

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук

Кафедра біології
Магістерська робота
освітній ступінь - магістр

на тему **«ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНОГО РЕПРОГРАМУВАННЯ
КЛІТИН АДЕНОКАРЦИНОМИ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МИШІ ЛІНІЇ 4Т1,
АСОЦІЙОВАНІ З ПІДВИЩЕНИМ ІНВАЗИВНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
спеціальності 091 — біологія
Жованник Валерія Олегівна

Керівник
Мартиненко В. С.,
кандидат біологічних наук, ст. викладач
кафедри біології НаУКМА

Рецензент Рибачук О. А.,
кандидат біологічних наук, н.с.

Магістерську роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК _____
Пасічник Т.В.
«15» червня 2020 року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Ключові особливості біології ракових клітин	8
1.1.1. Біоенергетика ракових клітин.	9
1.1.2. Зміни метаболізму біогенних амінів у малігнізованих клітинах.....	14
1.2. Молекулярні механізми інвазії та метастазування пухлинних клітин.....	16
1.2.1. Епітелійно-мезенхімний перехід.....	16
1.2.2. Типи міграції пухлинних клітин.	19
1.3. Адаптерні протеїни та їх участь у канцерогенезі	21
1.3.1 Різноманітність адаптерних протеїнів.	21
1.3.2. Особливості будови та функцій адаптерного протеїну Ruk/CIN85.	24
1.3.3. Функція адаптерних протеїнів у розвитку злоякісних пухлин.	26
1.3.4. Роль Ruk/CIN85 у канцерогенезі.....	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	29
2.1. Характеристика дослідних клітин.....	29
2.2. Лізування клітин та визначення вмісту протеїнів у лізатах	30
2.3. Електрофорез протеїнів в ПААГ	31
2.4. Вестерн-блот аналіз	32
2.5. Дослідження інвазивного потенціалу клітин <i>in vitro</i> за допомогою модифікованої камери Бойдена	33

2.6. Отримання цитоплазматичних екстрактів.....	33
2.7. Визначення активності MMP-2 та MMP-9 за допомогою желатинової зимографії	34
2.8. Оцінка активності амінооксидаз	35
2.9. Статистична обробка результатів.....	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	38
3.1. Визначення вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у сублініях клітин .	38
3.2. З'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регуляції інвазивного потенціалу клітин лінії 4T1	40
3.3. Визначення активності MMP-2 та MMP-9 в клітинах лінії 4T1	42
3.4. Оцінка активності амінооксидаз в клітинах аденокарциноми миші лінії 4T1 з різним вмістом білку Ruk/CIN85.....	46
УЗАГАЛЬНЕННЯ	50
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AMT	– амебоїдно-мезенхімний перехід (<u>A</u> moeboid <u>M</u> esenchymal <u>T</u> ransition;
DAO	– діамінооксидаза (<u>D</u> iamine <u>O</u> xidase, DAO);
FAK(s)	– кіназ(и) фокальної адгезії (<u>F</u> ocal <u>A</u> dhesion <u>K</u> inase(s), FAK(s));
HIF-1 α	– альфа субодиниця гіпоксія-індуцибельного фактору 1 (<u>H</u> ypoxia <u>I</u> nducible <u>F</u> actor 1 alpha subunit, HIF-1 α);
LOX	– лізилоксидаза (<u>L</u> ysyl <u>O</u> xidase, LOX);
p130CAS	– субстрат p130, асоційований із CRK білком (p130 <u>C</u> RK- <u>A</u> ssociated <u>S</u> ubstrate, p130CAS);
PAO	– поліамінооксидаза (<u>P</u> olyamine <u>O</u> xidase, PAO);
Ruk/CIN85	– регулятор кінази/85 kDa білок, що взаємодіє із cbl (<u>R</u> egulator for <u>U</u> biquitous <u>K</u> inase/ <u>C</u> bl- <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein of <u>85</u> kDa, Ruk/CIN85);
SH	– гомологічні до Src домени (<u>S</u> rc <u>H</u> omology, SH);
SSAO	– чутлива до семікарбазиду амінооксидаза (<u>S</u> emicarbazide- <u>S</u> ensitive <u>A</u> mine <u>O</u> xidase, SSAO);
EMT	– епітелійно-мезенхімний перехід (<u>E</u> pithelial <u>M</u> esenchymal <u>T</u> ransition, EMT);
ECM	– позаклітинний матрикс (<u>E</u> xtrac <u>e</u> llular <u>M</u> atrix, ECM);

- MAT – мезенхімно-амебоїдний перехід (Mesenchymal Ameoboid Transition, MAT);
- MMP(s) – матриксн(и) металопротеїназ(и) (Matrix Metalloproteinase(s), MMP(s));
- РТК – pрецептор tирозин kінази.

ВСТУП

Рак молочної залози щорічно стає однією із головних причин смертності серед жінок у всьому світі [1]. Саме метастазування первинної пухлини є причиною невдалого лікування і, як наслідок, смерті пацієнток. Розвиток більш агресивного фенотипу малігнізованих клітин тісно пов'язаний із перетворенням неінвазивних клітин у клітини із підвищеним інвазивним потенціалом з, відповідно, підвищеною метастатичністю. Одночасно із цим, сучасні стратегії лікування пацієнток із раком молочної залози в основному націлені саме на клітини первинної пухлини, а не на клітини, що здатні утворювати метастази.

Дослідження останніх років яскраво продемонстрували беззаперечну рушійну роль зворотнього епітелійно-мезенхімного переходу (epithelial mesenchymal transition, EMT), в тому числі і його варіанту мезенхімно-амебоїдного переходу, у промоції утворення метастазів злоякісних пухлин [2]. Набуття мезенхімно-амебоїдного фенотипу клітинами злоякісного новоутворення забезпечує їх здатністю до активної міграції внаслідок втрати міжклітинних контактів та утворення специфічних клітинних утворень (філоподій, інвадоподій, «блебів»). Малігнізовані клітини, яким вдалось дістатись до цільового органу, встановлюють у ньому специфічне мікрооточення, що є необхідним для формування вторинних осередків злоякісного росту.

Регуляція EMT відбувається за рахунок динамічних змін у позаклітинному середовищі та подальшій активації відповідних сигнальних мереж. Більш детальне та глибоке розуміння молекулярних механізмів, залучених до процесів, які надають клітинам здатності до активної міграції, інвазії та метастазування є вирішальною стратегією розробки нових терапевтичних підходів, що могли б забезпечити більш адекватне лікування раку молочної залози. Одним із головних компонентів регуляції сигнальних шляхів є адаптерні протеїни, які забезпечують повну та точну активацію різноманітних сигнальних мереж, а також їх

інгібування, регулюють утворення та локалізацію сигналом [3]. Враховуючи таку роль адаптерних протеїнів, порушення їхніх функцій може бути потенційним триггером для розвитку злоякісного новоутворення та реалізації більш агресивних стратегій перебігу канцерогенезу. Наразі вже встановлено, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa) має підвищене продукування у тканині аденокарциноми молочної залози, особливо у сайтах інвазивного росту [4].

Однак, на сьогодні у літературі спостерігається практично повна відсутність даних, які б пояснювали вклад адаптерних протеїнів, зокрема Ruk/CIN85, до регуляції біології клітини під час зворотнього епітелійно-мезенхімного переходу. Дослідження таких механізмів дозволить не тільки визначити роль адаптерних протеїнів у мезенхімно-епітелійному переході, а і встановити нові терапевтичні цілі для впровадження більш сучасних стратегій лікування раку молочної залози.

Метою дослідження є оцінка впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на активність ключових ензимів, що залучені до процесу інвазії та метастазування клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. З'ясувати вплив надпродукування/пригніченого продукування Ruk/CIN85 на інвазивний потенціал клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 *in vitro*;

2. Визначити желатиназну активність матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 у дослідних сублініях клітин лінії 4T1;

3. Проаналізувати вплив зміни рівня продукування Ruk/CIN85 в клітинах лінії 4T1 на активність лізилоксидази (LOX) та інших амінооксидаз (діамінооксидази (DAO), поліамінооксидази (PAO), чутливої до семікарбазиду амінооксидази (SSAO));

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ключові особливості біології ракових клітин

Ключовими особливостями ракової клітини раніше вважались певні її ознаки, які відрізняють її від фенотипово нормальної клітини [5]. Однак, варто зазначити, що багато таких ознак характерні як для ракових, так і для не малігнізованих клітин. Яскравим прикладом слугують ендометріальні клітини, які за ендометріозу здатні інвазувати та розсіюватись в організмі жінки поза анатомічними межами, при цьому не проходячи процесу малігнізації [6]. На даний момент найбільш коректно буде вважати, що ці ключові риси є лише певною організаційною системою можливостей клітини, які з'являються під час її трансформації з фенотипово нормальної, незалежно від того, чи ця трансформація зупинилась на стадії доброякісного росту чи продовжилась у напрямку малігнізації. Тож найбільш чітким визначенням ключових ознак ракової клітини можна вважати наступне: це набуті еволюційно вигідні характеристики, що сприяють трансформації фенотипово нормальних клітин у малігнізовані, а також прогресії малігнізованих клітин одночасно із виснаженням/експлуатацією вихідної тканини (рис. 1.1) [7].

Загалом, ключовими рисами ракових клітин являються наступні ознаки:

- 1) самозабезпечення ростовими сигнальними молекулами;
- 2) нечутливість до молекул, що сповільнюють ріст;
- 3) уникнення апоптозу;
- 4) безмежний проліферативний потенціал;

- 5) постійний ангиогенез;
- 6) здатність до інвазій та міграції;
- 7) уникнення імунної відповіді;
- 8) репрограмований метаболізм [7].

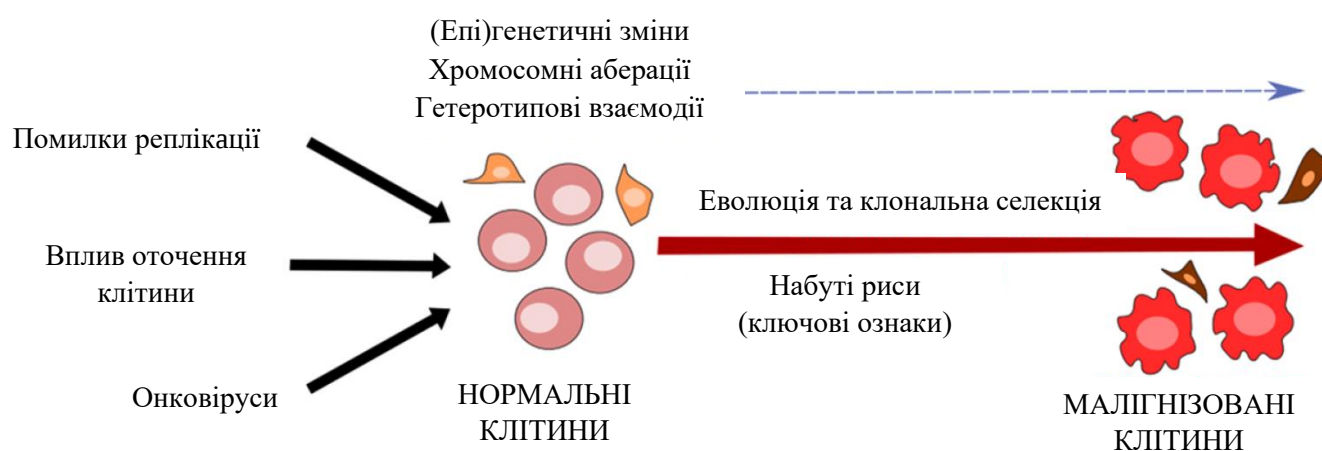


Рис. 1.1. Процес злоякісної трансформації клітини. Різноманітні чинники постійно впливають на клітини, призводячи до її трансформаційних змін в (епі)генетиці, кількості хромосом та їх організації та деяким гетеротиповим взаємодіям, на шляху малігнізації, підпадають циклам еволюційної клональної селекції, що веде до встановлення сприятливих для ракової клітини рис, тобто її ключових особливостей [7].

