до ендокринної терапії.

Мета роботи полягала в отриманні та характеристиці клітинних субліній карциноми молочної залози MCF-7 з різною експресією ізоформ рецептора ER α із застосуванням технології CRISPR/Cas9.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- 1) одержати та охарактеризувати CRISPR/Cas9-модифіковані сублінії MCF-7 за рівнем експресії ізоформ ER α та S6K1;
- 2) оцінити статус епітеліально-мезенхімального переходу у сублініях зі зміненою експресією ER α ;
- 3) дослідити динаміку ER α -залежного сигналінгу за умов метаболічного стресу шляхом аналізу фосфорилювання компонентів шляху mTOR/S6K1;
- 4) оцінити метаболічну, проліферативну та міграційну активність клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ER α .

РОЗДІЛ 1

ЕСТРОГЕНОВИЙ РЕЦЕПТОР АЛЬФА: СТРУКТУРНО- ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ЗНАЧЕННЯ У ПАТОГЕНЕЗІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

1.1. Структурна організація та ізоформи естрогенового рецептора альфа

Естрогеновий рецептор альфа належить до родини ліганд-залежних ядерних рецепторів, що активуються стероїдними гормонами – естрогеном та естрадіолом (E2). Ген ESR1 локалізований на 6-й хромосомі людини. ER α функціонує як транскрипційний фактор, забезпечуючи регуляцію проліферації та диференціювання клітин, бере участь у підтриманні гомеостазу кісткової тканини та контролює розвиток і функціонування жіночої репродуктивної системи [9]. Надмірна естрогенова стимуляція, ліганд-незалежна активація рецептора або мутації в гені ESR1 призводять до розвитку злоякісних новоутворень, зокрема раку молочної залози [6, 7].

Повнорозмірний ER α складається з 595 амінокислотних залишків і має молекулярну масу 66,2 кДа. Молекула ER α -66 організована у шість структурних доменів, позначених літерами від A до F (рис. 1.1). Три з них є функціонально значущими: N-кінцевий домен (NTD), утворений ділянками A/B і містить активаційний домен AF-1; ДНК-зв'язувальний домен (DBD), представлений C-ділянкою; та ліганд-зв'язувальний домен (LBD), що відповідає E-ділянці молекули [9 – 11].

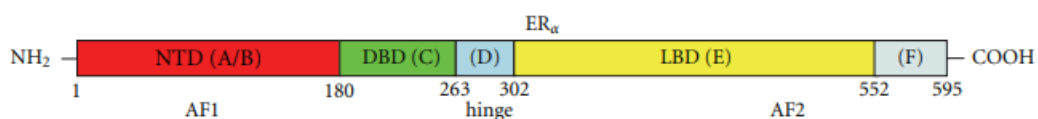


Рис. 1.1. Схематичне зображення доменної організації молекули ER α -66 [10]

Домен AF-1 є основним фактором ендокринної чутливості рецептора і відповідає за транскрипційну активацію. Серед усіх структурних елементів ER α саме цей домен характеризується найвищою варіабельністю. ДНК-зв'язувальний домен, навпаки, є високо консервативною ділянкою. Він забезпечує взаємодію рецептора з естроген-відповідними елементами (ERE) – паліндромними послідовностями 5'-AGGTCA nnnn TGACCT-3', локалізованими на промоторах або енхансерах генів-мішеней. DBD та LBD з'єднує D-домен – так звана шарнірна (гнучка) область, що містить сигнал ядерної локалізації, що експонується після зв'язування ліганду рецептором.

Ліганд-зв'язувальний домен AF-2 сформований дванадцятьма альфа-спіралями та містить гормон-зв'язувальну кишеню. LBD забезпечує більшість ліганд-залежних функцій: взаємодію з корегуляторами, димеризацію рецептора, регуляцію транскрипції та транслокацію в ядро. С-кінцевий F-домен із 42 амінокислотних залишків є структурним продовженням LBD, що модулює транскрипцію ліганд-залежним способом та впливає на димеризацію [8, 10].

Крім повнорозмірної форми, існують ізоформи ER α з нижчою молекулярною масою, що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу (рис. 1.2). Вони експресуються як за фізіологічних умов, так і при патологічних станах. Зазвичай вкорочені ізоформи експресуються одночасно з ER α -66, що ускладнює визначення їхніх специфічних функцій. У нормальних та пухлинних тканинах людини ідентифіковано ER α -66, ER α -46, ER α -36, ER α -LBD та інші альтернативно сплайсовані варіанти [11, 12].

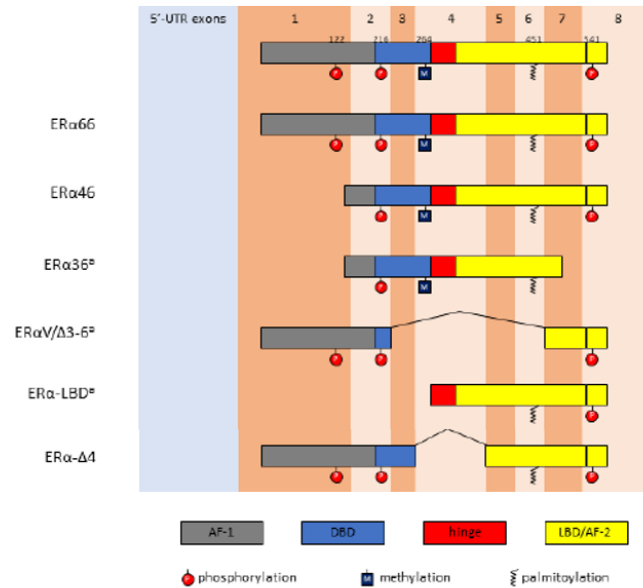


Рис. 1.2. Схематичне зображення доменної організації ізоформ ERα [13]

ERα-46 не містить 173 N-кінцевих амінокислотних залишків через відсутність першого кодуєчого екзону (1A), а отже – домену AF-1. Решта послідовності ідентична ERα-66. Трансляція ініціюється з кодону AUG у другому екзоні. Встановлено, що у цьому процесі беруть участь шість 5'-нетрансльованих регіонів. Сплайсинг мРНК ERα-46 починається з екзону 1E або F, які приєднуються до екзону 2E, а потім – до екзону 2 [14]. Деякі дослідники припускають, що ізоформа може утворюватись також шляхом протеолізу або альтернативної ініціації трансляції.

Ця ізоформа виявлена у нормальних тканинах – ендометрії, яєчниках, печінці, скелетних м'язах, легенях, нирках, наднирниках, а також у пухлинах молочної залози, зокрема в клітинах MCF-7 [15]. При спільній експресії з ERα-66 ізоформа ERα-46 суттєво інгібує транскрипційну активність домену AF-1 повнорозмірного рецептора. Водночас ERα-46 сама функціонує як транскрипційний фактор завдяки активності домену AF-2, хоча й менш ефективно. У клітинах MCF-7 співвідношення ERα-46/ERα-66 змінюється залежно від стадії росту та функціонального стану культури, що вказує на роль

цієї ізоформи у регуляції проліферації. ER α -46 локалізується як у ядрі, так і поза ним [13, 16].

ER α -36 ідентифіковано у карциномах молочної залози, ендометрію, шлунка, товстого кишечника та у відповідних нормальних тканинах. кДНК цієї ізоформи ідентична ексонам 2-6 гена ER α -66, а її 5'-нетрансльована область має 100 % гомологію з першим інтроном ER α -66. Невеликий некодуючий екзон у цьому інтроні позначають як екзон 1'. Він сплайсується з ексоном 2, послідовність екзонів 2-6 зберігається, після чого екзон 6 з'єднується з останнім ексоном гена. ER α -36 позбавлена доменів AF-1 та AF-2, але зберігає DBD і частину LBD зі здатністю до димеризації. На С-кінці міститься унікальна послідовність із 27 амінокислот замість 138 залишків, кодованих ексонами 7-8 повнорозмірної форми. Власної транскрипційної активності ізоформа не має, проте ефективно пригнічує активність ER α -66, функціонуючи як домінантний негативний регулятор геномної естрогенової сигналізації [17, 18].

ER α -LBD містить лише LBD (AF-2) домен. Ймовірно, транскрипція ініціюється перед ексоном 4 з подальшим сплайсингом екзонів 4-8. Молекулярна маса становить 37,3 кДа – подібно до ER α -36, однак специфічні антитіла до ER α -36 не розпізнають ER α -LBD через відмінності в амінокислотних послідовностях. Надекспресія цієї ізоформи асоціюється з ростом злоякісних пухлин молочної залози та резистентністю до антиестрогенової терапії. В нормальних тканинах молочної залози ER α -LBD не виявлено, тому її фізіологічна роль залишається невідомою [13, 19].

У клітинах раку молочної залози ідентифіковано й інші продукти альтернативного сплайсингу: ER $\alpha\Delta$ 3-6 (53 кДа), ER $\alpha\Delta$ 4 (52 кДа) тощо.

Між ізоформами існує складна система взаємної регуляції. ER α -66 пригнічує промотор ER α -36, але це пригнічення блокується ізоформами ER α -46 та ER α -36. ER α -46, своєю чергою, інгібує транскрипційну активність AF-1 домену ER α -66. Отже, співвідношення рівнів експресії трьох основних

ізоформ визначає баланс між геномним та негеномним шляхами естрогенової сигналізації у клітині [13, 20, 21].

1.2. Механізми геномної та негеномної сигналізації за участю ER α

Сигналізація, опосередкована естрогеновим рецептором альфа, реалізується через два різні механізми – геномний (класичний) та негеномний. Геномний потребує годин для реалізації і відбувається в ядрі, тоді як негеномний активується протягом секунд або хвилин у цитоплазмі та на плазматичній мембрані [5].

Геномний механізм передбачає пряму участь ER α у регуляції транскрипції генів-мішеней (рис. 1.3). За відсутності ліганду мономерна форма рецептора перебуває у неактивному стані в комплексі з білками теплового шоку Hsp90, які запобігають передчасній деградації рецептора та підтримують його у конформації, здатній до зв'язування ліганду. У присутності естрогену рецептор дисоціює від Hsp90, зв'язується з лігандом через ліганд-зв'язувальний домен, що індукує конформаційні зміни, димеризацію та транслокацію в ядро [3].

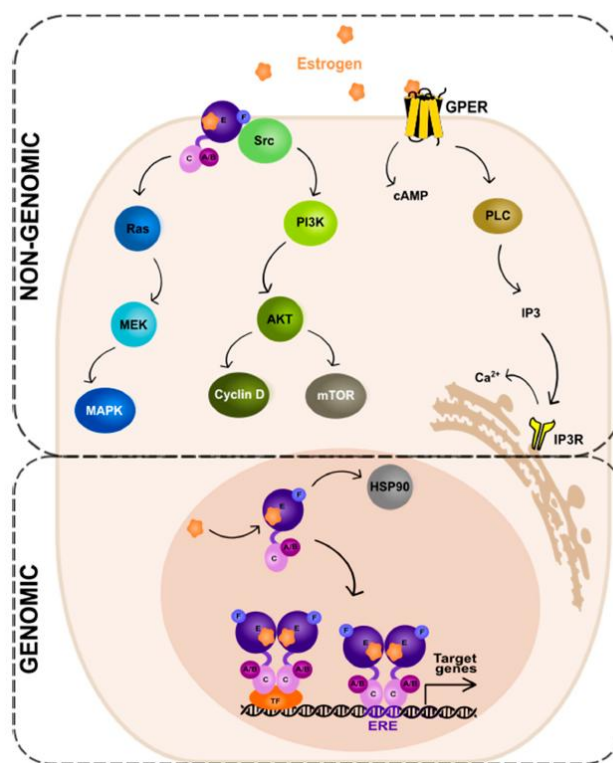


Рис. 1.3. Схема геномного та негеномного шляхів сигналізації ERα [22]

У ядрі димер ERα реалізує транскрипційну активність через два механізми. Прямий передбачає безпосереднє зв'язування з естроген-відповідними елементами (ERE) – паліндромними послідовностями 5'-GGTCAnnnTGACC-3' на промоторах генів-мішеней. Непрямий реалізується через білок-білкові взаємодії з іншими транскрипційними факторами (AP-1, Sp1, NF-κB), що мають власні елементи відповіді на промоторах.

Зв'язування рецептора з ERE поблизу або безпосередньо на промоторі цільового гена ініціює формування базального регуляторного транскрипційного комплексу. Цей процес супроводжується структурними модифікаціями гістонів, що зумовлюють формування комплексів між корегуляторами ядерних рецепторів та АТФ-залежними ферментами ремоделювання нуклеосом комплексу SWI/SNF [8].

Ферменти SWI/SNF індукують конформаційні зміни хроматину та взаємодіють із коактиваторами естрогенового рецептора. До останніх належать гістон-ацетилтрансферази (HATs: P300/CBP, P/CAF, SRC-1 та

p/CIP/AIB1), гістон-метилтрансферази (HMTs: CARM1 та PRMT1) та гістон-убіквітинлігази (RPF1 та E6-AP). Гістон-ацетилтрансферази каталізують ацетилювання лізинових залишків у гістонах, що послаблює взаємодію гістонів із ДНК та відкриває хроматин для транскрипційного апарату. Для забезпечення точної регуляції транскрипції ER α взаємодіє також із корепресорами – NCoR, NRIP1 та SMRT, які зв'язуються з рецептором у присутності антагоністів і забезпечують негативну регуляцію.

Після модифікацій гістонів розпочинається послідовне рекрутування компонентів загального транскрипційного апарату. Комплекс TFIIID/TBP приєднується до промотора та стабілізується за допомогою TFIIA. Потім TFIIIB зв'язується з РНК-полімеразою II та позиціонує її на сайт ініціації транскрипції. TFIIH сигналізує про початок транскрипції через комплекс TRAP/медіатор шляхом фосфорилювання С-кінцевого домену РНК-полімерази II. Комплекс SWI/SNF залишається асоційованим із промотором протягом активної транскрипції, підтримуючи необхідну конфігурацію хроматину, а також забезпечує повернення структури гістонів до вихідного положення після завершення процесу. Після збору транскрипційного комплексу убіквітин-протеасомна система регулює деградацію компонентів преініціаторного комплексу для забезпечення елонгації. Транскрипція припиняється при розпізнанні полімеразою стоп-кодону, при припиненні сигналу від ER α або при блокуванні протеасом, що порушує циклічну асоціацію корегуляторних білків з ER α і призводить до інактивації РНК-полімерази II [7, 22].

Негеномна сигналізація ініціюється зв'язуванням естрогену з G-білок-асоційованим естрогеновим рецептором (GPER/GPR30), не потребує синтезу нових білків і активує швидкі сигнальні каскади через вторинні месенджери – цАМФ та іони кальцію (Ca²⁺). Активуються два основні каскади: Ras-Raf-MEK-MAPK та PI3K-AKT-mTOR [17].

У MAPK-каскаді після зв'язування естрогену активується ГТФаза Ras, яка рекрутує протеїнкіназу Raf, що фосфорилює MEK з подальшою активацією

МАРК (ERK1/2). Активовані ERK1/2 транслокуються до ядра, де фосфорилують транскрипційні фактори c-Jun та c-Fos, які регулюють експресію генів росту, проліферації, міграції та канцерогенезу. Підвищений рівень активності МАРК виявлено у пухлинах яєчників, молочної залози, товстої кишки та легень [22, 23].

У шляху PI3K-AKT-mTOR GPER взаємодіє з тирозинкіназою Src, яка активує PI3K. Продукт активації PI3K – PIP3 – передає сигнал до PDK1, що фосфорилує AKT. Активована AKT сприяє клітинному росту, виживанню та проліферації, а також стимулює комплекс mTORC1 (кіназа mTOR та білок raptor). Природним інгібітором mTOR є рапаміцин – макролідний антибіотик із протипухлинними властивостями. Низхідним ефектором mTOR є рибосомальна S6 кіназа 1 (S6K1), що регулює розмір клітин, проліферацію та трансляцію. S6K1 має ізоформи p85, p70 та p60, а її надмірна експресія корелює з несприятливим прогнозом при раку молочної залози [3, 22 – 24].

Фосфорилування ER α модулює активність рецептора. Ідентифіковано понад десять сайтів, більшість яких локалізовані у домені AF-1. У відповідь на зв'язування естрадіолу переважно фосфорилується Ser118, меншою мірою – Ser104 та Ser106; їх спільне фосфорилування опосередковує ліганд-незалежну активацію через взаємодію з коактиваторами CBP та SRC-1. GSK-3 фосфорилує Ser102, Ser104, Ser106 та Ser118, причому фосфорилування Ser102 залежить від попереднього фосфорилування Ser104 [3, 25].

Ser118 – найкраще вивчений сайт – фосфорилується через шляхи CDK7 та МАРК. EGF може активувати ER α навіть за відсутності естрадіолу. Фосфорилування Ser118 підвищує зв'язування з SRC3 та гіперчутливість до естрадіолу; конститутивна активація МАРК забезпечує обхід ліганд-залежного механізму, роблячи пухлини гормон-незалежними, хоча цей сайт асоціюється зі сприятливим прогнозом при лікуванні тамоксифеном [20, 22].

Ser167 фосфорилується через AKT (безпосередньо), S6K1 (через mTORC1) та p90RSK (через МАРК/RSK). Рапаміцин знижує фосфорилування Ser167, але залишається рапаміцин-нечутлива фракція; комбінація рапаміцину

та інгібітора MEK (U0126) повністю блокує фосфорилювання. Підвищена активність АКТ посилює фосфорилювання Ser167, знижуючи чутливість до тамоксифену; АКТ-опосередковане фосфорилювання підвищує зв'язування рецептора з ДНК та з SRC3, посилюючи транскрипцію генів-мішеней [3, 25].

Tyr537 фосфорилюється тирозинкіназою Src, забезпечуючи мембранну локалізацію рецептора. Мутації цього залишку (Y537S, Y537N, D538G), виявлені у ~30 % пацієнтів із метастатичним ER-позитивним раком, спричиняють конститутивну активацію ER α та резистентність до антиестрогенів [3].

Між ER α та S6K1 існує тісний функціональний взаємозв'язок. S6K1 фосфорилює ER α за Ser167, підвищуючи транскрипційну активність рецептора, а естроген-активованій ER α регулює експресію гена RPS6KB1, що кодує S6K1, формуючи петлю позитивного зворотного зв'язку. S6K1 також фосфорилює рибосомальний білок S6 – компонент 40S субодиниці рибосоми, що бере участь у трансляції 5'-TOP mRNAs (транскрипти рибосомальних білків та факторів трансляції) [25 – 29].

Гіперактивація mTORC1/S6K1 пов'язана з ER-позитивним статусом пухлин. Інгібування mTORC1 еверолімусом знижує фосфорилювання Ser167 та відновлює чутливість до ендокринної терапії, що стало підставою для схвалення комбінованого застосування інгібіторів mTOR з ендокринними препаратами. Негеномна активація ER α шляхом фосфорилювання дозволяє рецептору функціонувати як транскрипційний фактор за відсутності ліганду – ці механізми лежать в основі розвитку резистентності до гормональної терапії.

1.3. ER α -залежна регуляція епітеліально-мезенхімального переходу

Ендокринна резистентність зазвичай корелює з підвищенням агресивності та рухливості ракових клітин, зміною їхньої морфології – ці процеси називають епітеліально-мезенхімальним переходом (EMT).

ЕМТ є еволюційно консервативним процесом, необхідним для ембріонального розвитку, загоєння ран та регенерації тканин. У контексті онкогенезу ЕМТ сприяє набуттю раковими клітинами інвазивних властивостей, підвищеної рухливості та здатності до метастазування. Під час ЕМТ епітеліальні клітини втрачають міжклітинну адгезію, апікально-базальну полярність та зв'язок із базальною мембраною, набуваючи мезенхімального фенотипу. Молекулярними ознаками цього процесу є втрата Е-кадгерину (CDH1) в адгезивних контактах, оклюдинів (OCLN) та клаудинів (CLDN) у щільних контактах, десмоплакіну (DSP) у десмосомах; зниження експресії епітеліальних цитокератинів (KRT8, KRT18, KRT19); підвищення експресії мезенхімальних білків – віментину (VIM) та α -гладком'язового актину (ACTA2). Морфологічно клітини набувають веретеноподібної форми, підвищується їхня рухливість та інвазивність, зростає резистентність до апоптозу [30, 31].

Е-кадгерин є кальцій-залежним трансмембранним білком, що забезпечує формування адгезивних контактів між епітеліальними клітинами. Його внутрішньоклітинний домен взаємодіє з катенінами (α -, β - та p120-катеніном), формуючи зв'язок із актиновим цитоскелетом. Втрата Е-кадгерину є достатньою для індукції ЕМТ. Репресія гена CDH1 здійснюється транскрипційними факторами ЕМТ – Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1, ZEB2 та Twist1/2, які зв'язуються з E-box елементами (CANNTG) у промоторі CDH1.

Snail1 та Snail2 належать до родини цинк-пальцевих транскрипційних факторів типу C2H2 і є потужними репресорами Е-кадгерину. Snail1 рекрутує гістон-деметилазу LSD1 та метилтрансферазу Suv39H1 до промотора CDH1, що забезпечує епігенетичне сайленсування гена через деметилювання H3K4 та триметилювання H3K9. ZEB1 та ZEB2 також безпосередньо репресують CDH1, при цьому ZEB1 додатково рекрутує ДНК-метилтрансферазу DNMT1 для підтримання метильованого статусу промотора.

Активність ER α тісно пов'язана з диференціюванням ракових клітин та підтриманням епітеліального фенотипу. У ER-позитивних пухлинах раку

молочної залози може спостерігатись гетерогенна експресія ER α : серед ER-позитивних клітин наявні ER-негативні стовбурові клітини, що відтворює нормальну ієрархію епітеліальної тканини здорової молочної залози. Наявність експресії ER α зазвичай корелює з епітеліальним типом раку та сприятливим прогнозом, тоді як відсутність експресії – з мезенхімальним типом та несприятливим прогнозом [31].

ER α сприяє підтриманню епітеліального фенотипу клітин раку молочної залози через декілька механізмів. ER α репресує транскрипційні фактори EMT та асоційовані мікроРНК, водночас промотуючи експресію E-кадгерину. Активованій естрогеном ER α пригнічує сигналізацію TGF β – одного з індукторів EMT – через зв'язування із білками Smad2 та Smad3 та сприяння їхній протеасомній деградації. Це перешкоджає дії каскаду TGF β і стимулює повернення до епітеліального фенотипу.

TGF β є одним із найпотужніших індукторів EMT. Він активує канонічний Smad-залежний шлях та неканонічні шляхи (MAPK, PI3K/AKT, Rho-подібні ГТФази), що призводять до активації транскрипційних факторів EMT. TGF β індуктує експресію Snail1, ZEB1/2 та Twist, які репресують CDH1 і активують мезенхімальні гени. Взаємодія ER α із Smad2/3 порушує цей каскад, запобігаючи індукції EMT.

ER α також активує експресію білка метастатичного пухлинного антигену 3 (MTA3), який є компонентом репресорного комплексу Mi-2/NuRD та супресором Snail1. MTA3 безпосередньо репресує транскрипцію гена SNAI1, перешкоджаючи ініціації програми EMT.

Водночас існує реципрокна регуляція між ER α та транскрипційними факторами EMT. Пригнічення ER α в ER-позитивних клітинах MCF-7 за допомогою shRNA призводить до посилення експресії RelB (субодиниці NF- κ B) і, відповідно, появи мезенхімального фенотипу – підвищення експресії віментину, репресії E-кадгерину та збільшення рухливості клітин. Зворотно, RelB, Snail1 та ZEB1 здатні репресувати експресію ER α , формуючи петлю негативного зворотного зв'язку.

ZEB1 на ранніх стадіях EMT, коли клітини ще зберігають переважно епітеліальний фенотип, модулює ER α -опосередковану транскрипцію, індуковану естрогеном або цАМФ-сигналіном. При короткочасній експресії ZEB1 (1-2 тижні) рівні ER α залишаються відносно високими, і ZEB1 може навіть посилювати транскрипцію ER α -залежних генів. Проте тривала експресія ZEB1 (8-12 тижнів) призводить до повного EMT із втратою експресії ER α . Ця динамічна взаємодія може визначати тканинний тропізм метастазів раку молочної залози [32].