1.1.1. Біоенергетика ракових клітин. АТФ – це первинний енергетичний ресурс для клітин ссавців, що продукується завдяки процесам оксидативного та неоксидативного метаболізму глюкози. Окисне фосфорилування продукує 36 молекул АТФ на 1 моль глюкози, в той час, як гліколіз – лише 2 молекули АТФ. Таким чином, конвенційна модель клітинної енергетичної динаміки передбачає,

що доступність кисню визначає оптимальний метаболічний шлях продукції АТФ таким чином, що менш ефективний гліколіз використовується переважно як резервний метаболічний шлях за гіпоксії [8]. В той час, як нестача кисню на клітинному рівні виникає під час фізичної активності в нормальних клітинах м'язів, гіпоксія також є репрезентативною ознакою клітин високоінвазивного та швидкоростучого раку. Темп розмноження ракових клітин значно перевищує швидкість ангіогенезу таким чином, що в той час як доступ глюкози до клітини може бути цілком достатній, мала кількість судин призводить до нестачі кисню, що необхідний для повної оксидації глюкози. Подібний стан на мікроскопічному рівні визначає одну із фундаментальних особливостей пухлинного мікрооточення, що змушує малігнізовані клітини до метаболізму глюкози за допомогою циклу молочної кислоти [9].

Гліколіз включає процес перетворення глюкози на піруват, а потім на лактат, що є побічним продуктом. У неракових клітинах мітохондрії окиснюють піруват до CO_2 та води за присутності кисню, а гліколітичні реакції при цьому інгібуються (ефект Пастера). Перетворення глюкози на лактат, навіть за присутності кисню, відоме як аеробний гліколіз або ефект Варбурга [10]. Первинною гіпотезою Варбурга було припущення, що ракові клітини метаболізують глюкозу за допомогою аеробного гліколізу через порушену функцію їх мітохондрій [11]. Однак наразі загальновідомо, що більшість малігнізованих клітин мають повноцінний мітохондріальний метаболізм, а в деяких випадках – навіть підвищений [12].

В ракових клітинах також відбувається окисне фосфорилування, однак більшість молекул глюкози, які поглинає малігнізована клітина (66%) метаболізується за допомогою ферментування [9]. Через те, що аеробний гліколіз не є ефективним, він забезпечує адекватний запас енергії шляхом підвищеного потоку глюкози, що в ракових клітинах детектують за допомогою F18 міченої

деокси-d-глюкози та позитронної емісійної томографії (F18 labeled deoxy-d-glucose and Positron Emission Tomography, FdG-PET). FdG-PET метод підтвердив, що у більшості первинних та метастатичних клітинах раку був значно підвищений рівень поглинання глюкози у порівнянні із клітинами фенотипово нормальних тканин [8, 9]. Комп'ютерне моделювання продемонструвало, що ракові клітини у доброякісній, стабільній формі (такій, як фіброїд) скоріше матимуть низьку гліколітичну ємність, в той час як клітини інвазуючої пухлини із гетерогенним кровоотоком, що піддаються імунній атаці будуть скоріше підтримувати високу гліколітичну ємність [8].

Гліколіз хоч і є менш ефективним, ніж окисне фосфорилування, однак час, необхідний на продукцію АТФ цим шляхом є в 10 разів швидшим за повне окиснення глюкози. Таким чином, гліколіз добре підходить для забезпечення постійно змінних (флуктуаційних) енергетичних потреб ракової клітини [8]. Оскільки практично всі аспекти розвитку ракової клітини, включаючи міграцію та інвазію [13], потребують підвищеної активності мембранних транспортерів, ефект Варбурга розглядається як фізіологічна відповідь значній флуктуації у короточасних енергетичних потребах клітин [8]. Однак, в малігнізованих клітинах присутні також і механізми швидкого напрацювання енергії, що доступні для інших типів клітин. Наприклад, швидкий синтез АТФ з креатинкіназ у м'язах або аденілаткінази під дією гормональних змін [14].

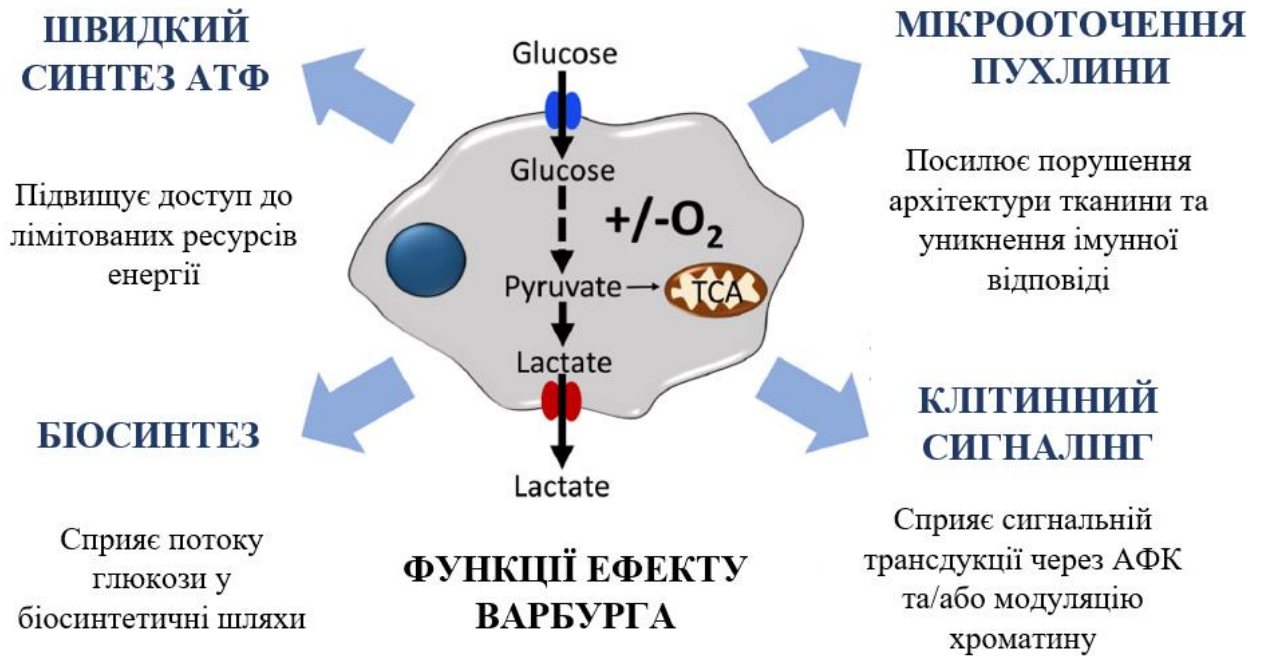


Рис. 1.2. Узагальнена схема функцій ефекту Варбурга. Завдяки ефекту Варбурга відбувається підвищення рівня поглинання глюкози та переважання перетворення її на лактат, навіть за присутності кисню [14].

Ефект Варбурга також може бути напряду залучений до онкоген-індукованого старіння. Важливим фактором, що визначає окисно-відновний потенціал клітин є NADH, що доступний у мітохондріях для транспорту електронів. За нормальних рівнів гліколізу малат-аспартатний шатл у мітохондріях цілком справляється із відновленням балансу NADH. У випадку, коли швидкість гліколізу перевищує швидкість малат-аспартатного шатлу, перетворення пірувату на лактат за допомогою лактат дегідрогенази (ЛДГ) здатне регенерувати NAD^+ . Цей процес також впливає на гомеостаз продукування активних форм кисню через зміну концентрації відновних еквівалентів у мітохондріях. Це вказує на те, що редокс баланс NADH може сприяти прямій сигнальній ролі ефекту Варбурга (рис. 1.2) [14]. Додатково, проліферуюча ракова клітина потребує збільшеного вмісту відновлюючих еквівалентів у вигляді

NADPH. Збільшене поглинання глюкози забезпечує підвищений синтез цих відновлюючих еквівалентів в оксидативній гілці пентозо-фосфатного шляху, що в подальшому використовується у редукційному біосинтезі, головним чином у *de novo* синтезі ліпідів [15].

Ще одне із сучасних пояснень використання раковими клітинами менш ефективного аеробного гліколізу замість окисного фосфорилування полягає в тому, що ефект Варбурга є еволюційною адаптацією до несприятливого мікросередовища з метою задоволення біосинтетичних потреб, пов'язаних із неконтрольованою проліферацією клітин. Таким чином ракові клітини використовують карбонові ланцюги лактату в якості будівного матеріалу для синтезу біомолекул (нуклеїнових кислот, білків, ліпідів), що є необхідними для проліферації клітини [9,16]. Однак, ця гіпотеза має певні обмеження, наприклад, те, що під час аеробного гліколізу більшість карбону не утримується, а виділяється у вигляді лактату; або той факт, що ціна продукції білків аеробного гліколізу (залучення до процесу до 10% всього протеому та половини метаболічних генів [17]) є такою ж, якщо не більшою, ніж ціна продукування білків для біосинтезу (рис. 1.2) [5].

Ефект Варбурга сприяє росту ракової клітини у мультиклітинному середовищі таким чином, що підвищений метаболізм глюкози знижує рН мікросередовища. Надпродукція ЛДГ-А та ЛДГ-В у ракових клітинах за умов гіпоксії сприяє перетворенню пірувату на лактат, що в подальшому, виділяється у позаклітинне середовище через монокарбоксилатний транспортер, закислюючи таким чином навколишнє мікросередовище (рис. 1.2) [18]. Подібне кислотне мікросередовище, що є токсичним для оточуючих нормальних клітин, сприяє деградації позаклітинного матриксу за допомогою протеїназ; підвищенню ангіогенезу за рахунок дії VEGFA (vascular endothelial growth factor A); зниженню імунної відповіді до пухлинних антигенів [19,20].

1.1.2. Зміни метаболізму біогенних амінів у малігнізованих клітинах.

Загальновідомо, що інгібування апоптозу відіграє ключову роль у канцерогенезі, стаючи ініціатором розвитку пухлин та подальшого їх прогресу, інвазії та метастазування [21–23]. Рядом авторів були показані стійкі зв'язки між метаболізмом біогенних амінів та посиленням або інгібуванням апоптозу [24–26]. Відповідно, амінооксидази – основні ензими, що відповідають за обмін біогенних амінів, – залучені до регулювання запрограмованої смерті клітин [27].

Амінооксидази – це гетерогенний клас ензимів, що відрізняються між собою за структурою, механізмом каталізу та необхідним для окиснення субстратом. Моно-, ди- та поліаміни підлягають окисному дезамінуванню амінооксидазами у реакції, внаслідок якої поглинаються O_2 та H_2O та виділяється відповідний альдегід, видаляються амінний залишок та H_2O_2 у стехіометричних кількостях. Виділяють дві основні групи амінооксидаз: FAD- та Cu-залежні, останні в свою чергу діляться на ще дві групи: мітохондріальні моноамінооксидази (MAO) та цитозольні поліамінооксидази (PAO) [28]. Амінооксидази залучені до таких процесів, як диференціювання клітин, клітинний ріст, загоєння ран, детоксифікація та клітинний сигналінг через різноманітні метаболічні шляхи [29].