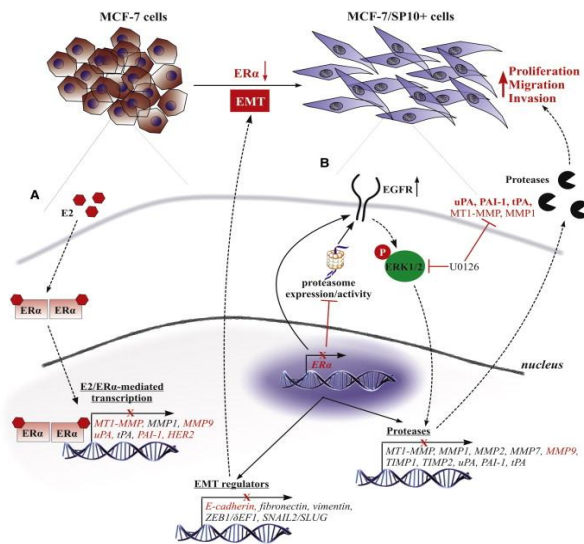


Рис. 1.4. Роль ER α у регуляції епітеліально-мезенхімального переходу [32]

Різні ізоформи ER α по-різному впливають на EMT. ER α -66 репресує транскрипційні фактори EMT та підтримує епітеліальний фенотип. Натомість ER α -36, що локалізується переважно на мембрані та в цитоплазмі, може сприяти переходу ER-позитивних клітин до мезенхімального стану через активацію ZEB1, Snail1, віментину та CXCR4 із одночасним зниженням експресії Е-кадгерину [17, 18, 31].

Гістологічна та молекулярна класифікація раку молочної залози виділяє декілька підтипів із різним статусом EMT. Люмінальний підтип зазвичай є ER-позитивним та експресує епітеліальні маркери – Е-кадгерин, цитокератини

KRT8/18/19. Базальноподібний та клаудин-низький підтипи характеризуються підвищеною експресією мезенхімальних генів, зниженою експресією E-кадгерину та несприятливим прогнозом. Метапластичні пухлини демонструють найвищу експресію транскрипційних факторів EMT – Snail, Slug, ZEB1, Twist1 та FOXC1.

Клітини, що пройшли EMT, набувають характеристик ракових стовбурових клітин, включаючи підвищену здатність до самооновлення, ініціації пухлин та резистентність до хіміотерапії. Це частково пояснює зв'язок між втратою ER α , EMT та розвитком резистентності до ендокринної терапії.

ER α виконує протективну роль щодо EMT, підтримуючи епітеліальний фенотип клітин раку молочної залози через репресію транскрипційних факторів EMT, інгібування TGF β -сигналізації та активацію супресорів EMT. Втрата експресії або функціональної активності ER α сприяє ініціації програми EMT, набуттю інвазивних властивостей та розвитку резистентності до терапії [30 – 32].

1.4. Терапевтичні стратегії таргетування естрогенового рецептора при раку молочної залози

Близько 70-80 % випадків раку молочної залози припадає на ER-позитивний підтип, для розвитку та лікування якого ER α має вирішальне значення. Активуючи низхідні сигнальні шляхи, ER α впливає на програму EMT та ремоделювання позаклітинного матриксу. Отже, націлювання протиракової терапії саме на ER α є основним принципом у лікуванні ER-позитивного раку молочної залози. Ендокринна терапія спрямована або на блокування ER α та його дії як стимулятора росту, проліферації та виживання ракових клітин, або на зниження рівня естрогену в організмі. Основні класи препаратів: селективні модулятори естрогенових рецепторів (SERMs), що

конкурують з естрогеном за зв'язування з ER α ; селективні деградатори естрогенових рецепторів (SERDs), що зв'язуються з ER α та індукують його деградацію; інгібітори ароматази (AIs), що блокують синтез естрогену [33].

SERMs є найстаршим класом ендокринної терапії. Залежно від тканини-мішені вони проявляють властивості естрогенових агоністів або антагоністів. У молочній залозі SERMs діють як антагоністи, блокуючи проліферативний сигнал естрогену, тоді як у кістковій тканині проявляють агоністичну активність із захисним ефектом щодо остеопорузу.

До SERMs належать тамоксифен, ралоксифен та тореміфен. Тамоксифен – найпоширеніший гормональний препарат – призначається жінкам як у пре-, так і в постменопаузі. Його протипухлинна дія зумовлена конкурентним інгібуванням зв'язування естрадіолу з ER α , що пригнічує ER α -залежну експресію генів канцерогенезу та виділення ангіогенних факторів. Результатом є блокування G1-фази клітинного циклу та регресія пухлини. Терапія тамоксифеном у постменопаузі асоціюється з ризиком тромбоемболічних ускладнень та раку ендометрія, тому альтернативою є ралоксифен. Тореміфен схвалений для жінок у постменопаузі з метастатичним раком.

Однак у значної частини пацієнтів розвивається резистентність до тамоксифену, що пов'язано із задіяванням альтернативних ізоформ ER α в сигналінгу, перебудовою сигнальних шляхів із активацією ліганд-незалежних механізмів, змінами у біогенезі корегуляторів, повною втратою експресії ER α . Більшість резистентних пухлин продовжують експресувати ER α і при підборі альтернативної терапії регресують [34, 35].

Інгібітори ароматази (AIs) блокують синтез естрогенів з андрогенів за участі ароматази і є найефективнішими для жінок у постменопаузі. Стероїдний інгібітор екземестан незворотно інактивує фермент, тоді як нестероїдні (анастрозол, летрозол) конкурентно блокують його активність. Дослідження продемонстрували перевагу інгібіторів ароматази над тамоксифеном у постменопаузальних жінок [36].

Незважаючи на ефективність SERMs та інгібіторів ароматази, наявність ER α дозволяє раковим клітинам обходити терапію через ліганд-незалежну активацію рецептора шляхами MAPK та PI3K-AKT-mTOR. Мутації гена ESR1 (Y537S, Y537N, D538G) у ліганд-зв'язувальному домені призводять до конститутивної активації рецептора незалежно від ліганду і найчастіше виникають під селективним тиском інгібіторів ароматази [9, 11, 22].

Для подолання таких проблем були розроблені SERDs, які не лише блокують ER α , а й індукують його протеасомну деградацію. Першим схваленим SERD є фулвестрант. Цей препарат вводиться внутрішньом'язово, що обмежує біодоступність. Його використовують переважно у постменопаузі, а в пременопаузі – з агоністами гонадотропін-рилізінг гормону [37]. Розробка пероральних SERDs стала важливим напрямком онкології. У 2023 році було схвалено елацестрант – перший пероральний SERD для лікування метастатичного раку з мутаціями ESR1 після прогресування на інгібіторах CDK4/6. Елацестрант продемонстрував кращу виживаність без прогресування, особливо у пацієнтів з ESR1-мутантними пухлинами [38].

Новим напрямком є PROTACs (proteolysis targeting chimeras) – бівалентні молекули, що зв'язують цільовий білок з E3-убіквітинлігазою, індукуючи убіквітинування та деградацію ER α . Вепдегестрант (ARV-471) проходить клінічні дослідження III фази у комбінації з інгібіторами CDK4/6 [39].

Комбінована терапія суттєво розширила можливості лікування. Інгібітори CDK4/6 (палбоцикліб, рибоцикліб, абемацикліб) у комбінації з ендокринною терапією значно покращують виживаність при метастатичному раку. Для пацієнтів із мутаціями PIK3CA застосовують комбінацію фулвестранту з альпелізибом, а інгібітори mTOR (еверолімус) використовуються для подолання резистентності через шлях PI3K-AKT-mTOR [40].

Отже, терапевтичні стратегії таргетування ER α еволюціонують від класичних SERMs до пероральних SERDs та PROTACs. Розуміння механізмів

резистентності дозволяє розробляти персоналізовані підходи, а комбінована терапія відкриває нові перспективи для покращення результатів лікування.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

У роботі було використано хімічні реактиви компаній «ThermoFisher Scientific» (США), «Sigma-Aldrich» (Німеччина), «Bio-Rad» (США), «Fluka» (Швейцарія), «Invitrogen» (США). Для фільтрування розчинів було використано продукцію «Millipore» (США). Набори для виділення та очищення РНК, синтезу кДНК, кількісного ПЛР-аналізу були придбані у «ThermoFisher Scientific». Для лізуючих буферів використовувались фосфатазні та протеазні інгібітори від «ThermoFisher Scientific», «Roche» (Швейцарія) та «Abcam» (Велика Британія). Для вестерн-блот аналізу експресії білків у клітинах використовували такі антитіла: анти-ER α специфічні до С-кінцевих регіонів («Cell Signaling Technology», США); анти-ER α специфічні до N-кінцевих регіонів («Cell Signaling Technology»); анти- α -тубулін («Abcam»); анти- β -актин («Sigma-Aldrich»); анти-віментин («Invitrogen»); анти-PARP 1 («ThermoFisher Scientific»); анти-фосфо-Thr389-S6K1 («Cell Signaling Technology»); анти-фосфо-Ser235/236-S6 («Cell Signaling Technology»); анти-фосфо-Ser2448-mTOR («ThermoFisher Scientific»); анти-S6K1, специфічні до С-кінцевих регіонів («Cell Signaling Technology»); анти-фосфо-S167-ER α («Cell Signaling Technology»); анти-фосфо-S118-ER α («Cell Signaling Technology»), анти-CEA, анти-EpCAM. Робочі розведення антитіл були зроблені згідно з рекомендаціями виробників.

Для роботи було застосовано наступні буферні розчини та системи: фосфатний буфер PBS (NaCl 140 мМ, KCl 2,6 мМ, Na₂HPO₄ 10 мМ, KH₂PO₄ 1,8 мМ, рН 7.4); буфер PBS-T (NaCl 140 мМ, KCl 2,6 мМ, Na₂HPO₄ 10 мМ, KH₂PO₄ 1,8 мМ, Tween-20 0,1 %, рН 7.4); трис-гліциновий буфер для ПААГ (трис 25 мМ, гліцин 250 мМ, ДСН 0,1 %); буфер для електропереносу білків

(трис 48 мМ, гліцин 39 мМ, метанол 20 %); 5х буфер Лемлі (трис 200 мМ, ДСН 5 %, гліцерол 50 %, бромфеноловий синій 0,1 %, дитіотреїтол 250 мМ); буфер Пірса для лізису клітин (Трис-НСІ рН 7.4 25 мМ, NaCl 150мМ, ЕДТА 1 мМ, гліцерол 5 %, NP-40 1 %),.

Для культивування клітин ссавців було використано середовища, глутамін, трипсин, піруват та антибіотики від «ThermoFisher Scientific», «MP Biomedicals» (США), «HyClone» (США) та «Lonza» (Швейцарія). Для забезпечення стерильних умов роботи використовували ламінарний бокс II класу захисту «ESCO» (Сінгапур). Культивування проводилось у CO₂-інкубаторі «New Brunswick» (Канада). Для морфологічних досліджень культури клітин використовували інвертований мікроскоп CETI Versus (CETI, Бельгія).

2.2. Культивування клітин ссавців

У якості модельної системи для дослідження використовували клітинну лінію карциноми молочної залози людини MCF-7, яка характеризується експресією естрогенового рецептора альфа та є класичною моделлю для вивчення ER-позитивного раку молочної залози.

Культивування клітин проводили у CO₂-інкубаторі при температурі 37 °С, 5 % CO₂ та вологій атмосфері. Клітини вирощували у середовищі DMEM (глюкоза 4,5 г/л) з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS), 1 мМ L-глутаміну, 1 мМ пірувату натрію, 100 од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Культивування здійснювали на чашках Петрі різних діаметрів та планшетах.

При досягненні 90-100 % конфлюентності клітини пасажували, або заморожували при температурі -20 °С для подальшого лізису. Перед пасажуванням культуральне середовище відбирали, клітини двічі промивали

PBS (37 °C) та інкубували у розчині 0,25 % трипсину і 0,02 % ЕДТА протягом 5 хв для відкріплення від поверхні культурального посуду.

Для кріоконсервації використовували культуральне середовище з додаванням 7 % диметилсульфоксиду (ДМСО) як кріопротектора. Заморожування клітинного матеріалу проводили при поступовому зниженні температури до -180 °C з подальшим зберіганням у рідкому азоті.

Культигування клітин та кріоконсервацію проводили згідно з протоколами «ThermoFisher Scientific» з власними модифікаціями [41, 42].

2.3. Отримання CRISPR/Cas9-модифікованих стабільних клітинних ліній

Для отримання клітинних ліній MCF-7 з модифікованою експресією ізоформ ER α використовували систему редагування геному CRISPR/Cas9. Вектори pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, що містили гідові послідовності РНК (gRNA1, gRNA2), комплементарні до першого екзону гена естрогенового рецептора альфа (ESR1), були створені за допомогою онлайн-ресурсу <http://crispr.mit.edu/>. Послідовності гідових РНК наведено у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Послідовності гідових РНК для CRISPR/Cas9-опосередкованого редагування гена ESR1

Назва	Верхній ланцюг (5'→3')	Нижній ланцюг(5'→3')
gRNA1	CACCGCGCGGCGTTGAACTCGTAGG	AAACCCTACGAGTTCAACGCCGCGC
gRNA2	CACCGGCCGTGTACAAC TACCCCGA	AAACTCGGGGTAGTTGTACACGGCC

Трансфекцію клітин MCF-7 проводили з використанням реагенту TurboFect згідно з рекомендаціями виробника [43]. Паралельно здійснювали

трансфекцію векторами з gRNA1, gRNA2 та комбінацією обох гідових РНК для оптимізації ефективності модифікації.

Через 24 год після трансфекції клітини переносили на 10 см-чашки Петрі та проводили селекцію антибіотиком пуроміцином у концентрації 4 мкг/мл протягом 24 год. Через 2-3 тижні після селекції формувались окремі клони, які відбирали, нарощували та аналізували методами вестерн-блотингу та кількісної ПЛР для підтвердження модифікації гена ESR1.

2.4. Приготування клітинних лізатів

Клітини нарощували до 80-90% конфлуентності, культуральне середовище відбирали, промивали холодним PBS (4 °C) для зупинки усіх метаболічних процесів та заморожували при температурі -20 °C. Згодом клітинний матеріал лізували з використанням лізуючого буфера Пірса (Трис-HCl pH 7.4 25 mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM, гліцерол 5 %, NP-40 1 %, протеазні та фосфатазні інгібітори), після чого центрифугували 10 хв при 10000 g та 4 °C. Супернатант відбирали та використовували в подальших дослідженнях [44]. Концентрацію тотального білка в лізатах визначали методом Бредфорда.

2.5. Визначення концентрації білка методом Бредфорда

Концентрацію білка у клітинних лізатах визначали колориметричним методом Бредфорда, що базується на зв'язуванні барвника Кумасі G-250 з білками у кислому середовищі. При взаємодії з білками максимум поглинання барвника зміщується з 465 нм до 595 нм, що дозволяє кількісно визначити вміст білка у зразку. Клітинні лізати розводили дистильованою водою у 20 разів. До розведень лізатів додавали реактив Бредфорда («Bio-Rad») у

співвідношенні 1:10. Поглинання світла при 595 нм вимірювали за допомогою планшетного спектрофотометра проти розведеного у 20 разів лізуючого буфера. Отримані значення порівнювали з калібрувальною кривою стандартних концентрацій БСА [45].

2.6. Диск-електрофорез білків у системі Лемлі

Аналіз клітинних білків проводили методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у денатуруючих умовах із додаванням ДСН у системі Лемлі за стандартним протоколом з власними модифікаціями. Для розділяючого гелю було обрано оптимальну концентрацію акриламіду 10%, що забезпечувала ефективне розділення білків з молекулярними масами досліджуваних білків.

Зразки клітинних лізатів із визначеною концентрацією білка змішували з 5× буфером Лемлі (трис 200 мМ, ДСН 5 %, гліцерол 50 %, бромфеноловий синій 0,1 %, дитіотреїтол 250 мМ) у співвідношенні 4:1 та денатурували при 95 °С протягом 5 хв. На кожен доріжок наносили рівну кількість білка – 26 мкг або 15 мкг залежно від очікуваної сили сигналу.

Як білковий маркер використовували «PageRuler Prestained Protein Ladder» («ThermoFisher Scientific»), що містив маркерні білки з молекулярними масами 180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 та 10 кДа. Електрофорез проводили при сталій електричній напрузі 100 В за кімнатної температури. Після досягнення кольоровим фронтом кінця розділяючого гелю процес припиняли [46].

2.7. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення білки переносили з гелю на полівініліденфторидну мембрану (PVDF) методом вологого електропереносу. Перед перенесенням мембрану переводили з гідрофобної фази у гідрофільну: спочатку змочували у метанолі, потім витримували 3-5 хв у буфері для переносу з вмістом 20 % метанолу.

Збірку для перенесення формували наступним чином: на змочений буфером фільтрувальний папір розміщували мембрану, поверх неї – гель, який накривали другим шматком фільтрувального паперу. Сформований «сендвіч» прокатували пластиковою качалкою для видалення повітря між шарами та фіксували у касеті. Електроперенесення здійснювали протягом 1 год при 220 В/250 мА.

Після завершення переносу PVDF-мембрану блокували у 5 % розчині БСА у буфері PBS-T протягом 1 год для запобігання неспецифічному зв'язуванню антитіл. Потім мембрану інкубували з розчином специфічних первинних антитіл при 4 °С протягом ночі. Антитіла розводили у PBS-T відповідно до рекомендацій виробника. Після інкубації з первинними антитілами мембрану відмивали у PBS-T тричі по 5 хв, після чого інкубували з видоспецифічними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Надлишок вторинних антитіл видаляли відмиванням у PBS-T 4 рази по 7 хв.

Детекцію специфічного зв'язування вторинних антитіл проводили методом підвищеної хемолюмінесценції (ECL). Мембрану інкубували протягом 1 хв у розчині, що містив 100 мМ Трис-HCl (pH 8.5), 0,22 % кумарової кислоти, 0,5 % люмінолу та 0,05 % пероксиду водню. Після цього мембрану загортали у прозору поліетиленову плівку та експонували з рентгенівською плівкою «Agfa» [44, 47].

2.8. Кількісна ПЛР у реальному часі

Виділення тотальної РНК, синтез кДНК та гель-електрофорез в агарозному гелі було здійснено як описано в [48]. Для проведення кількісної ПЛР у реальному часі використовували набір «Maxima SYBR Green fluorescein qPCR mix kit» («Thermo Fisher Scientific») та ампліфікатор «Thermal Cycler CFX96 Real-Time System» («Bio-Rad») [49].

Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл містила: 1 мкл кДНК, 10 мкл 2X Master Mix, по 0,12 мкл прямого та зворотного праймерів (50 мкМ) та 8,76 мкл безнуклеазної H₂O. Умови реакції задавали згідно з рекомендаціями виробника: початкова денатурація – 10 хв при 95 °С; 40 циклів ампліфікації, що включали денатурацію – 15 с, 95 °С, відпал праймерів – 30 с, 60 °С, та елонгацію – 30 с, 72 °С.

Для кожної реакції виконували три технічні повтори. Рівні експресії цільових генів нормалізували до референсного гена ТВР (ТАТА-зв'язувальний білок). Відносну експресію генів розраховували за методом $\Delta\Delta C_t$. Послідовності праймерів для кількісної ПЛР наведено у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Послідовності праймерів для кількісної ПЛР у реальному часі

Ген	Прямий праймер (5'→3')	Зворотний праймер (5'→3')
TBP	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
CDH1	GTCGAGGGAAAAATAGGCTG	GAAATTGCAGGAGGAGATGC
CDH2	GTGCATGAAGGACAGCCTCT	AGGTGGACCTGATCATGGAG
ESR1	GCCGAGAGCTACACGTTTAC	GCAAAGATTCCACTTTGCGT
VIM	AGCTTCTCACGGCATAACACC	AAGCTTCGATGATGGGCTTA
p70/p85/p60-S6K1	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	CACATCACAGCTCCCCACCA
p60-S6K1	GTCGAGGGAAAAATAGGCTG	GCCGAGAGCTACACGTTTAC

2.9. Аналіз виживаності клітин з використанням МТТ-тесту

Клітини були посіяні на 96-лунковий планшет у концентрації 15000 клітин на лунку у 100 мкл нормального культурального середовища у 6 технічних повторах. Через добу нормальне середовище замінювали на експериментальне. Клітини культивували в експериментальному середовищі певний час, залежно від умов експерименту. По завершенню обраного часу культивування до кожної лунки додавали МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ("Sigma-Aldrich", США) у концентрації 5 мг/мл, інкубували 3 год при 37 °С. Після інкубації з МТТ, середовище видаляли з лунок. Внаслідок метаболічного перетворення МТТ в мітохондріях клітин утворювались кристали формазану, які розчиняли за допомогою ДМСО. Поглинання світла розчиненого формазану вимірювали при довжині хвилі 570 нм. Значення оптичної густини приймали як пропорційне відсотку виживаності клітин після обробки [50].

2.10. Визначення проліферативної активності клітин ресазуриновим методом

Для оцінки проліферативної активності клітин використовували ресазуриновий метод. Принцип методу базується на здатності метаболічно активних клітин відновлювати нефлуоресцентний синій барвник ресазурин до флуоресцентного рожевого резорufіну. Ця реакція відбувається за участю мітохондріальних дегідрогеназ та NADPH-залежних ферментів живих клітин. Інтенсивність флуоресценції резорufіну прямо пропорційна кількості життєздатних клітин у зразку.

Клітини субліній MCF-7 трипсинізували, підраховували та висівали на 96-лунковий планшет у кількості 5000 клітин на лунку (200 мкл DMEM з 10%

FBS). Через 24 год після посіву (перша точка експерименту) та у подальших часових точках (48, 72, 96 год) до лунок вносили розчин ресазурину (10%) та інкубували протягом 2 год. Для корекції фонового сигналу використовували лунки, що містили лише культуральне середовище. Реєстрацію флуоресценції резоруфіну проводили на флуориметрі ($\lambda_{ex} = 520$ нм, $\lambda_{em} = 590$ нм). Експеримент виконували у шести технічних повторах для кожної сублінії. Показники флуоресценції після віднімання фонових значень підлягали логарифмічній трансформації. На основі лінійної регресії логарифмованих середніх значень у часі розраховували швидкість проліферації (як нахил регресійної кривої) та її стандартну похибку для подальшого порівняння між сублініями [51].

2.11. Визначення міграційної активності клітин методом раневої поверхні

Здатність клітин до міграції досліджували із застосуванням методу раневої поверхні (scratch assay). Сутність методу полягає у створенні штучного дефекту в моношарі клітин з подальшим моніторингом швидкості його заповнення мігруючими клітинами.

Клітини розсаджували у 24-лунковий планшет у концентрації 3×10^5 клітин/лунку у середовищі DMEM з 10 % FBS та культивували до формування суцільного моношару. Перед початком експерименту вміст сироватки знижували до 1 % на 24 год для мінімізації впливу проліферації на результати. «Рану» у моношарі створювали механічно за допомогою стерильного наконечника на 200 мкл, після чого лунки промивали PBS та вносили свіже середовище з 1 % FBS.

Динаміку загоєння рани фіксували за допомогою мікроскопа Leica DM 1000 та цифрової фотокамери на початку експерименту та через 24 і 48 год. Для кожної сублінії було виконано по 6 технічних повторів. За отриманими

зображеннями визначали площу раневої поверхні та обчислювали її радіус для кожної часової точки. Відстань міграції розраховували як зменшення радіуса рани відносно початкового значення, а швидкість міграції – як відношення пройденої відстані до тривалості інкубації [51].