Біогенні аміни, а саме, путресцин, спермідин та спермін, можуть визнаватись і як протектори, і як отруйні речовини для клітини. Продукти їх окиснення, H_2O_2 (а отже і активні форми кисню) та аміноальдегіди визнаються інгібіторами клітинного росту. Однак, водночас, була продемонстрована ініціація розвитку пухлини у нирці хом'яка, що була пов'язана зі значним збільшенням продукції перекису водню та гідроксильного радикалу через опосередковану естрогеновим рецептором активацію моноамінооксидази [30,31]. Підвищення активності амінооксидаз під час розвитку пухлини пояснюється збільшенням рівня внутрішньоклітинних поліамінів. Кореляція між

рівнем малігнізації пухлинних клітин та рівнем активності амінооксидаз була продемонстрована на астроцитомах, де було показано, що їх активність є пропорційною рівню малігнізації [30].

Підвищена активність діамінооксидази спостерігалась як у пухлинній тканині так і у біологічних рідинах пацієнтів із раковими пухлинами [26]. Амінооксидази також можна знайти у живильному середовищі, в якому інкубувались культури клітин, що вказує на екскрецію цих ензимів з клітин [30]. Деякі інгібітори активності амінооксидаз розглядають як потенційні протиракові препарати. Так, наприклад, довгострокова експозиція експериментальних тварин N,N-біс-алленіл-путресцином, інактиватором РАО, значно покращила протираковий ефект α -дифторметилорнітину (DFMO) [30]. Експресію лізилоксидази (LOX) пов'язують одночасно як з пригніченням пухлин, так і з їх прогресією. LOX може мати різноманітні внутрішньоклітинні локалізації, не дивлячись на те, що вона є позаклітинним ензимом [32,33]. Експресія первинної амінооксидази 3 (АОС3), що має активність чутливої до семікарбазиду амінооксидази (SSAO), корелює із несприятливим прогнозом для пацієнтів із різними типами раку [34–36].

Загалом, амінооксидази є ключовими ензимами, що залучені до процесу росту та диференціації клітин, і, таким чином, мають вплив на регуляцію росту та розвитку ракових пухлин. Також, вони можуть сприяти розвитку канцерогенезу внаслідок послаблення роботи антиоксидантних ферментів клітини [28,30].

1.2. Молекулярні механізми інвазії та метастазування пухлинних клітин

Каскад інвазії-метастазування [37] ракових клітин включає наступні етапи:

- 1) локальну інвазію клітин первинної пухлини у навколишні тканини;
- 2) потрапляння цих клітин у кровоток та виживання в ньому;
- 3) перехід клітин через стінки судин в паренхіму віддалених тканин;
- 4) утворення мікроколоній в органі-мішені;
- 5) колонізація – подальше розмноження клітин метастатичних мікроколоній з утворенням обширних метастазів [38].

На початкових етапах метастазування ключовим процесом перетворень пухлинної клітини, який забезпечує її здатність від'єднуватись від первинної пухлини та мігрувати й інвазувати у віддалені тканини, є епітелійно-мезенхімний перехід (ЕМТ). За нормальних умов ЕМТ індукується під час ембріогенезу і під час загоєння епітеліальних пошкоджень у дорослих. Однак, у випадку ракових клітин він забезпечує їх здатність до втрати властивостей епітелійних клітин та набуття властивостей мезенхімних клітин [39].

1.2.1. Епітелійно-мезенхімний перехід. Епітелійні клітини, і подібні до них епітелійні карциномні клітини, характеризуються наявністю апікально-базальної полярності, а також міжклітинних контактів – щільних, адгезивних і десмосом, – що формуються за допомогою молекул адгезії. Головною особливістю ЕМТ є втрата клітинами епітелійних ознак і набуття мезенхімних, що забезпечує їх

рухливість та інвазивність [40,41]. Клітини, що знаходяться в процесі ЕМТ, піддаються зміні експресії генів, що забезпечує зміни архітектури цитоскелету клітини, а також зміни її взаємодії із позаклітинним матриксом [37,42].

Первинним індуктором ЕМТ є TGF- β (transforming growth factor), що продукується пухлинними клітинами, а також стромальними фібробластами, у мікрооточення [43]. Прозапальний цитокін TNF- α (tumor necrosis factor) також індукує ЕМТ за допомогою транскрипційного фактору NF- κ B (nuclear factor kappa) [136] та IL-6/STAT (interleukin-6/ signal transducers and activators of transcription) шляху [44].

У відповідь на індукцію ЕМТ пухлинна клітина починає продукувати транскрипційні фактори, серед яких родини транскрипційних факторів, що містять домен «цинкові пальці», а саме SNAIL (SNAIL1 та SNAIL2/SLUG) і ZEB (ZEB1 і ZEB2), а також такі, що мають базальний helix-loop-helix домен, – родини TWIST (TWIST1 і TWIST2) [41]. Для родин SNAIL і ZEB показано можливість пригнічувати транскрипцію Е-кадгерину за допомогою зв'язування із послідовностями E-box у промоторах відповідного гену, а також, можливість регулювати продукування протеїнів щільних контактів (окклюдину, клаудину, ZO-1 і коннексинів JAM1/A) [45]. Члени родини TWIST, в свою чергу, пригнічують продукцію Е-кадгерину за допомогою індукування SNAIL факторів [46,47]. Отже, транскрипційні фактори TWIST, SNAIL і ZEB відповідають за пригнічення експресії генів, що надають клітині епітеліального фенотипу, та активацію експресії генів, які відповідні за мезенхімний фенотип ракової клітини.

ЕМТ супроводжується руйнуванням щільних клітинних зв'язків за рахунок зниження експресії клаудину та окклюдину, а також втрати білка ZO1/TJP1 в зонах міжклітинних контактів. Під час дестабілізації адгезивних зв'язків Е-кадгерин розщеплюється у плазматичній мембрані і, відповідно, деградує [48]. Ці

процеси дозволяють клітині відкріпитись та стати рухливою, що забезпечує її подальшу інвазію та метастазування [49]. Протягом процесу ЕМТ продукція молекул, які забезпечують стабільність міжклітинних контактів, пригнічується на транскрипційному рівні, що призводить до планомірної втрати епітелійних ознак раковою клітиною [42].

Ремоделювання позаклітинного матриксу (extracellular matrix, ECM) та зміни взаємодії клітин із ним є ключовим моментом ініціації та прогресії ЕМТ. Оскільки під час ЕМТ клітини втрачають зв'язок із базальною мембраною, то всередині клітини відбувається пригнічення продукції деяких епітелійних інтегринів, однак активується продукція інших, які є ключовими регуляторами прогресії ЕМТ [48]. Зміна картини продукції інтегринів у клітині під час ЕМТ корелює із підвищеною експресією протеаз, таких як матриксі металопротеїнази MMP-2 та MMP-9, які опосередковують підвищений рівень деградації ECM, що забезпечує інвазію пухлинних клітин. MMPs додаткового розщеплюють певні трансмембранні протеїни, що призводить до, наприклад, виділення позаклітинного домену Е-кадгерину, що в свою чергу сприяє втраті адгезивних зв'язків [50].

Клітини, які знаходяться в процесі ЕМТ, підлягають зміні організації кортикального актинового цитоскелету з метою забезпечення їх динамічного видовження та спрямованої рухливості [48]. Як наслідок, клітина починає формувати ламелоподії, філоподії та інвадоподії. Останні є збагаченими на актин вигинами мембрани, що відповідають за протеолітичне розщеплення ECM, що власне і сприяє активній інвазії пухлинних клітин [51]. Також, для таких клітин характерні підвищена скоротливість тіла та формування актинових волокон. Подібна динамічна реорганізація актину опосередкована миезином та іншими регуляторними білками [52].

EMT є важливим процесом, який сприяє метастазуванню/інвазії пухлинних клітин. Комбінування методів, що спрямовані на ліквідацію мезенхімних пухлинних клітин, із більш класичними методами лікування, цілком яких є епітелійна популяція, може бути найбільш ефективною стратегією для боротьби із частковим EMT ракових клітин та неоднорідності пухлини, що і лежить в основі хіміорезистентності та метастазування [41]. На сьогодні в основі боротьби із раковими клітинами, що мають мезенхімний фенотип використовують інгібітори різноманітних ланок EMT, а саме інгібітори HIF-1 α (hypoxia inducible factor 1 alpha subunit), лізілоксидази, інгібітори взаємодії з відповідним рецептором TGF β , IL6, HGF (hepatocyte growth factor), FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), блокувальні антитіла проти інтегринів, інгібітори сигналювання, залежного від Src, RAS/RAF/MAPK, інгібітори транскрипційних факторів NF- κ B, STAT, індуктори мікроРНК miR-34a, інгібітори деацетилаз тощо [50].

1.2.2. Типи міграції пухлинних клітин. Пухлинні клітини для міграції та інвазії використовують схожі із нормальними нетрансформованими клітинами механізмами. Однак, різниця полягає в тому, що малігнізовані клітини не чутливі до нормальних фізіологічних сигналів, спрямованих на регуляцію процесу [53,54].

Клітинна міграція – це процес, який складається з п'яти кроків [53]. Першим етапом є актин-керована протрузія того боку клітини, який в подальшому стане лідируючим, тобто переднім. Другий крок передбачає утворення інтегрин-опосередкованих зв'язків переднього краю клітини із субстратом, після чого починається руйнування позаклітинного матриксу на кілька мікрометрів попереду лідируючої сторони клітини – третій крок [54,55]. На четвертому кроці

відбувається скорочення задньої частини клітини, опосередковане актоміозиновим комплексом, що в подальшому спричиняє підтягування задньої частини клітини та просування передньої [53,56]. Для більшості клітин процес міграції контролюється малими GTP-азами Rac або Cdc42, які відповідають за формування псевдоподій. Однак, інші клітини можуть мігрувати, маючи низьку активність Rac та обернені кроки 1 та 2, утворюючи при цьому блебоподібні вип'ячування мембрани. Таким чином, можна виділити два типи міграції клітин: мезенхімний (Rac-залежний) та амебоїдний (Rac-незалежний) [53,57].

Мезенхімний тип міграції характерний як для нормальних (кератиноцити, фібробласти), так і для пухлинних клітин. За рахунок відносно повільного процесу перебудови інтегрин-опосередкованих зв'язків із субстратом, для цього типу міграції характерна досить повільна швидкість, що становить 0,1-0,5 мкм/хв у тривимірному матриксі [2,58]. Натомість, клітини, що мігрують за амебоїдним типом (як нормальні, так і ракові) характеризуються більш високою швидкістю міграції клітин у 3D-матриксі – від 2 мкм/хв до 25 мкм/хв [59,60]. Така можливість забезпечується тим, що міграція клітин за амебоїдним типом відбувається не залежно від деградації позаклітинного матриксу [61,62].

Тип міграції пухлинної клітини може змінюватись в залежності від молекулярного складу мікрооточення клітини. Цей процес має назву мезенхімно-амебоїдного переходу (mesenchymal amoeboid transition, MAT) і навпаки – амебоїдно-мезенхімного переходу (amoeboid mesenchymal transition, AMT). Такі переходи контролюються малими GTP-азами Rho, Rac та Cdc42 [61,63]. Оскільки, амебоїдний тип міграції регулюється в основному шляхом активації малої GTP-ази Rho/ROCK, то пригнічення саме цього сигнального шляху може викликати MAT [59]. Показано також, що інгібування регулятора Cdc42, або даунстрім компонентів його сигнального шляху (N-WASP та PAK2) також призводить до MAT [64]. Міграція за мезенхімним типом, в свою чергу, залежить від

сигналювання GTP-ази Rac1 [65]. Саме за рахунок існування взаємного пригнічення сигнальних шляхів, до яких залучені Rac і Rho відбувається регуляція переходу між амебоїдним та мезенхімальним типами міграції [63].