2.12. Статистичний аналіз даних

Статистичний аналіз експериментальних даних виконували в програмах Excel (MS Office 2024) та Python 3.12.9. Результати аналізу були подані у вигляді середнього арифметичного $\pm$ стандартна помилка середнього. Різницю між незалежними вибірками даних з нормальним розподілом оцінювали за допомогою t -критерію Стьюдента, і вважали статистично значущою при $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$. Для достовірності, усі дані, які підлягали статистичному аналізу, були отримані в результаті мінімум трьох незалежних експериментів.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Характеристика CRISPR/Cas9-модифікованих субліній MCF-7 за рівнем експресії ER α та S6K1

Для отримання стабільних клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ізоформ ER α використовували систему редагування геному CRISPR/Cas9. Було сконструйовано дві гідові РНК (gRNA1 та gRNA2), комплементарні до першого екзону гена ESR1, які було вбудовано у вектор pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 для подальшої трансфекції у клітини MCF-7.

Ефективність модифікації залежала від використаної гідової РНК. Дві клітинні сублінії з різною експресією ізоформ ER α було отримано за участі gRNA1. Клітини, трансфіковані вектором із gRNA2, за рівнем експресії ER α не відрізнялись від клітин дикого типу MCF-7, тому були відбраковані. Серед клітин, трансфікованих комбінацією векторів з обома гідовими РНК, для подальших досліджень обрано одну сублінію зі зміненим співвідношенням експресії ER α -66 та ER α -46.

Рівень експресії ізоформ ER α в отриманих клітинних сублініях аналізували методом вестерн-блотингу з використанням антитіл, специфічних до С-кінцевих та N-кінцевих регіонів рецептора (рис. 3.1).

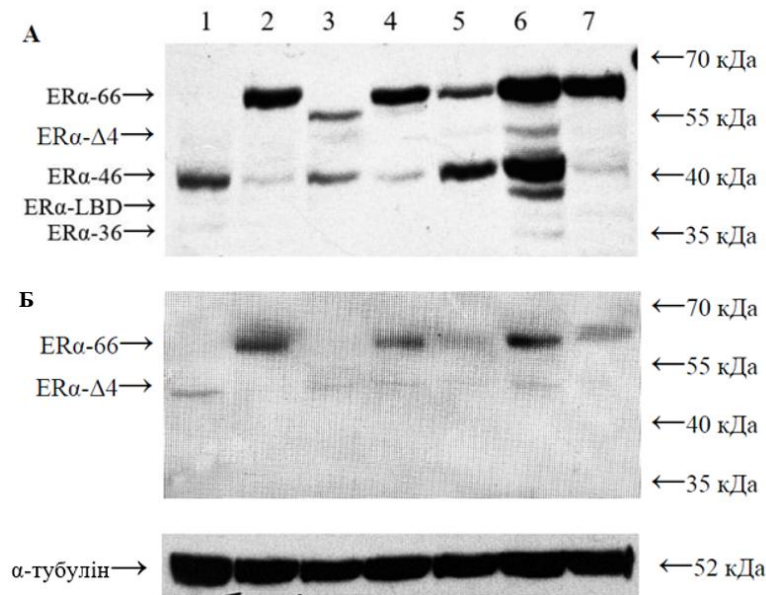


Рис. 3.1. Блотограми результатів аналізу клітинних субліній MCF-7 з CRISPR/Cas9-модифікованою експресією ізоформ ERα: 1 – MCF-7/9; 2 – MCF-7/16; 3 – MCF-7/24; 4 – MCF-7/7; 5 – MCF-7/12; 6 – MCF-7/23; 7 – MCF-7 wt (контроль). А – з використанням антитіл, специфічних до С-кінцевих регіонів ERα; Б – з використанням антитіл, специфічних до N-кінцевих регіонів ERα; нормалізовано щодо α-тубуліну

Слід зазначити, що CRISPR/Cas9-опосередковане редагування геному також призводило до появи субліній з химерними ізоформами ERα. Це пояснюється механізмом репарації дволанцюгових розривів ДНК шляхом негомологічного з'єднання кінців, що може спричиняти делеції та інсерції із зсувом рамки зчитування. Для подальших досліджень обрано сублінії MCF-7/9 та MCF-7/12, в яких послідовності наявних ізоформ ERα відповідали ізоформам дикого типу. Зміну рівня експресії ERα в сублініях MCF-7/9 та MCF-7/12 підтверджено результатами кількісної ПЛР у реальному часі за геном ESR1 (рис. 3.2).

Характерною особливістю отриманих субліній була співзалежність експресії ізоформ ERα: при частковому зниженні або повному блокуванні ERα-66 експресія ERα-46 значно зростала, тоді як рівень ERα-36 залишався незмінним або дещо підвищувався. Це узгоджується з літературними даними

про здатність ER α -46 функціонально замінювати ER α -66, хоча і з меншою ефективністю [20].

Сублінія MCF-7/9 характеризувалась повним блокуванням ER α -66 та надекспресією ER α -46, при цьому клітини демонстрували уповільнену проліферацію та знижену метаболічну активність порівняно з клітинами дикого типу. У сублінії MCF-7/12 спостерігалось часткове пригнічення ER α -66 зі збереженням його експресії, ймовірно внаслідок модифікації лише одного алеля гена ESR1, та надекспресія ER α -46

Оскільки ER α як транскрипційний фактор регулює експресію гена RPS6KB1, що кодує S6K1, зміна експресії рецептора може безпосередньо впливати на експресії цієї кінази на рівні мРНК та білка. Для перевірки цієї гіпотези було проаналізовано експресію ізоформ S6K1 в отриманих клітинних сублініях методом кількісної ПЛР у реальному часі (рис. 3.2).

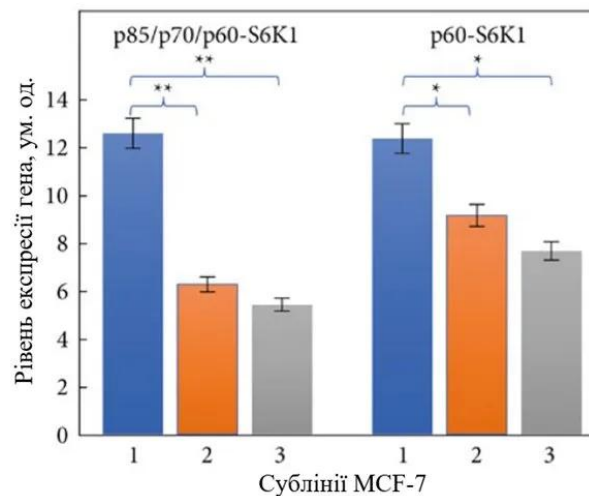


Рис. 3.2. Рівень експресії ізоформ S6K1 (p70/p85/p60 та p60) в клітинах MCF-7 та сублініях з модифікованою експресією ER α . 1 – MCF-7 wt; 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/12

$M \pm m$ (n=3); * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ порівняно з контролем (MCF-7 wt)

За результатами кількісної ПЛР спостерігається значне зниження експресії двох головних сплайсових варіантів мРНК S6K1, що відповідають за

біогенез одночасно трьох ізоформ кінази (p60, p70, p85), або виключно p60. Зниження експресії мРНК корелює і зі зниженням рівня експресії білка S6K1 в отриманих сублініях, що продемонстровано далі на рис. 3.6.

3.2. Оцінка статусу епітеліально-мезенхімального переходу у сублініях зі зміненою експресією ER α

Як було зазначено в огляді літератури, ER α відіграє ключову роль у підтриманні епітеліального фенотипу клітин раку молочної залози. Втрата або зниження експресії ER α асоціюється з ініціацією EMT, набуттям мезенхімальних характеристик та підвищенням інвазивного потенціалу пухлинних клітин. Незалежне дослідження Bourgis та ін. показали, що пригнічення біогенезу ER α на рівні мРНК з використанням shRNA супроводжується зниженням експресії E-кадгерину (*CDH1*), підвищенням експресії N-кадгерину (*CDH2*), віментину та інших маркерів, що, відповідно, призводить до ініціації EMT. У даному дослідженні у якості модельної клітинної лінії також було обрано MCF-7, але аналізувалась експресія лише повнорозмірної форми ER α без урахування інших ізоформ, що також експресуються в клітинах MCF-7 та можуть впливати на EMT.

Для підтвердження або спростування взаємозв'язку між ER α -66 та EMT, сублінії з CRISPR/Cas9-опосередкованим блокуванням ER α MCF-7/9 та MCF-7/12 були проаналізовані методом кількісної ПЛР в реальному часі за основними маркерами EMT: ESR 1, віментином, *CDH1* та *CDH2*. Результати представлені на рисунку 3.3.

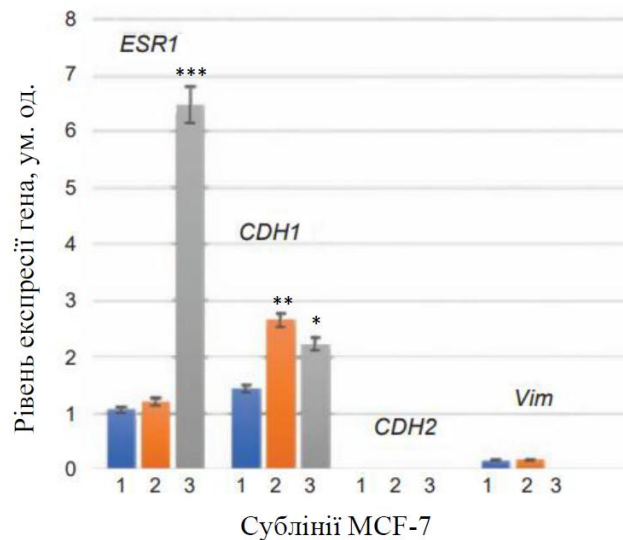


Рис. 3.3. Рівень експресії гена *ESR1* та EMT-пов'язаних генів *CDH1*, *CDH2*, *VIM* за CRISPR/Cas9-опосередкованої зміни біогенезу ізоформ ER α в клітинах MCF-7: 1 – MCF-7; 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/12;

$M \pm m$ (n=3); * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ порівняно з контролем (MCF-7 wt)

За результатами кількісної ПЛР, бачимо, що експресія мезенхімального маркера – N-кадгерину (*CDH2*), залишилась незмінною. Експресія епітеліального маркера – E-кадгерину (*CDH1*), в сублініях навіть зросла. Також спостерігаємо значне підвищення експресії гена *ESR1* в сублінії MCF-7/12, порівняно з диким типом MCF-7, що пояснюється сильною надекспресією ER α -46, незважаючи на пригнічення ER α -66. В MCF-7/9 значних змін за *ESR1* не відбулось. Щодо віментину, наявна залишкова кількість в контролі та сублініях. З цих даних можна зробити попередній висновок, що EMT в досліджуваних сублініях не відбувся.

Для підтвердження епітеліального фенотипу MCF-7/9 та MCF-7/12 додатково було проведено вестерн-блот аналіз цих субліній за віментином та цитокератином 18, EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule, CD326) – білком клітинної адгезії, що бере участь в міжклітинних взаємодіях в епітеліальних тканинах; CEA (Carcinoembryonic Antigen) – клітинний маркер,

підвищення якого асоціюється з поганим прогнозом, метастазуванням та корелює з ЕМТ. Результати вестерн-блот аналізу наведені на рис. 3.4 та рис. 3.5.