1.3. Адаптерні протеїни та їх участь у канцерогенезі

1.3.1 Різноманітність адаптерних протеїнів. Адаптерні протеїни складаються з певних доменів та мотивів, що сприяють взаємодії сигнальних молекул, скріплюючи їх подібно до того, як діють активовані поверхневі рецептори та даунстрім ефектори. Адаптерні протеїни забезпечують правильну просторову організацію та збірку комплексів сигналювання, а також їх адекватну дію в межах їхніх функцій [66–68]. Можна виділити кілька типів адаптерних молекул: адаптерні протеїни (англ. – adaptor protein), риштувальні або скаффолд протеїни (англ. – scaffold protein) та заякорювальні або докінгові протеїни (англ. – anchoring protein та docking protein) (рис. 1.3) [69,70]. Однак, на практиці часто неможливо розрізнити певну єдину функцію адаптера, тому часто ці три визначення використовують як синоніми.

Скаффолд протеїни визначають як такі білки, що є активними регуляторними компонентами сигнального шляху за рахунок з'єднання принаймні двох сигнальних ензимів разом, що сприяє їх комунікації за рахунок близького розташування. Такі протеїни можуть діяти за допомогою механізмів примусової близькості, комбінаторного використання елементів, динамічної орієнтації та конформаційного тонкого налаштування. У першому випадку риштувальний протеїн забезпечує ефективну концентрацію сигнальних молекул, в той час як за відсутності такого протеїну, сигнальні комплекси дифундують.

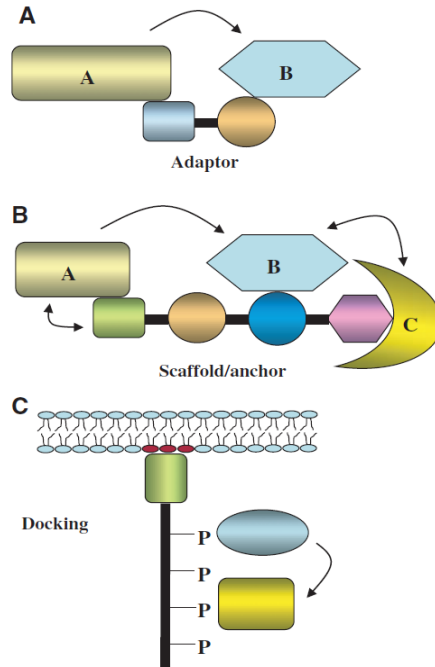


Рис. 1.3. Різноманітність адаптерних молекул: А – адапторний протеїн зазвичай має невелику молекулярну масу, містить дві ділянки зв'язування із цільовими сигнальними протеїнами; В – риштувальний протеїн є великим мультидоменним протеїном, що може зв'язувати одразу кілька компонентів сигнального шляху; С – докінговий протеїн має схожу структуру та функціональні особливості, однак здатні локалізуватись на мембранах біля активаторних рецепторів, із якими вони зв'язуються у фосфорильно-залежний спосіб [71].

У другому випадку суть полягає в тому, що для максимальної ефективності передачі сигналу необхідна така комбінація стехіометричних положень скаффолда та його партнера, яка б забезпечувала найбільш оптимальну роботу комплексу. У іншому випадку буде спостерігатись повне або часткове інгібування сигналу. У третьому варіанті передбачається забезпечення риштувальним протеїном обмеженої конформації молекули-партнера задля посилення сигналу. В останньому варіанті маються на увазі алостеричні зміни конформації молекули-партнера, що сприяє його активації або інактивації [71].

Прикладом риштувального протеїну є найбільш добре охарактеризований білок Ste5, що міститься в дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*. Він регулює MAPK-кіназний сигнальний шлях через забезпечення з'єднання трьох ланок шляху, коректної локалізації комплексу, правильної алостеричної організації та захисту комплексу від передчасної деградації [71–73].

Докінговими протеїнами називають сигнальні трансдуктори, що залучені до рецептор тирозинкіназного (РТК) сигналювання і мають мембран-асоційовану ділянку на N-кінці та кілька сайтів фосфорилювання із залишками тирозину, які слугують сайтами зв'язування для Src гомологічних (Src homology, SH)₂ доменів різноманітних дайнстрім ефекторів. Прикладом такого протеїну є субстрат інсулінового рецептору IRS1-6 (insulin receptor substrate), з яких саме IRS-1 є найбільш типовим для родини та найбільш охарактеризованим. PH (Pleckstrin homology) домен забезпечує зв'язування IRS із інсуліновим рецептором (insulin receptor, IR) за рахунок зв'язування із фосфоінозитидами, а PTB (Phosphotyrosine binding) стабілізує комплекс за рахунок взаємодії із специфічними фосфорильованими NPXY мотивами IR [74]. Заякорювальні протеїни в свою чергу здатні розміщувати комплекси з сигнальними молекулами-партнерами у будь-якому компартменті клітини. Наприклад, білки з родини AKAPs (A-kinase anchoring proteins; AKAP79, AKAP150) забезпечують «заякорювання» протеїн кінази A, активуючи її каталітичну субодиницю C, що супроводжується накопиченням вторинного месенджера цАМФ. Таким чином, заякорювальні протеїни забезпечують формування ензиматичних комплексів для інтеграції та поширення інформації у специфічних сайтах в межах клітини [75].

Термін «адаптерний протеїн» зазвичай використовують для білків із невеликою молекулярною масою молекули, що слугують зв'язуючим фактором для двох функціональних членів каталітичного шляху. Вони мають два домени, що залучені до білок-білкових взаємодій або використовують дві ділянки, що

складаються з 2-3 доменів. Першою ідентифікованою родиною адаптерних протеїнів стала родина SH2/SH3 домен-вмісних білків. Ця родина включає, наприклад, GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) і Crk та Crk-like протоонкогени. SH2 домен таких білків зв'язує специфічні фосфотирозинові залишки активованого рецептору або їхнього субстрату, в той час як SH3 домен зв'язується із багатими на пролін мотивами на наступних цільових білках. Зазвичай, білки цієї родини містять лише один SH2 домен, однак можуть мати кілька SH3 доменів [71,76].

1.3.2. Особливості будови та функцій адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Ruk/CIN85 належить до широко розповсюдженої родини адапторних молекул CIN85/CMS, що містять три SH3 домени, багатий на пролін регіон (N-кінець) та надспіралізований домен (C-кінець) [77]. Саме така структура характерна для людської ізоформи білку, що називається CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa), а в гризунів – Ruk (regulator of ubiquitous kinase) [78,79]. Порівняння послідовностей генів цих двох ізоформ виявило ідентичність між ними на рівні від 92% до 97% [77], саме тому в літературі для позначення цього адаптерного протеїну як в людини, так і в миші чи щура використовують назву Ruk/CIN85.

SH3 домени (SH3A, SH3B, SH3C) взаємодіють із багатими на пролін ділянками молекул-партнерів адаптера; багатий на пролін район в свою чергу є центром зв'язування для SH3 доменів молекул-партнерів; суперспіралізований домен бере участь у димеризації із іншими протеїнами, що містять такий самий домен [77]. SH3A та SH3B домени можуть утворювати «закриту» форму молекули адаптерного протеїну, взаємодіючи із збагаченим на пролін регіоном тієї ж молекули Ruk/CIN85, що унеможливорює подальшу взаємодію із потенційними зв'язувальними партнерами [80,81]. Більшість протеїнів, із якими

взаємодіє Ruk/CIN85, знаходяться на мембрані, або ж взаємодіють із цитоскелетом і регулюють внутрішньоклітинний сигналінг, організацію цитоскелету, адгезивність, везикулярний транспорт, апоптоз, клітинний цикл, дозрівання та сплайсинг РНК [82].

Ruk/CIN85 кодується геном *sh3kbp1* (SH3-domain kinase binding protein 1), що локалізований на Х хромосомі, який має 18 екзонів та експресується у всіх органах і тканинах людини з найвищим рівнем експресії у клітинах крові, лімфовузлах та жировій тканині [83,84]. Першою функцією, яка була описана для Ruk/CIN85, була участь в ендоцитозі та сортуванні активованих РТК. Власне, назва CIN85 походить з того, що вперше Ruk/CIN85 було ідентифіковано як протеїнового партнера убіквітин-лігази E3 Cbl [85]. В свою чергу назва Ruk походить від другої відомої функції адаптерного протеїні, а саме негативної регуляції активності фосфатидилінозитол-3-кінази (phosphoinositide 3-kinases, PI3K), за рахунок взаємодії з її регуляторною субодиницею p85 α [79]. Ruk/CIN85 також приймає активну участь у регуляції адгезії та міграції клітин. Показано, що він здатний безпосередньо взаємодіяти із молекулами, що беруть участь в організації актинового цитоскелету, а саме з F-актином [86], p130CAS (p130 CRK-associated substrate) [80], кортактином [87] та Cdk5-залежним білком Dab2 [88], а також із протеїном CAPZ, що відповідає за контроль клітинної міграції [89]. Також показаний вплив Ruk/CIN85 на процес фокальної адгезії, за рахунок його взаємодії із елементами комплексу фокальної адгезії FAK (focal adhesion kinase) та Pyk2, що сприяє процесу, та взаємодії із AIP1/ALIX, що навпаки пригнічує процес адгезії [90]. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 також залучений до регуляції апоптозу шляхом безпосередньої взаємодії із Src, що в подальшому сприяє більшій чутливості клітини до TNF α -опосередкованого апоптозу [91].

1.3.3. Функція адаптерних протеїнів у розвитку злоякісних пухлин.

Однією з причин розвитку злоякісної пухлини є порушення сигналювання в клітинах, що відповідає за проліферацію, контроль клітинного циклу, запуску запрограмованої смерті пошкодженої клітини, її рухливості та інвазивності. Адаптерні протеїни, як молекули які відіграють безпосередню роль у зв'язуванні ланок сигнальних шляхів, здатні потенційно впливати на процес канцерогенезу.

Деякі адаптерні протеїни взаємодіють із інтегринами, опосередковуючи залежне від них сигналювання. Прикладом таких протеїнів може слугувати p130CAS відомий також як BCAR1 (breast cancer antiestrogen resistance 1), що належить до білків родини Cas. Молекули родини інтегринів регулюють низку різноманітних клітинних функцій, що є ключовими для ініціації, прогресії та метастазування солідних пухлин, що робить їх перспективними цілями для лікування пухлин за допомогою антагоністів інтегринів (наприклад, цилентгїтид). І хоча інтегрини не мають власного кіназного домену, при взаємодії з молекулами позаклітинного матриксу відбувається накопичення та активація інших кіназ (FAK та Src family kinases, SFKs) разом із скаффолд протеїнами [92,93].

Протеїни родини Cas відомі як медіатори онкогенного сигналювання. SH3 консервативний домен білків цієї родини взаємодіє із пролін-багатими послідовностями, які характерні в тому числі для нерецепторної тирозинкінази FAK. FAK відіграє ключову роль у міграції клітин, координуючи формування ламелоподій та забезпечуючи фокальну адгезію у фібробластах. Підвищена активність FAK була зареєстрована у метастазах раку молочної залози, простати, товстої кишки та мозку [93]. p130CAS також зв'язується одночасно з SH2 та SH3 доменів Src кінази і таким чином забезпечує її активацію. Було показано, що надпродукція повнорозмірної форми CAS призводить до підсилення сигналювання опосередкованого кіназами родини Src [94,95]. Src кіназа приймає участь у різноманітних клітинних процесах, включаючи проліферацію,

диференціацію та апоптоз, а ген, що її кодує (*c-Src*), вважається протоонкогеном [96]. Для 50% випадків раку товстого кишечника, печінки молочної залози та підшлункової залози показана підвищена активність *Src* [97].

Порушення MAPK-кіназного сигнального шляху є характерною для трансформованих у злоякісні клітин. Цей шлях в клітині регулює процеси росту, проліферації, диференціювання, рухливості та апоптозу [98]. Одним з адаптерних протеїнів цього шляху є KSR1 (kinase suppressor of Ras 1). Цей адапторний білок регулює Ras-опосередковане сигналювання, зв'язуючи всі ланки Raf/MEK/ERK кіназного каскаду. KSR відіграє роль регулятора певних клітинних механізмів для сприяння клітинній проліферації та її виживання, включаючи процеси регулювання метаболізму та реініціацію клітинного циклу при репарації пошкодженої ДНК [99]. Показано, що підвищене продукування KSR1 призводить до посиленого Ras-сигналювання, що підвищує протоонкогенний статус клітини [100]. На прикладі клітин раку прямої кишки показали, що надпродукування KSR1 асоційована із підвищеною активацією Erk1/2 та здатністю клітин до виживання, а пригнічення експресії KSR1 супроводжувалось зниженням здатності пухлинних клітин формувати колонії в напіврідкому агарі, що свідчить про зниження їх трансформувального потенціалу, та до формування пухлин *in vivo* [101]. Функції KSR1 у клітині роблять його потенційною мішенню для лікування протипухлинними препаратами [99].

1.3.4. Роль Ruk/CIN85 у канцерогенезі. Наразі показано, що рівень експресії та/або вміст Ruk/CIN85 у пухлинних клітинах зростає у порівнянні із клітинами нормальної тканини. Так, наприклад, рівень експресії гену, що кодує Ruk/CIN85, у зразках карциноми молочної залози [102,103], шийки матки [104], простати [105], товстої кишки [106] вищий у порівнянні з нормальними

тканинами, причому його надекспресія корелює із високою інвазивністю пухлинних клітин та метастазуванням.

Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 вірогідно реалізує свій вплив у розвитку злоякісної пухлини опосередковано через стабілізацію HIF-1 α навіть за умов нормоксії, як це продемонстровано на прикладі клітин аденокарциноми молочної залози лінії MCF-7 із надпродукуванням Ruk/CIN85 [107]. HIF-1 α є однією із субодиниць транскрипційного фактору HIF-1, який контролює відповідь нормальних та злоякісних клітин на гіпоксію, регулюючи експресію низки генів, що відповідають за метаболізм клітини, ангіогенез, апоптоз, епітелійно-мезенхімний перехід та метастазування (наприклад, LOX, MMPs). Пухлинні клітини ж зазвичай в умовах *in vivo* перебувають саме у стані гіпоксії. За умов нормоксії субодиниця HIF-1 α гідроксильється пролілгідроксилазою та направляється на протеасомну деградацію, чого не відбувається за умов гіпоксії [108,109]. Ruk/CIN85 має здатність взаємодіяти із пролілгідроксилазою, що призводить до пригнічення її активності і, як наслідок, до підвищення стабільності HIF-1 α і активації залежних від цього фактора процесів [4]. Встановлено також, що Ruk/CIN85 індукує експресію інгібітора активатора плазміногену (plasminogen activator inhibitor, PAI1) за участі HIF-1 α , що вважається маркером несприятливого прогнозу у хворих зі злоякісною пухлиною молочної залози [107,110].

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальна частина дипломної роботи була виконана на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у відділі сигнальних механізмів клітини. Результати роботи є інтелектуальною власністю Інституту.

2.1. Характеристика дослідних клітин

Модель для дослідження впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на активність ключових ензимів, що залучені до процесу інвазії та метастазування клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 (ATCC CRL-2539) була створена на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна у відділі сигнальних механізмів клітини. Для виконання роботи були надані сублінії клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 з надпродукуванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (RukUp) та з пригніченою експресією Ruk/CIN85 (RukDown), а також відповідні контрольні сублінії Mock та Scr. Як додатковий контроль в серії експериментів були надані також вихідні клітини 4T1 WT (wild type). Клітини 4T1 є високоінвазивними клітинами аденокарциноми молочної залози миші, що використовуються для відтворення тваринної моделі раку молочної залози людини на IV стадії. Ці клітини є зручною моделлю для дослідження ракових пухлин, оскільки вони прості у культивуванні.

Сублінія RukUp була отримана шляхом кальцій-фосфатної трансфекції клітин 4T1 WT плазмідною pRc/CMV2-Rukl з подальшою селекцією за присутності селективного антибіотика та субклонування. Сублінію Mock було отримано за допомогою такої самої трансфекції, однак плазмідною pRc, що не

містила вставку. Селекція субліній проводилась за присутності селективного антибіотика G418.

Сублінія RukDown була отримана шляхом інфікування клітин 4T1 WT лентивірусом pLKO.1-shRuk/CIN85 R22, що містив специфічну до Ruk/CIN85 послідовність. Сублінію Scg отримували шляхом інфікування клітин 4T1 WT вірусом, що кодує shRNA, не специфічну до жодної послідовності геному ссавців. В подальшому сублінії піддавали селекції за присутності селективного антибіотика пуроміцину та субклонували.

2.2. Лізування клітин та визначення вмісту протеїнів у лізатах

Клітини лізували на льоду у буфері для лізису (50 мМ Тріс-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1 мМ ортованадат натрію, 50 мМ NaF, 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл пепстатину, 60 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину) протягом 20 хв із розрахунку 600 мкл буферу лізису на 1×10^7 клітин. Тритон-нерозчинну фракцію було осаджено за допомогою центрифугування при 10 000 g протягом 20 хв при 4°C. Супернатант в подальшому розділявся на дві аліквоти: для подальшого електрофретичного розділення та для вимірювання білків. Перша аліквота лізатів клітин прогрівалась за температури 95°C протягом 5 хв у буфері для зразків Леммлі (62,5 мМ Тріс-HCl, pH 6.8, 1 мМ ЕДТА, 2% ДСН, 5% β -меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0.4% бромфеноловий синій). Отримані лізати зберігались за температури не вище -70°C.

Вміст протеїнів в другій аліквоті визначали за допомогою комерційного набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). До 96-лункового планшету вносились стандартні зразки по 25 мкл бичачого сироваткового альбуміну у концентраціях 0 (дист. H₂O), 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5,

1, 2 мг/мл для побудови калібрувальної кривої. Зразки лізатів клітин, а також зразок лізуючого буферу розбавлялись дистильованою H_2O у кількості 22,5 мкл H_2O на 2,5 мкл зразка лізатів або лізуючого буферу. Після цього до кожної лунки додавали 200 мкл суміші реагенту А та реагенту В у пропорції 50:1 відповідно. Надалі зразки інкубували 30 хв за $37^{\circ}C$. Спектрофотометричне вимірювання проводили за допомогою спектрофотометра μ Quant (BioTEK, США) за довжини хвилі 562 нм.

2.3. Електрофорез протеїнів в ПААГ

Для приготування концентруючого (4,5%) та розділюючого (10%) протеїни поліакриламідного гелю (ПААГ) було використано наступні реактиви:

- Розчин мономерів «АА»: 30% акриламід/0,8% метиленбісакриламід;
- Буфер А для розділюючого гелю: 3М Тріс-НCl, рН 8.8;
- Буфер Б для концентруючого гелю: 0,5М Тріс-НCl, рН 6.8;
- 10% розчин додецилсульфату натрію (ДСН);
- 10% розчин персульфату амонію (АПС);
- Електродний буфер: 25 мМ Трис-НCl, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН.

Пропорції, що використовувались при приготуванні ПААГ, зазначені у таблиці 3.1.

Лізати вносили мікрошприцем на дно лунок концентруючого гелю із розрахунку 30 мкг протеїну на один трек. Білки розділяли електрофоретично за 10-20 мА (70-110 В).

Таблиця 3.1

Склад поліакриламідного гелю

Т, %	Буфер А, мл	Буфер Б, мл	АА 30%, мл	H ₂ O, мл	ДСН 10%, мл	ТЕМЕД, мкл	АПС 10%, мл	Об'єм гелю, мл
10	0,75	-	2	3,18	0,06	6	0,06	6
4,5	-	0,5	0,3	1,162	0,02	2	0,02	2

2.4. Вестерн-блот аналіз

Розділені електрофоретично протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану у буфері переносу (25 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол) протягом 90 хв при силі струму 250 мА.

Для блокування вільних центрів зв'язування мембрану інкубували у блокувальному розчині (5% знежирене сухе молоко, 1% Tween-20, PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, рН 7,4)) протягом години за кімнатної температури. Після цього мембрану інкубували із поліклональними антитілами до Ruk/CIN85 [111] протягом 12-16 годин за температури 4°C. Відповідні вторинні антитіла, кон'юговані із пероксидазою хрому (IgG (Promega)), використовували в розведенні 1:3000. Після інкубування мембрани протягом 45 хв за кімнатної температури, імунореактивні смуги виявляли за допомогою комерційного набору для підсиленої хемілюмінесценції ECL (enhanced chemiluminescence kit) (Amersham Pharmacia Biotech). Експозиція

мембран на рентгенівській плівці тривала 1-15 хв, що залежало від інтенсивності хемілюмінісценції. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику і фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, <http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.1/>).

2.5. Дослідження інвазивного потенціалу клітин *in vitro* за допомогою модифікованої камери Бойдена

Інвазивність клітин оцінювали за допомогою модифікованої камери Бойдена для 24-лункових планшетів, що містила напівпроникну мембрану з порами розміром 8 μm (Greiner Bio-One, Австрія). Із зовнішнього боку мембрану покривали Матригелем (0,3 мг/мл, BD Biosciences), після чого у верхню камеру висівали 3×10^4 клітин у 300 мкл середовища RPMI 1640 (Gibco®), що містило 0,1% FCS (fetal calf serum, HyClone). У нижню камеру додавали 600 мкл середовища RPMI 1640, що містило 10% FCS. Планшети інкубувались протягом 24 годин, після чого мембрани промивали фосфатним буфером. Надалі клітини, що промігрували на нижню сторону мембрани, фіксували 4% параформальдегідом і фарбували 0,4% кристалічним фіолетовим. Після цього фотографували принаймні 10 полів зору за збільшення 400x і обраховували середню кількість клітин на поле зору.

2.6. Отримання цитоплазматичних екстрактів

Клітини, які досягли 70-80% конфлюенту, екстрагували гіпотонічним буфером (0,4% NP-40, 10 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl,

1 мМ ортованадат натрію, 5 мМ бензамідину, 1 мМ PMSF, 10 мкл/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину, 1 мкл/мл пепстатину) протягом 15 хв на льоду із розрахунку 600 мкл буферу лізису на 1×10^7 клітин. Клітинний екстракт зішкрябували, обережно піпетували та переносили в мікропробірки об'ємом 1,5 мл. Зразки двічі заморожували/розморожували у рідкому азоті, після чого піпетували та центрифугували при 3000 g протягом 15 хв при 4°C. Супернатант переносили у чисті мікропробірки та центрифугували при 14000 g протягом 30 хв при 4 °C. Отримані лізати зберігались за температури не вище -70°C. В отриманих супернатантах, які використовували як цитоплазматичні екстракти, визначали концентрацію протеїну для подальшого аналізу ензиматичних активностей.

2.7. Визначення активності MMP-2 та MMP-9 за допомогою желатинової зимографії

Ензиматичну активність матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 оцінювали методом желатинової зимографії. Клітини висівали у 6 см чашки Петрі у середовищі RPMI 1640, що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FCS, HyClone), 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну. Клітини культивували до досягнення ними 75% конфлюенту, після чого середовище на 24 год замінювали на RPMI 1640, що містило 0,1% FCS. Кондиційоване середовище концентрували за допомогою приладу Concentrator Plus (Eppendorf, Німеччина), вимірювали концентрацію протеїну і змішували з невідновлюваним буфером Леммлі (62,5 мМ Трис-HCl, рН 6.8, 1 мМ EDTA, 2% ДСН, 10% гліцерин, 0.4% бромфеноловий синій). Отримані зразки зберігали за температури -20°C. Зразки наносили на 10% ПААГ, що містив 1 мг/мл желатину (Sigma-Aldrich) з розрахунку 100 мкг протеїну на трек, і електрофоретично

розділяли за максимальної напруги 80 В. Після електрофорезу гель відмивали від ДСН (додецил-сульфат натрію) розчином 2,5% Тритону X-100, після чого інкубували в реакційному буфері (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 5 мМ CaCl₂, 1 мМ ZnCl₂) протягом 24 год за температури 37°C. Гель фарбували 0,5% барвником Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich). Інтенсивність світлих смуг, що відповідає активності MMP, оцінювали за допомогою програмного забезпечення Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, <http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.1/>).