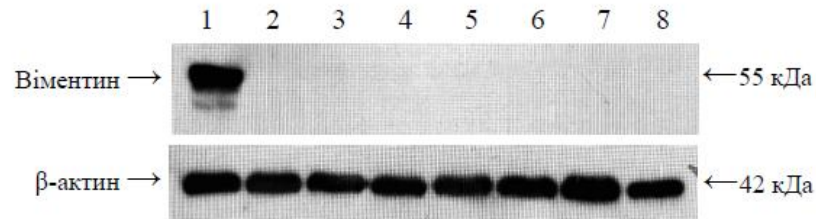


Рис. 3.4. Блотограми результатів аналізу клітинних субліній MCF-7 за CRISPR/Cas9-опосередкованої зміни біогенезу ізоформ ER α щодо віментину: 1 – MDA-MB-231 (позитивний контроль); 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/16; 4 – MCF-7/24; 5 – MCF-7/7; 6 – MCF-7/12; 7 – MCF-7/23; 8 – MCF-7 wt (негативний контроль); нормалізовано щодо β -актину

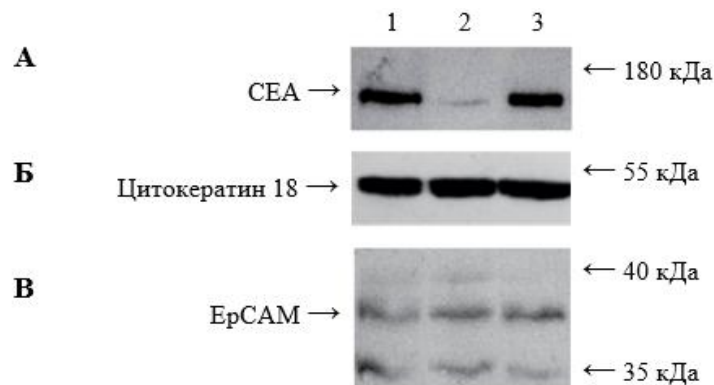


Рис. 3.5. Блотограми результатів аналізу клітинних субліній MCF-7 за CRISPR/Cas9-опосередкованої зміни біогенезу ізоформ ER α : 1 – MCF-7 wt (контроль); 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/12. А – з використанням антитіл, специфічних до СЕА; Б – з використанням антитіл, специфічних до цитокератину 18; В – з використанням антитіл, специфічних до ЕрСАМ. Нормалізовано за цитокератином 18

За рис. 3.4 віментин був присутній лише в позитивному контролі – клітинах MDA-MB-231, що відомі своїм EMT-статусом. В досліджуваних сублініях віментин відсутній, що свідчить про їх епітеліальний фенотип. Це додатково підтверджується відсутністю зміни в експресії цитокератину 18 в сублініях MCF-7/9 та MCF-7/12, порівняно з диким типом MCF-7. Експресія ЕрСММ помірно знизилась в обох сублініях. В сублінії MCF-7/9 при повному нокауті MCF-7/12 значно знизився рівень експресії маркера СЕА порівняно з контролем, що свідчить про зниження метастатичного потенціалу. В сублінії MCF-7/12 при частковому блокуванні ER α -66 рівень СЕА не змінився (рис. 3.5).

Проаналізувавши результати досліджень субліній MCF-7/9 та MCF-7/12 за маркерами EMT, можна стверджувати, що CRISPR/Cas9-опосередковане блокування першого екзону гена ESR1, націлене на головну ізоформу ER α -66, не призвело до EMT. Отже, ER α -66 не бере участі в ініціації EMT, що є головною суперечністю з дослідженнями Bouris та ін., які показали, що саме нокаун ER α з використанням РНК-інтерференції в клітинах MCF-7 призводить до ініціації EMT, не проаналізувавши інші наявні ізоформи, що можуть функціонально дублювати ER α -66. Такі розбіжності в результатах можна пояснити тим, що для пригнічення таргетного білка використовувались різні інструменти. Гідові РНК CRISPR/Cas9 були націлені на 1 екзон ER α -66, тому ER α -46, ER α -36 та інші ізоформи виявились нечутливими до редагування, а Bouris та ін. не демонстрували їх взагалі. Ймовірно, саме одна з ізоформ ER α , на яку не вплинуло редагування геному, відіграє ключову роль в індукції EMT. Однак, ця гіпотеза потребує подальшого вивчення шляхом «вимикання» інших ізоформ.

3.3. Динаміка ER α -залежного сигналінгу за умов метаболічного стресу: аналіз фосфорилування компонентів шляху mTOR/S6K1

Клітини раку активно проліферують, тому дуже швидко виснажують запаси поживних речовин в мікрооточенні. Виникає дефіцит глюкози та необхідних амінокислот, що створює несприятливі умови, до яких ракові клітини мусять адаптуватися для виживання. Здатність до адаптації в таких умовах тісно пов'язана з метаболізмом та злоякісним прогресуванням раку молочної залози.

Голодування призводить до зниження метаболічної активності клітин, а рестимуляція викликає одночасну активацію метаболічних процесів в усіх клітинах. У контексті сигнального шляху mTOR/S6K1, за умов голодування відбувається його інактивація, що супроводжується зниженням фосфорилування S6K1 та рибосомального білка S6 і призводить до пригнічення синтезу білків та уповільнення проліферації. Рестимуляція поживними речовинами викликає гіперактивацію цього сигнального шляху для швидкого поновлення всіх метаболічних процесів.

Для дослідження динаміки ER α -залежного сигналінгу за умов метаболічного стресу клітини MCF-7, MCF-7/9 та MCF-7/12 культивували 24 год в середовищі без FBS з подальшою рестимуляцією протягом 1 год. Вплив голодування та рестимуляції в клітинних сублініях з CRISPR/Cas9-опосередкованим блокуванням ER α -66 на рівень ER α , експресію та фосфорилування mTOR (Thr2448), S6K1 (Thr389), рибосомального білка S6 (Ser235/236) аналізували методом вестерн-блотингу (рис. 3.6).

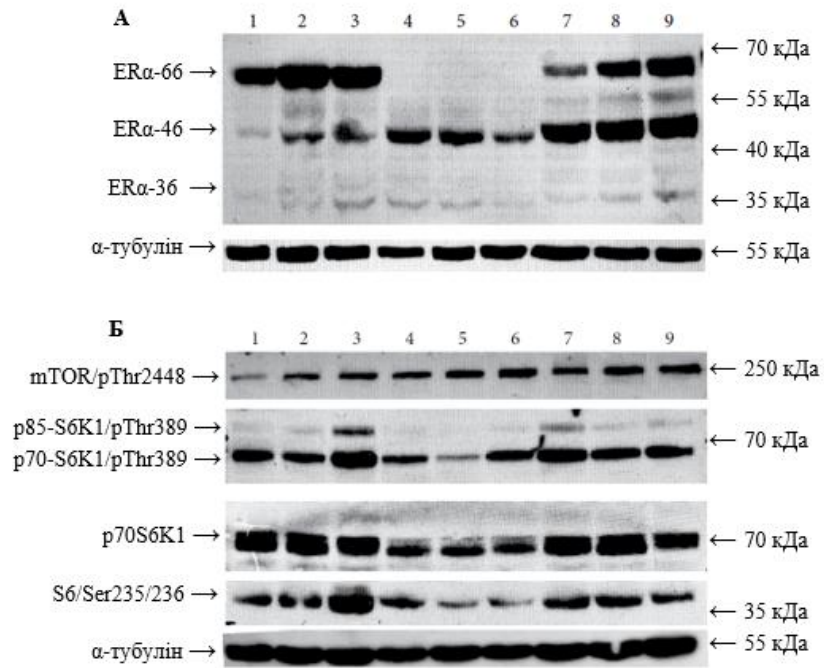


Рис. 3.6. Блотограми результатів аналізу впливу блокування ERα-66 mTOR/S6K1 сигнальний шлях в сублініях MCF-7/9 та MCF-7/12 за умов метаболічного стресу та рестимуляції щодо рівня ERα (A), рівня фосфорильованих білків mTOR (Thr2448), S6K1 (Thr389), S6 (Ser235/236), тотального S6K1 (Б). 1 – інтактні MCF-7; 2 – 24 год. голодування MCF-7; 3 – 1 год. рестимуляції MCF-7; 4 – інтактні MCF-7/9; 5 – 24 год. голодування MCF-7/9; 6 – 1 год. рестимуляції MCF-7/9; 7 – інтактні MCF-7/12; 8 – 24 год. голодування MCF-7/12; 9 – 1 год. рестимуляції MCF-7/12; нормалізовано щодо α-тубуліну

При голодуванні та рестимуляції змін в експресії тотальних ERα та S6K1 у контролі MCF-7 та сублініях MCF-7/9 та MCF-7/12 не виявлено. За рівнем S6K1 MCF-7 та MCF-7/12 не відрізнялись, що свідчить про те, що часткове пригнічення ERα-66 та надекспресія ERα-46 не має впливу на експресію S6K1. Це означає, що за такого співвідношення ERα-66 та ERα-46 як у MCF-7/12, ERα виконує функцію транскрипційного фактора для S6K1 на такому ж рівні як в контролі. А от повне блокування ERα-66 в MCF-7/9 призвело до значного зниження експресії S6K1 та активності промотора відповідного гену. Отже, за

блокування ER α -66 та наявності в клітинах лише ER α -46, активність рецептора як транскрипційного фактора для S6K1 значно знижується. Це підтверджується літературними даними про те, що ER α -46 функціонально дублює ER α -66, але є менш активною в геномній сигналізації через втрату домену AF-1. Пропорційно до зниження експресії тотального білка S6K1 в сублінії MCF-7/9 знизилось і фосфорилування S6K1 за основним сайтом фосфорилування – Thr389.

В досліджуваних сублініях спостерігається зміна динаміки фосфорилування S6K1 та S6 під час рестимуляції порівняно з контролем. В клітинах MCF-7 рівень фосфорилування S6K1 та S6 під час рестимуляції після голодування зростає вдвічі, порівняно з інтактними клітинами. А от в сублініях MCF-7/9 та MCF-7/12 значущих відмінностей між фосфорилуванням S6K1 та S6 за нормальних умов та при рестимуляції не виявлено.

Оскільки mTOR фосфорилує S6K1 за Thr389, було також проаналізовано вплив зміни експресії ER α на активність mTOR. Згідно з даними рис. 3.6, значущі відмінності у фосфорилуванні mTOR між MCF-7 дикого типу та сублініями MCF-7/9 і MCF-7/12 відсутні.

Окрім того, під час морфологічних спостережень було виявлено, що клітини MCF-7/9 мають кращу стійкість до несприятливих умов мікрооточення, порівняно з клітинами дикого типу MCF-7 та MCF-7/12. За спостереженнями, MCF-7 та MCF-7/12 швидше виснажували середовище, внаслідок чого відбувалась втрата адгезії та апоптоз. За таких же умов, зокрема такої ж кількості клітин на початку спостереження, клітини MCF-7/9 виглядали морфологічно нормально, не виснажували середовище, та, загалом, демонстрували кращу виживаність. На основі спостережень було сформовано припущення, про те, що при повному блокуванні ER α -66 зі збереженням ER α -46 у клітинах зменшується метаболічна активність і підвищується стресостійкість. Для підтвердження припущень було проведено МТТ-тест. Контрольну та досліджувані клітинні лінії культивували 24 год у середовищі

з різною концентрацією глюкози – 4,5 (норма), 1, 0,2 та 0 г/л. Результати МТТ-тесту представлені на рис. 3.7.

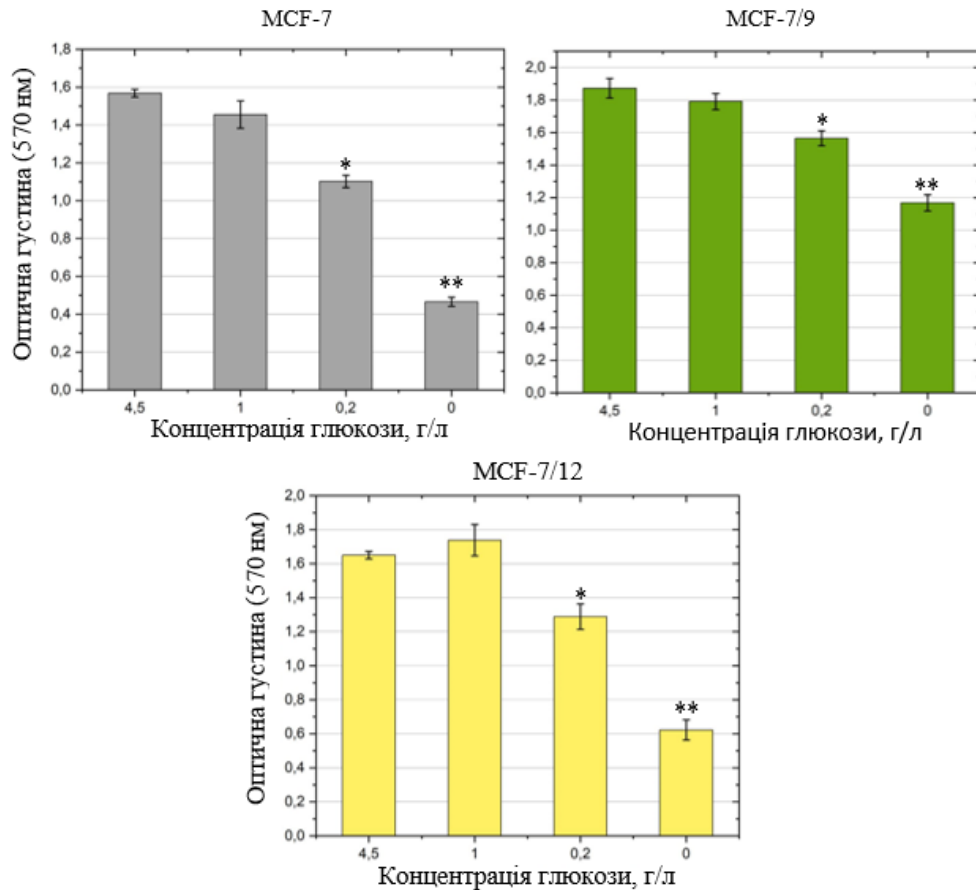


Рис. 3.7. Аналіз виживаності клітинних субліній MCF-7 з CRISPR/Cas9-опосередкованим блокуванням ER α -66 за зменшення концентрації глюкози в середовищі. Виживаність визначали за допомогою МТТ-тесту

$M \pm m$ (n=6); * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ порівняно з контролем (4,5 г/л глюкози)

За результатами МТТ-тесту спостерігаємо, що за зниження концентрації глюкози в середовищі рівень виживаності MCF-7/12 не змінився порівняно з контролем: при зниженні концентрації глюкози різко падала виживаність. В сублінії MCF-7/9 тенденція виявилась більш позитивною, загальна виживаність була вищою, ніж в клітин дикого типу та MCF-7/12, це особливо виражено при нульовій концентрації глюкози.

Таким чином, припущення про те що «вимкнення» ER α -66, за умови наявності в клітині ER α -46, сприяє вповільненню метаболізму та підвищення стресостійкості клітин раку молочної залози за несприятливих умов, підтверджується.

3.4. Оцінка проліферативної активності клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ER α

Зважаючи на виявлені зміни в експресії та фосфорилюванні S6K1 у сублініях з модифікованою експресією ER α , наступним етапом було визначено дослідження впливу цих змін на функціональні властивості клітин. Оскільки шлях mTOR/S6K1 безпосередньо регулює клітинний ріст, проліферацію та синтез білків, було проведено оцінку проліферативної активності субліній MCF-7/9 та MCF-7/12 порівняно з клітинами дикого типу.

Проліферативну активність вивчали за допомогою ресазуринового тесту, результати якого наведені на рис. 3.8.

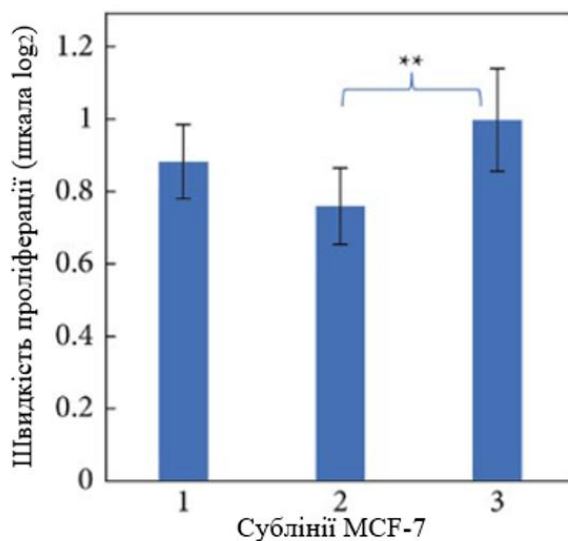


Рис. 3.8. Аналіз швидкості проліферації клітинних субліній MCF-7 з CRISPR/Cas9-опосередкованим блокуванням ER α -66. 1 – MCF-7 wt (контроль); 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/12. Швидкість проліферації визначено за нахилом лінійної регресії у шкалі log₂ за часовими точками 0, 24, 48 та 72 год. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою ресазуринового тесту

$M \pm m$ (n=6); ** – $p \leq 0,01$ порівняно з MCF-7/9

Сублінія MCF-7/9 демонструвала зниження швидкості проліферації на 14 % порівняно з диким типом, однак ця різниця не досягала порогу статистичної значущості ($p = 0,06$), що дозволяє інтерпретувати її лише як тенденцію. Сублінія MCF-7/12, навпаки, характеризувалася підвищенням швидкості проліферації на 13 % відносно MCF-7 wt, проте ця різниця також не була статистично значущою ($p = 0,14$). Натомість порівняння між двома сублініями виявило статистично достовірну різницю ($p < 0,01$): швидкість проліферації MCF-7/12 була значуще вищою за MCF-7/9.

Таким чином, дві CRISPR-модифіковані сублінії демонструють протилежні тенденції щодо проліферативної активності відносно батьківської лінії MCF-7 wt, при цьому різниця між самими сублініями є статистично достовірною.

3.5. Аналіз міграційної активності клітинних субліній MCF-7 з модифікованою експресією ER α

Окрім проліферативної активності, важливою функціональною характеристикою ракових клітин є їхня здатність до міграції, яка безпосередньо впливає на інвазивний та метастатичний потенціал. Блокування ER α -66 в досліджуваних сублініях, зниження експресії S6K1, виявлене у сублінії MCF-7/9, можуть впливати не лише на проліферацію, а й на рухливість клітин, оскільки сигнальний шлях mTOR/S6K1 також залучений і до регуляції цитоскелетної динаміки та клітинної міграції. Для перевірки цього припущення було проведено тест ранової поверхні (wound healing assay), який дозволяє оцінити швидкість міграції клітин *in vitro*.

Результати аналізу представлено на рис. 3.9. Швидкість міграції визначали за відстанню закриття ранової поверхні у часових точках 0, 24 та 48 год після нанесення подряпини на моношар клітин.

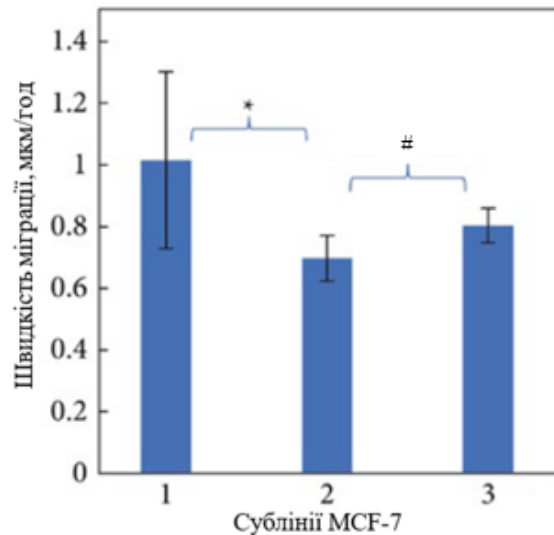


Рис. 3.9. Оцінка швидкості міграції субліній клітин MCF-7 методом тесту ранової поверхні (wound healing assay). 1 – MCF-7 wt; 2 – MCF-7/9; 3 – MCF-7/12. Швидкість міграції визначали за відстанню закриття подряпини на моношарі клітин у часових точках 0, 24 та 48 год

$M \pm m$ (n=6); * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем (MCF-7 wt), # – $p \leq 0,05$ порівняно з MCF-7/9

Обидві сублінії мігрували повільніше за клітини дикого типу MCF-7 wt. Найповільніше мігрували клітини MCF-7/9 – різниця з MCF-7 wt виявилась статистично значущою ($p < 0,05$). Сублінія MCF-7/12 також продемонструвала зниження швидкості проліферації порівняно з диким типом, однак у цьому випадку різниця не досягла порогу значущості.

Отже, повна або часткова втрата повнорозмірної ізоформи ER α -66 негативно вплинула і на проліферацію, і на рухливість клітин досліджуваних субліній. Це означає, що наявна в обох сублініях ізоформа ER α -46, хоч і здатна функціонально замінити основну ізоформу ER α -66, але вона є менш активною в якості транскрипційного фактора для білків, що відповідають за ріст, проліферацію та міграцію, зокрема S6K1. Тож саме зміна співвідношення ізоформ естрогенового рецептора альфа є одним з ключових факторів, який визначає здатність клітин адаптуватися до умов мікрооточення, шляхом зміни

метаболічної активності і таких функціональних характеристик клітин як швидкість проліферації, міграції та росту.

Загалом, у ході експериментальної роботи було продемонстровано, що ER α -66 не бере участі в ініціації епітеліально-мезенхімального переходу, тож, ймовірно, в регуляції EMT задіяні інші ізоформи рецептора; підтверджено, що ER α -66 дійсно може впливати на експресію генів EMT, хоча цього не достатньо для ініціації EMT; виявлено сильне зниження CEA в клітинах MCF-7/9 при повному блокуванні ER α -66, що свідчить про зменшення метастатичного потенціалу; В обох субліній спостерігалось помірне зниження ЕрСAM – білка адгезії, що корелює зі зниженням швидкості міграції. Повне блокування ER α -66 в сублінії MCF-7/9 призвело до значної втрати S6K1 і пропорційно фосфорилювання S6K1 та S6, що підтверджує літературні дані про те, що ER α є транскрипційним фактором для S6K1, і також вказує на меншу активність ER α -46 як транскрипційного фактора, порівняно з ER α -66.

Відбулась зміна динаміки фосфорилювання S6K1 та S6 в досліджуваних сублініях під час рестимуляції після голодування – в клітинах MCF-7/9 MCF-7/12 після рестимуляції фосфорилювання не відрізнялось від інтактних клітин, при тому що в клітинах MCF-7 дикого типу під час рестимуляції фосфорилювання зростало вдвічі відносно інтактних клітин, що свідчить про вповільнення метаболізму в досліджуваних сублініях. Сповільнення метаболізму підтверджувалось морфологічними спостереженнями: сублінія MCF-7/9 повільніше виснажувала середовище та виявилась більш стійкою до несприятливих умов середовища, порівняно з MCF-7 та MCF-7/12, які швидко виснажували середовище, втрачали адгезію, гинули. Морфологічні спостереження доповнювались результатами МТТ-тесту за культивування клітин в середовищі з різною концентрацією глюкози в напрямку її зниження до 0: клітини MCF-7/9 продемонстрували значно кращу загальну динаміку виживаності клітин при зниженні концентрації глюкози, зокрема при нульовій концентрації, ніж MCF-7 та MCF-7/12, в яких виживаність різко падала зі зниженням концентрації глюкози. Досліджувані сублінії також

продемонстрували тенденцію до зниження швидкості міграції та, при повному блокуванні ER α -66, проліферації.

Отримані результати вказують на те, що ізоформа ER α -66 відіграє ключову роль у підтриманні проліферативної та метаболічної активності клітин MCF-7 переважно через регуляцію експресії S6K1, тоді як її вплив на ініціацію EMT є обмеженим. Це дозволяє припустити, що в регуляції епітеліально-мезенхімального переходу в ER-позитивних пухлинах молочної залози провідну роль можуть відігравати коротші ізоформи рецептора – зокрема ER α -46 та ER α -36, функціональне значення яких потребує подальшого дослідження.

ВИСНОВКИ

У представленій роботі з використанням технології CRISPR/Cas9 створено та всебічно охарактеризовано клітинні сублінії MCF-7 з модифікованою експресією ізоформ ER α . Створені клітинні сублінії можуть бути використані як моделі для дослідження специфічних функцій окремих ізоформ ER α у канцерогенезі та для розробки нових підходів до подолання резистентності до ендокринної терапії.