2.8. Оцінка активності амінооксидаз

Активність чутливої до семікарбазиду амінооксидази (SSAO), діамінооксидази (DAO) і поліамінооксидази (PAO) в цитоплазматичних екстрактах та активність лізилоксидази (LOX) в кондиціонованому середовищі визначали, використовуючи детекцію утвореного в реакції перекису водню, і активності виражали в мкмоль H₂O₂/хв/мг білку [112].

До проведення ензиматичних реакцій з DAO, SSAO, PAO здійснювали преінкубацію 30 мкл цитоплазматичного екстракту з концентрацією загального білку близько 2 мг/мл з відповідними інгібіторами при струшуванні 20 хв за 37°C після цього проводили інкубацію з відповідним складом реакційної суміші протягом 30 хв за тих самих умов. Контрольні проби містили таку ж саму кількість цитоплазматичного екстракту та буферний розчин. Реакцію зупиняли додавання холодного 30% ZnSO₄ в кількості 10% від загального об'єму реакційної суміші або контрольної проби. Далі зразки центрифугували за 5000 g протягом 10 зв. В супернатантах визначали кількість H₂O₂. Кількість утвореного в ході ферментативної реакції перексиду водню визначали за різницею між

дослідною та контрольною пробами. Одна одиниця активності відповідала 1 мкмоль H_2O_2 , утвореного за 1 хв в присутності 1 мг протеїну.

Преінкубаційний розчин для вимірювання активності DAO: 3,2 мкл 3,4 мМ паргіліну (інгібітор моноамінооксидаз) та 3,2 мкл 0,5 мМ дифеніленіодоніуму (інгібітор поліамінооксидази). Реакційна суміш для вимірювання активності DAO: 100 мкл буферного розчину (10 мМ Tris/HCl, pH 7,2), 16 мкл 10 мМ NaN_3 (інгібітор каталази та пероксидаз), 8 мкл субстрату 2 мМ путресцину.

Преінкубаційний розчин для вимірювання активності SSAO: 3 мкл 3,4 мМ паргіліну. Реакційна суміш для вимірювання активності SSAO: 95 мкл буферного розчину (10 мМ Tris/HCl, pH 7,2), 16 мкл 10 мМ NaN_3 інгібітору каталази та пероксидаз, 16 мкл субстрату 10 мМ метиламіну.

Преінкубаційний розчин для вимірювання активності PAO: 3 мкл 3,4 мМ паргіліну та 4,7 мкл 11 мМ семікарбазиду. Реакційна суміш для вимірювання активності PAO: 100 мкл буферного розчину (10 мМ Tris/HCl, pH 7,2), 16 мкл 10 мМ NaN_3 , 6,4 мкл субстрату 2,5 мМ сперміну.

Реакційна суміш для вимірювання активності LOX: 175 мкл 0,05 мМ Na-боратний буферу pH 8,4, який містив 1,2 М сечовину, 25 мкл 10 мМ NaN_3 та 30 мкл 13 мМ кадаверину.

Детекція пероксиду водню проводилась флуориметричним методом з використанням окисної деградації фолієвої кислоти за допомогою приладу FL×800 («BioTek», США) в чорних плашках [113]. В комірку додавали 140 мкл Na-фосфатного буферу pH 7,4, 20 мкл 0,2 мМ розчину CuCl_2 , 20 мкл контрольної або дослідної проби та 20 мкл 0,1 мМ фолієвої кислоти. Через 45 хв вимірювали кількість утвореного перекису водню при довжині хвилі збудження/емісії

360/460 нм. Для розрахунків перекису водню використовували калібрувальну криву.

2.9. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica (StatSoft, <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>). Всі результати описані у вигляді середнього значення та стандартної похибки. Попарні порівняння здійснювали за допомогою непараметричного тесту Манна-Уїтні для незалежних малих вибірок з нерівними дисперсіями. Різницю між групами вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у сублініях клітин

Визначення вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у сублініях клітин проводилось за допомогою вестерн-блот аналізу із використанням поліклональних кролячих антитіл проти SH3A домену. Також використовували мишачі моноклональні антитіла проти β -актину з метою нормалізації кількості протеїну, який було внесено у кожну лунку поліакриламідного гелю. Було показано статистично достовірний вищий вміст Ruk/CIN85 у сублінії RukUp у порівнянні із контрольною сублінією Mock. Вміст Ruk/CIN85 у сублінії RukDown достовірно знижувався у порівнянні із контрольною сублінією Scr. Вміст адаптерного протеїну у контрольній групі WT не відрізнявся від такого у групах Mock та Scr. (рис. 3.1).

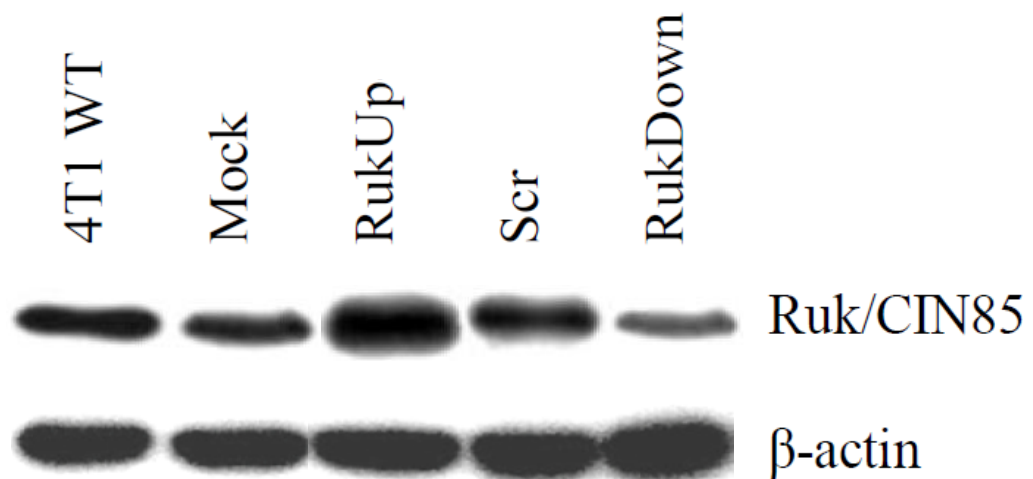


Рис. 3.1. Вміст адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у сублініях клітин аденокарциноми миші лінії 4T1.

Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 складається з трьох SH3 доменів: SH3A, SH3B, SH3C, що характерно для найдовшої ізоформи цього білку в людини [77]. Кодується Ruk/CIN85 геном *sh3kbp1*, що локалізований на X хромосомі, як в людей, так і в гризунів. Особливістю цього гену є те, що з 18 екзонів шляхом альтернативного сплайсингу можуть утворюватись 9 транскриптів, два з яких є некодуючими, оскільки не містять відкритої рамки зчитування, а інші 7 відрізняються між собою за довжиною та вмістом екзонів [83]. В цій роботі в подальшому будуть розглядатись функції саме повнорозмірної форми Ruk/CIN85, що кодується найдовшим транскриптом.

Ген *sh3kbp1* експресується у багатьох тканинах, а аналіз розподілу цього протеїну у клітині показав, що його різні ізоформи виявляються в цитоплазмі, а саме в асоціації з цитоскелетом, в ядрі та в асоціації з його мембраною, що є ознакою динамічного розподілу ізоформ Ruk/CIN85 між внутрішньоклітинними компартментами [84]. Наразі відомо, що зміни в рівні продукції адаптерного протеїну Ruk/CIN85 асоційовані із патологічними змінами в клітинах. Так було показано, що зростання продукції Ruk/CIN85 характерне для пухлинних клітин різної етіології, а також корелює із рівнем їх малігнізації [114]. Крім того, рядом авторів було продемонстровано зв'язок підвищеної експресії Ruk/CIN85 в стріатумі та чорній субстанції мозку із розвитком хвороби Паркінсона [115], а також що підвищена продукція Ruk/CIN85 є причиною нефропатії у пацієнтів із цукровим діабетом [116].

Таким чином, нами було показано, що встановлені сублінії клітин аденокарциноми миші лінії 4T1 дійсно мають підвищений/знижений рівень продукування адаптерного протеїну Ruk/CIN85, що може свідчити про посилення/послаблення патологічних властивостей клітин аденокарциноми миші лінії 4T1 відповідно.

3.2. З'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регуляції інвазивного потенціалу клітин лінії 4T1

Вплив білку Ruk/CIN85 на інвазивний потенціал клітин лінії 4T1 досліджували за допомогою тесту на інвазію у модифікованій камері Бойдена. У такій камері напівпроникна мембрана із діаметром пор 8 мкм вкрита Матригелем, що моделює позаклітинний матрикс. Після 24-годинної міграції клітин через мембрану з Матригелем, їх фіксують та зафарбовують кристалічним фіолетовим тільки ті клітини, що промігрували на внутрішній стороні вставки.

За результатами експерименту було показано, що сублінія клітин RukUp характеризується значно більшим інвазивним потенціалом у порівнянні із контролем. Щодо сублінії RukDown було продемонстровано знижений інвазивний потенціал клітин у порівнянні із контролем (рис. 3.2).

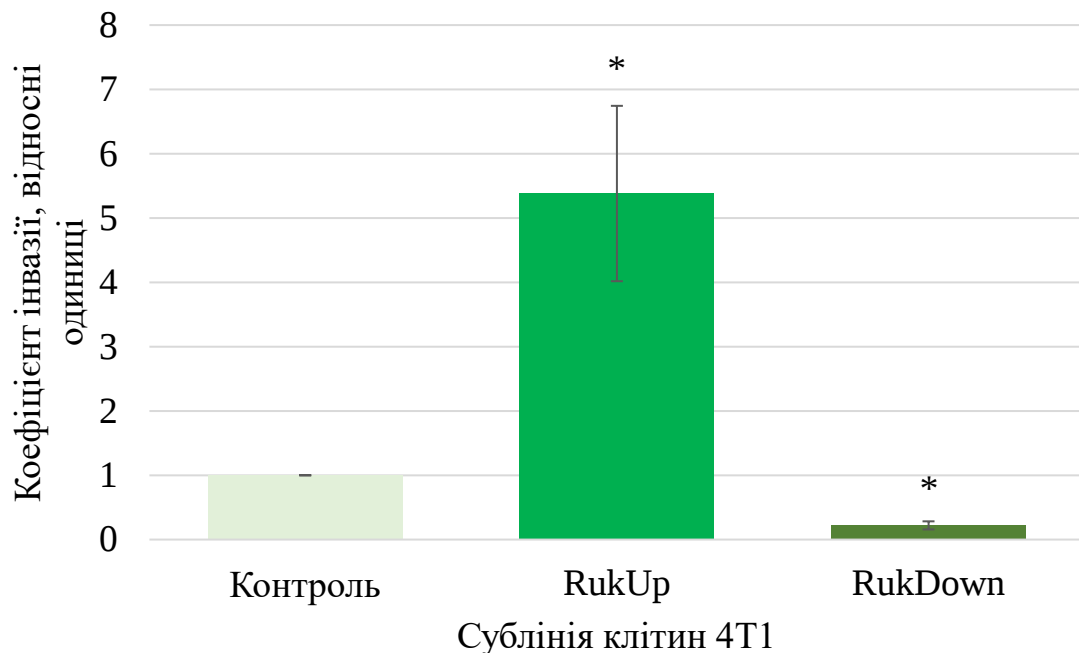


Рис. 3.2. Відносне значення інвазивності для субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$, $n = 4$.

можуть мати вищий метастатичний потенціал.

Отримані нами дані узгоджуються із даними, які були отримані іншими авторами на відмінних моделях. Так, наприклад, було показано, що надпродукування Ruk/CIN85 клітинами меланоми миші лінії B16 сприяє підвищенню їх інвазивності, а також метастатичного потенціалу [117].

Також іншими авторами продемонстровано, що пригнічення продукції адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах раку молочної залози людини лінії MDA-MB-231 призводить навпаки до зниження їх інвазивності через Матригель [103]. Ruk/CIN85 зв'язується із білками, що містяться в інвадоподіях – специфічних, забагачених актином, випинаннях цитоплазматичної мембрани, які приймають безпосередню участь у інвазії пухлинної клітини. З літературних джерел відомо, що комплекс ASAP1/AMAP1 із Ruk/CIN85 є необхідною умовою для інвазування клітин раку молочної залози людини лінії MDA-MB-231 [103]. При інвазивному раку молочної залози ASAP1/AMAP1 функціонує як важливий ефектор онкогенного сигналювання опосередкованого активацією EGFR, що ініціює біогенез інвадоподій, скоріше за все, за рахунок рекрутингу кортактину та паксиліну [114]. Ruk/CIN85 у цьому випадку є важливим компонентом для формування інвадоподій, оскільки є зв'язувальним партнером із E3 лігазою Cbl. Показано, що siРНК-опосередковане замовчування Ruk/CIN85 інгібує інвазію клітин первинної пухлини молочної залози лінії MDA-MB-231 [103].

Білки родини WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome protein) є важливими регуляторами полімеризації актину завдяки активації Arp2/3 комплексу. Активність білків WASP регулюється в свою чергу білками WIP (WASP interacting protein), одним з яких є білок WIRE, що зв'язується із WH1 доменом білка N-WASP [118]. Було продемонстровано, що протеїн WIRE є потенційним партнером для зв'язування із адаптерним протеїном Ruk/CIN85, що в свою чергу демонструє його можливий вплив на полімерацію актину через

WASP-опосередкований механізм організації актинового цитоскелету [82]. Виявлені також і інші компоненти інвадоподій, із якими Ruk/CIN85 потенційно може зв'язуватись – Tks4 і Dynamin 2 [112].

Існує припущення, що Ruk/CIN85 впливає на інвазивність ракових клітин шляхом регуляції роботи актинового скелету через взаємодію із F-актином та актин-зв'язувальними протеїнами. Ruk/CIN85 разом із спорідненим протеїном CD2AP/CMS сприяє зшиванню фібрилярного актину у пучки посередництвом зв'язування суптраспіралізованого домену із F-актином [80,86].

Крім цього, у процесі регуляції організації актинового цитоскелету, а таким чином і регуляції міграції та інвазії клітин, приймає участь багатий на пролін регіон адаптерного протеїну, який здатний зв'язуватись із такими молекулами, як p130CAS та кортактин, що є безпосередніми регуляторами організації мікротрубочок [80,87].

3.3. Визначення активності MMP-2 та MMP-9 в клітинах лінії 4T1

В основі контролю інвазивності та метастазування пухлинних клітин лежать процеси епітелійно-мезенхімного переходу (EMT/MET). Такий перехід є причиною набуття пухлинними клітинами рухливості, що означає втрату міжклітинних контактів та посилення позаклітинного протеолізу. Проте, за рахунок високої пластичності ракової клітини, вона може здійснювати перехід у амебоїдний стан, який характеризується втратою контактів із позаклітинним матриксом та пригніченням позаклітинного протеолізу [2]. У зв'язку з цим, було поставлено завдання визначити рівень активності матриксних металопротеїназ, головних протеолітичних ензимів позаклітинного простору, у кондиційованому

середовищі задля з'ясування можливого механізму інвазії клітин аденокарциноми миші лінії 4T1.

Після проведення оцінки желатиназної активності MMP-2 та MMP-9 у кондиційованому середовищі клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85, було показано, що активності вищезгаданих MMPs статистично достовірно знижуються у клітинах сублінії RukUp у порівнянні із значеннями для сублінії Mock. Також було встановлено, що активність MMP-2 та MMP-9 у клітинній сублінії RukDown зростає у порівнянні із сублінією Scr (рис. 3.3).

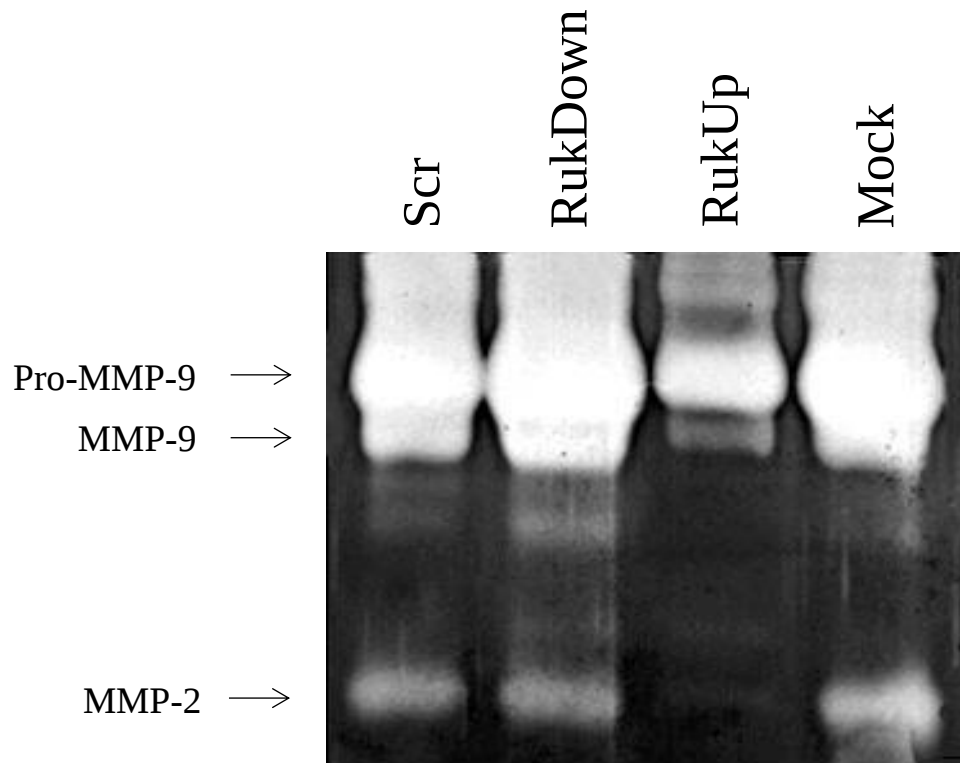


Рис. 3.3. Желатинова зимографія матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 у кондиційованому середовищі клітин лінії 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Родина матриксних протеїназ складається з різноманітних цинк-залежних ендопептидаз, що залучені до ремоделювання позаклітинного матриксу. MMPs залучені до різноманітних патологічних процесів, у тому числі до канцерогенезу, де їх активність відіграє ключову роль у рості злоякісної пухлини та у багатокрокових процесах інвазії та метастазування. MMPs розглядаються як важливі діагностичні та прогностичні маркери для пацієнтів із злоякісними новоутвореннями різних типів та різної стадії [119].

Чотири ключові особливості малігнізованих клітин, а саме міграція, інвазія, метастазування та ангіогенез, пов'язані із мікрооточенням клітини, критичними молекулами в якому являються саме MMPs, що забезпечують деградацію різноманітних молекул клітинної адгезії, модулюючи таким чином міжклітинні взаємодії та взаємодії клітини із ЕСМ [120]. Під час процесу інвазії за мезенхімним типом MMPs локалізуються у спеціалізованих поверхневих структурах клітини, що називаються інвадоподіями. Саме вони забезпечують активну деградацію протеїнів позаклітинного середовища. Серед MMPs, які локалізуються в інвадоподіях переважають MMP-2 та MMP-9, а також MMP-14 [121]. Надмірна експресія деяких MMPs, а саме MMP-2, -3, -9, -13, -14, асоціюється із епітелійно-мезенхімним переходом, під час якого відбувається пригнічення системи клітинної адгезії, втрата полярності клітини та набуття мезенхімного фенотипу із зниженою міжклітинною взаємодією та підвищеною здатністю до міграції [122]. Було показано, що взаємодія гіалуронана із його основним мембранним рецептором, CD44, призводить до активації сигнального каскаду, до якого залучені такі молекули, як Ras, Rho, PI-3 кінрази, що в подальшому призводить до посилення міграційних властивостей клітини за рахунок підвищеної експресії MMP-2 через Rho-опосередкований сигналінг [123].

Однак, отримані нами результати вказують на те, що клітини із підвищеним продукуванням Ruk/CIN85 в основному не залучають MMP-2 та MMP-9 з метою деградації позаклітинного матриксу. Таким чином, можна припустити, що ракові клітини із надекспресією Ruk/CIN85 використовують для інвазії та метастазування амебоїдний перехід, що характеризується вищою ефективністю, у порівнянні із мезенхімним [61].

Амебоїдний тип міграції характеризується циклами розширення і стиснення тіла клітини, опосередкованих кортикально локалізованими актином та міозином [124]. Пухлинні клітини, для яких характерний саме такий тип міграції, характеризуються округлою формою, а також тим, що здатні мігрувати у трьохвимірному матриксі в незалежності від того, чи залучають вони протеолітичні ензими для деградації екстрацелюлярного матриксу, чи ні. В такому випадку міграція відбувається не за рахунок ремоделювання та деградації протеїнів позаклітинного середовища, як при мезенхімному типі міграції, а за рахунок протиснення між волокнами ЕСМ [53,61,62]. Примітно те, що клітини із амебоїдним типом міграції мають знижену адгезивність до субстрату, а інтегрини замість того, щоб збиратись у кластери на мембрані, формуючи точки фокальної адгезії, розташовуються на ній дифузно. Це дозволяє таким клітинам значно «вигравати» у швидкості міграції у порівнянні із клітинами, що мігрують за мезенхімним типом. Так, для мезенхімного типу міграції характерна швидкість міграції у 3D-матриксі, що становить приблизно 0,1-0,5 мкм/хв, що, можна сказати, практично в 4 рази повільніше, аніж швидкість міграції малігнізованих клітин за амебоїдним типом, яка становить від 2 мкм/хв [2,59]. Організація актинового скелету у клітин, що мігрують за амебоїдним типом відрізняється від клітин із мезенхімним фенотипом таким чином, що в них замість утворення актинової сітки на лідируючому кінці клітини та стрес-фібрили по всьому тілі, утворюється скоротливий кортикальний актин. Рух клітини з амебоїдним

фенотипом забезпечується не псевдоподіями та філоподіями, як у випадку мезенхімних клітин, а відбувається за допомогою активного блебінгу – рух за допомогою специфічних вип'ячувань мембрани клітини [61].

Отже, надмірне продукування Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми миші лінії 4T1 призводить до набуття ними більш агресивного фенотипу, що характеризується активнішою міграцією та інвазією, а отже, потенційно і вищим ступенем метастатичності.

3.4. Оцінка активності амінооксидаз в клітинах аденокарциноми миші лінії 4T1 з різним вмістом білку Ruk/CIN85

Для амебоїдного фенотипу ракових клітин, окрім зменшеної активності MMPs характерне підвищення активності деяких амінооксидаз, зокрема лізилоксидази. Функція лізилоксидази у клітині, окрім іншого, полягає у сприянні створенню зшивок між молекулами колагену та еластину, що полегшує рух ракової клітини поміж волокнами екстрацелюлярного матриксу [125]. Аналіз активності лізилоксидази у кондиційованому середовищі у різних сублініях клітин лінії 4T1 показав, що активність лізилоксидази зростає у клітинах із надпродукуванням Ruk/CIN85 RukUp у порівнянні із контрольною групою Mock, в той час як для клітин RukDown не показано статистично достовірної різниці активності лізилоксидази порівнянно з контрольною сублінією Scr (рис. 3.4).