1. Створено та охарактеризовано клітинні сублінії з повним та частковим блокуванням ER α -66 та компенсаторною надекспресією ER α -46. Повне блокування ER α -66 призвело до значного зниження експресії S6K1 на рівні мРНК та білка, тоді як за часткового пригнічення рівень S6K1 не відрізнявся від дикого типу.
2. Показано, що блокування ER α -66 не призводить до ініціації EMT. Водночас виявлено зниження CEA у MCF-7/9 та помірне зниження EpCAM в обох сублініях, що свідчить про вплив ER α -66 на окремі гени клітинної адгезії без повноцінної індукції EMT.
3. Встановлено зміну динаміки фосфорилування компонентів шляху mTOR/S6K1 за умов метаболічного стресу: в обох сублініях під час рестимуляції після голодування фосфорилування S6K1 та S6 не зростало, на відміну від дикого типу, де воно збільшувалось вдвічі. Сублінія з повним блокуванням ER α -66 також демонструвала вищу виживаність за дефіциту глюкози та сповільнений метаболізм.
4. При повному блокуванні ER α -66 спостерігалась тенденція до зниження швидкості проліферації та зниження швидкості міграції порівняно з диким типом. Обидві сублінії мігрували повільніше за дикий тип, що корелює зі зниженням експресії EpCAM та S6K1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kim, J., Harper, A. and McCormack, V. (2025). Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nature Medicine*, [online], Volume 31, pp. 1154–1162. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03502-3> [Accessed 12 Jul. 2024].
2. Iweala, E., Amuji, D. and Nnaji, F. (2024). Protein biomarkers for diagnosis of breast cancer. *Scientific African*, [online], Volume 25, id.e02308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2024.e02308> [Accessed 12 Jul. 2024].
3. Anbalagan, M. and Rowan, B. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418(3), pp. 264–272.
4. Kulkoyluoglu, E. and Madak-Erdogan, Z. (2016). Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids*, 114, pp. 41–47.
5. Azuma, K. and Inoue, S. (2012). Genomic and non-genomic actions of estrogen: recent developments. *BioMolecular Concepts*, 3, pp. 365–370.
6. Gibson, D. and Saunders, P. (2012). Estrogen dependent signaling in reproductive tissues – a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 348(2), pp. 361–372.
7. Candelaria, N., Liu, K. and Lin, C. (2013). Estrogen receptor alpha: molecular mechanisms and emerging insights. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), pp. 2203–2208.
8. Liu, Y., Ma, H. and Yao, J. (2020). ER α , a key target for cancer therapy: a review. *OncoTargets and Therapy*, 13, pp. 2183–2191.
9. Grinshpun, A., Chen, V., Sandusky, Z., Fanning, S. and Jeselsohn, R. (2023). ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, [online] Volume 1878(1), p. 188830. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188830> [Accessed 4 Nov. 2022].

10. Kumar, R., Zakharov, M., Khan, S., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S. and Jasuja, R. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of Amino Acids*, [online] Volume 2011, p. 812540. Available at: <https://doi.org/10.4061/2011/812540> [Accessed 26 Jul. 2011].
11. Hua, H., Zhang, H., Kong, Q. and Jiang, Y. (2018). Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Experimental Hematology & Oncology*, [online] Volume 7, p. 24. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0116-7> [Accessed 20 Sep. 2018].
12. Balcazar Lopez, C., Albrecht, J., Hafstað, V., Börjesson Freitag, C., Vallon-Christersson, J., Bellodi, C. and Persson, H. (2023). Alternative promoters and splicing create multiple functionally distinct isoforms of oestrogen receptor alpha in breast cancer and healthy tissues. *Cancer Medicine*, 12(18), pp. 18931–18945.
13. Saito, K. and Cui, H. (2023). Estrogen receptor alpha splice variants, post-translational modifications, and their physiological functions. *Cells*, [online] Volume 12(6), p. 895. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells12060895> [Accessed 14 Mar. 2023].
14. Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V. and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *The EMBO J.*, 19(17), pp. 4688–4700.
15. Chantalat, E., Boudou, F., Laurell, H., Palierne, G., Houtman, R., Melchers, D., Rochaix, P., Filleron, T., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., Brouchet, A., Flouriot, G., Métivier, R., Arnal, J.F., Fontaine, C. and Lenfant, F. (2016). The AF-1-deficient estrogen receptor ER α 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Research*, [online] Volume 18(1), p. 123. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0780-7> [Accessed 7 Dec. 2016].

16. Savinska, L., Kvitchenko, S., Palchevskyi, S., Kroupskaya, I., Mazov, A., Garifulin, O. and Filonenko, V. (2024). Generation of the MCF-7 cell sublines with CRISPR/Cas9 mediated disruption of estrogen receptor alpha (ESR1) expression. *Ukrainian Biochemical Journal*, 96(6), pp. 29–35.
17. Wang, Z. and Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- α 36): a new player in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418(3), pp. 193–206.
18. Pagano, M., Ortona, E. and Dupuis, M. (2020). A role for estrogen receptor alpha36 in cancer progression. *Frontiers in Endocrinology*, [online] Volume 11, p. 506. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00506> [Accessed 31 Jul. 2020].
19. Strillacci, A., Sansone, P., Rajasekhar, V., Turkekul, M., Boyko, V., Meng, F., Houck-Loomis, B., Brown, D., Berger, M., Hendrickson, R., Chang, Q., de Stanchina, E., Pareja, F., Reis-Filho, J., Rajappachetty, R., Del Priore, I., Liu, B., Cai, Y., Penson, A., Mastroleo, C., Berishaj, M., Borsetti, F., Spisni, E., Lyden, D., Chandarlapaty, S. and Bromberg, J. (2022). ER α -LBD, an isoform of estrogen receptor alpha, promotes breast cancer proliferation and endocrine resistance. *NPJ Breast Cancer*, [online] Volume 8(1), p. 96. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00470-6> [Accessed 23 Aug. 2022].
20. Al-Bader, M., Ford, C., Al-Ayadhy, B. and Francis, I. (2011). Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(3), pp. 537–544.
21. Ishii, H., Hattori, Y. and Ozawa, H. (2023). Estrogen receptor α isoforms generated by alternative use of cryptic exons. *Journal of Nippon Medical School*, 90(5), pp. 364–371.
22. Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kiełbus, M. and Stepulak, A. (2023). Estrogen receptor signaling in breast cancer. *Cancers*, [online] Volume 15(19), p. 4689. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15194689> [Accessed 23 Sep. 2023].

23. Molina, J. and Adjei, A. (2006). The Ras/Raf/MAPK pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(1), pp. 7–9.
24. Li, L., Zhao, G.-D., Shi, Z., Qi, L.-L., Zhou, L.-Y. and Fu, Z.-X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC (Review). *Oncology Letters*, 12, pp. 3045–3050.
25. Yamnik, R. and Holz, M. (2010). mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor α serine 167 phosphorylation. *FEBS Letters*, 584(1), pp. 124–128.
26. Ciruelos Gil, E. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(7), pp. 862–871.
27. Holz, M. (2012). The role of S6K1 in ER-positive breast cancer. *Cell Cycle*, 11(17), pp. 3159–3165.
28. Yamnik, R., Digilova, A., Davis, D., Brodt, Z., Murphy, C. and Holz, M. (2009). S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), pp. 6361–6369.
29. Maruani, D., Spiegel, T., Harris, E., Shachter, A., Unger, H., Herrero-González, S. and Holz, M. (2012). Estrogenic regulation of S6K1 expression creates a positive regulatory loop in control of breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, 31(49), pp. 5073–5080.
30. Aouad, P., Zhang, Y. and De Martino, F. (2022). Epithelial-mesenchymal plasticity determines estrogen receptor positive breast cancer dormancy and epithelial reversion drives recurrence. *Nature Communications*, [online] Volume 13, p. 4975. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32523-6> [Accessed 25 Aug. 2022].
31. Voutsadakis, I. (2016). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and regulation of EMT factors by steroid nuclear receptors in breast cancer: a review and in silico investigation. *Journal of Clinical Medicine*, [online] Volume 5(1), p. 11. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm5010011> [Accessed 19 Jan. 2016].
32. Bouris, P., Skandalis, S., Piperigkou, Z., Afratis, N., Karamanou, K., Aletras, A., Moustakas, A., Theocharis, A. and Karamanos, N. (2015). Estrogen receptor

- alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biology*, 43, pp. 42–60.
33. Button, B. and Park, B. (2016). ESR1 mutations: Pièce de résistance. *Genes & Diseases*, 3(2), pp. 124–129.
 34. Criscitiello, C., Fumagalli, D., Saini, K. and Loi, S. (2010). Tamoxifen in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer: overview of clinical use and molecular biomarkers for patient selection. *OncoTargets and Therapy*, 4, pp. 1–11.
 35. Swaby, R., Sharma, C. and Jordan, V. (2007). SERMs for the treatment and prevention of breast cancer. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8(3), pp. 229–239.
 36. Brueggemeier, R., Hackett, J. and Diaz-Cruz, E. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews*, 26(3), pp. 331–345.
 37. Bhatia, N., Hazra, S. and Thareja, S. (2023). Selective estrogen receptor degraders (SERDs) for the treatment of breast cancer: an overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, [online] Volume 256, p. 115422. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115422> [Accessed 5 Aug. 2023].
 38. Bardia, A., Cortés, J., Bidard, F.-C., Neven, P., Garcia-Sáenz, J., Aftimos, P., O'Shaughnessy, J., Lu, J., Tonini, G., Scartoni, S., Paoli, A., Binaschi, M., Wasserman, T. and Kaklamani, V. (2024). Elacestrant in ER+, HER2–metastatic breast cancer with ESR1-mutated tumors: subgroup analyses from the phase III EMERALD trial by prior duration of endocrine therapy plus CDK4/6 inhibitor and in clinical subgroups. *Clinical Cancer Research*, 30(19), pp. 4299–4309.
 39. Ibrahim, S., Khan, M., Khurram, I., Rehman, R., Rauf, A., Ahmad, Z., Aljohani, A., Al Abdulmonem, W. and Quradha, M. (2025). Navigating PROTACs in cancer therapy: advancements, challenges, and future horizons. *Food Science & Nutrition*, 13(2), e70011. Available at: <https://doi.org/10.1002/fsn3.70011> [Accessed 1 Feb. 2025].

40. Mittal, A., Molto Valiente, C., Tamimi, F., Schlam, I., Sammons, S., Tolaney, S. and Tarantino, P. (2023). Filling the gap after CDK4/6 inhibitors: novel endocrine and biologic treatment options for metastatic hormone receptor positive breast cancer. *Cancers*, [online] Volume 15(7), p. 2015. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15072015> [Accessed 28 Mar. 2023].
41. Subculturing Adherent Cells (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/subculturing-adherent-cells.html> (Accessed: 13 April 2026).
42. Cryopreservation of mammalian cells (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cryopreservation-of-mammalian-cells.html> (Accessed: 13 April 2026).
43. TurboFect™ Transfection Reagent (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0531> (Accessed: 13 April 2026).
44. Dilworth, D. (2018). A General Protocol for Western Blotting Mammalian Cell Lysates. *Structural Genomics Consortium*, [online]. Available at: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.pxndpme> [Accessed: 23 May 2018].
45. Protocol for Bradford Protein Assay (no date) Creative Proteomics. Available at: <https://www.creative-proteomics.com/resource/protocol-for-bradford-protein-assay.htm> (Accessed: 13 April 2025).
46. He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-Protocol*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.80> [Accessed: 5 Jun. 2025].
47. Mahmood, T. and Yang, P. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.*, 4(9), pp. 429–434.
48. Garifulin, O., Zaiets, I., Kosach, V., Horak, I., Khoruzhenko, A., Gotsulyak, N., Savinska, L., Kroupskaya, I., Martsynyuk, M., Drobot, L. and Filonenko, V. (2023). Alterations in S6K1 isoforms expression induce epithelial to

- mesenchymal transition and estrogen receptor 1 silencing in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Biopolymers and Cell*, 39(3), pp. 189–200.
49. Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (no date) Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0241> (Accessed: 13 April 2025).
50. Abd, A., Kadhim, E. and Mahmood, M. (2023). MTT (Assay protocol). protocols.io, [online]. Available at: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly72emlx9/v1> [Accessed: 27 Feb. 2023].
51. Savinska, L., Kvitchenko, S., Martsynyuk, M., Kroupskaya, I., Pogrebna, A., Mazov, A., Garifulin, O. and Filonenko, V. (2025). ESR1 gene editing and its impact on S6K1 signaling and cell behavior. *Biopolymers and Cell*, 41(3), pp. 181–190.