Лізилоксидаза – це позаклітинна купрум-вмісна амінооксидаза, що є каталізатором дезамінування залишків лізину та утворення ковалентних зшивок між основними протеїнами екстрацелюлярного матриксу – колагену та еластину [126].

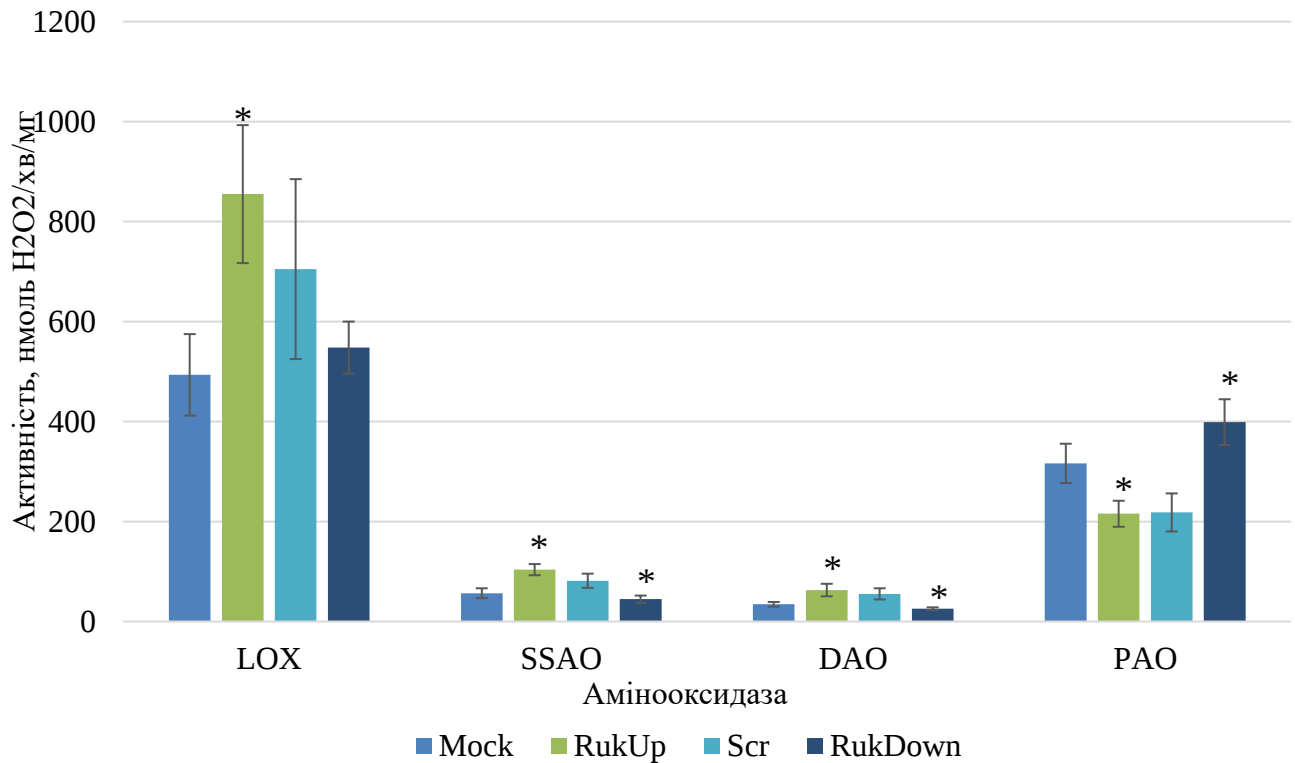


Рис. 3.4. Значення активності амінооксидаз у кондиційованому середовищі (LOX) та цитоплазматичних екстрактах (SSAO, DAO, PAO) клітин лінії 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. LOX – лізилоксидаза; SSAO – семікарбозид чутлива амінооксидаза; DAO – діамінооксидаза; PAO – поліамінооксидаза.

* - $p < 0,05$, $n=4$.

Згідно з багаточисленими експериментальними даними лізилоксидаза однозначно приймає участь у реалізації ракової програми перероджених клітин. Продемостровано, що високі рівні активності LOX, а також експресії гену, що її кодує, є прогностичним маркером несприятливого розвитку пухлини у пацієнтів із раком молочної залози [127], яєчників [128], простати [129], підшлункової залози [130]. З літературних джерел також відомо, що лізилоксидаза залучена до контролю ЕМТ, міграції та інвазії пухлинних клітин через активацію сигнальних

шляхів, що залежать від фокальної адгезії FAK та нерецепторної тирозинкінази Src [131,132]. Однак, у більш пізніх роботах різних авторів показано, що пропептид лізилоксидازی, що утворюється шляхом позаклітинного протеолізу проензиму, пригнічує ріст пухлин печінки [133], простати [134], молочної залози [135] та шлунку [32]. Було показано, що SH3 домен пропептиду може зв'язуватись із Ruk/CIN85, пригнічуючи при цьому індуковану ним інвазивність клітин [136]. Отже, лізилоксидаза та її пропептид мають різнонаправлений вплив на розвиток пухлинних клітин.

Аналіз активності інших амінооксидаз, а саме семікарбізид-чутливої амінооксидази (SSAO), діамінооксидази (DAO) та поліамінооксидази (PAO), у цитоплазматичних екстрактах клітин аденокарциноми миші лінії 4T1 із різним рівнем вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 показав статистично вірогідне підвищення активності SSAO та DAO, а також знижену активність PAO у групі RukUP, у порівнянні із контролем (рис. 3.4).

Чутливими до семікарбазиду амінооксидазами називають купрум вмісні амінооксидази, що містять карбонілову групу у кофакторі [30]. SSAO ензими каталізують окисне дезамінування первинних амінів із виділенням перикису водню, амонію та відповідного альдегіду. SSAO розглядається як прогностичний маркер розвитку злоякісних новоутворень у пацієнтів із колоректальним раком [137]. Також, підвищена активність чутливої до семікарбазиду амінооксидази спостерігалась у крові пацієнтів, які мали кісткові метастази раку простати (138). Експресія AOC3, амінооксидази із активністю SSAO, асоційована із подальшим прогнозом розвитку злоякісних пухлин у пацієнтів із астроцитомою, колоректальним раком [139] та раком шлунку [140].

Діамінооксидаза – це FAD-залежна амінооксидаза, що каталізує окисне дезамінування діамінів, головним чином гістаміну [28]. Концентрація DAO у

ракових клітинах може відображати їх метаболічний статус як функцію дозрівання [25]. DAO розглядається як біологічний маркер для відслідковування статусу проліферації клітин колоректального раку [141]. Підвищення активності DAO разом із аргіназою, що каталізує синтез орнітину із аргініну, спостерігався у пухлинній тканині простати у порівнянні із їх активністю у доброякісній гіперпластичній тканині простати [142]. Chanda та колеги продемонстрували, що утворення збільшеної кількості АФК за рахунок підвищеної активності DAO та РАО впливає на етіологію раку шийки матки та характерне для пацієнток із більш серйозними плоскоклітинними ураженнями [143]. Підвищення активності DAO також була виявлена у клітинах людських карцином яєчників, цервікального каналу та ендометрію, у порівнянні із прилеглими здоровими тканинами [144].

Поліаміноксидазами є ті амінооксидази, що містять FAD у якості простетичної групи та каталізують окиснення поліамінів у вторинних аміногрупах, а також приймають участь в інтерконверсійному метаболізмі поліамінів [30]. Показано, що активність РАО знижується завдяки інгібуванню росту клітин у відповідь на дію протиракового препарату етопозиду, а також у культурах ракових клітин по досягненню ними високої щільності [24]. Також було показано, що інгібування РАО у трансформованих гематопоетичних клітинах призводило до індукції їх апоптозу [145]. Використання інгібіторів РАО у комбінації із інгібітором орнітин декарбоксилази DFMO (α -difluoromethylornithine) показало позитивні результати у терапії ракових пухлин, у порівнянні із самотійним використанням DFMO [146].

Загалом, наведені вище приклади, показують, що амінооксидази можуть бути як потенційними терапевтичними мішенями для лікування злоякісних пухлин різної етіології, так і прогностичними маркерами, що у комбінації із визначенням Ruk/CIN85 можуть дати змогу більш точно та якісно передбачити потенційний шлях розвитку пухлин у пацієнтів із раковими захворюваннями.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Злоякісні утворення молочної залози є однією із перших причин смертності серед пацієнток із онкологічними захворюваннями. Основною причиною такого показника є утворення метастазів та набуття стійкості до лікування методом хіміотерапії. На сьогоднішній момент відомо, що саме епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) є рушійною силою метастазування пухлин. EMT характеризується зворотністю, втратою клітиною адгезивності та міжклітинних контактів, полярності, набуття специфічної морфології фібробластів та активацією протеолітичних ензимів, залучених до процесу ремоделювання позаклітинного матриксу. Внаслідок цих процесів відбувається зростання рухливості клітини та її здатності до активної міграції та інвазії [41]. У відповідь на індукцію EMT молекулами TGF- β , WNT, NOTCH, сигнальними шляхами, що залежать від рецепторної тирозин-кінази, інтегринами, цитокінами, гіпоксією у пухлинній клітині відбувається активація транскрипційних факторів SNAIL, TWIST і ZEB, що є регуляторами EMT [42]. Згадані транскрипційні фактори пригнічують експресію генів, що відповідають за епітеліальний фенотип, наприклад, ген Е-кадгерину, та активують експресію генів, що відповідають за мезенхімний фенотип, наприклад, ген віментину. Саме цей процес зумовлює зміни властивостей клітин злоякісних пухлин.

За типом міграції/інвазії клітини розрізняються на два типи: 1) ті, що мігрують за мезенхімним типом та 2) ті, що мігрують за амебоїдним типом. Перші мігрують за рахунок розщеплення компонентів позаклітинного матриксу, в той час як другі – за незалежним від деградації ЕСМ механізмом. Спосіб міграції клітини може змінюватись у відповідь на її мікрооточення [53]. На молекулярному рівні така зміна контролюється малими GTP-азами Rho, Rac та Cdc42 [61].

У зв'язку із визначальною роллю ЕМТ у метастазуванні злоякісних пухлин, існує нагальна потреба пошуку певних молекулярних мішеней, які б забезпечили впровадження нових терапевтичних стратегій для ефективного лікування раку грудної залози. Потенційними мішенями для такої терапії є різноманітні складові сигнальних мереж клітини, серед яких виділяють адаптерні протеїни.

Адаптерні протеїни – це протеїни, що мають мультидоменну будову, функція яких полягає в організації та локалізації сигнальних комплексів клітини, а також забезпечення їх активації. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa) містить три SH3 домени, багатий на пролін регіон (N-кінець) та надспіралізований домен (С-кінець) [114]. Завдяки взаємодії із широким спектром молекул-партнерів, Ruk/CIN85 приймає участь у різноманітних клітинних процесах, в тому числі в регуляції клітинної адгезії, інвазії та апоптозу [77]. Раніше було встановлено, що первинні пухлини молочної залози людини характеризуються підвищеним рівнем продукування Ruk/CIN85, порівняно із нормальною оточуючою тканиною. Особливо це спостерігалось в зонах інвазії та метастазування. Також було показано, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 корелює із пізніми стадіями розвитку пухлини і несприятливим прогнозом [3]. Однак, молекулярні механізми впливу цього адаптера на процеси міграції та інвазії вивчені на сьогодні не достатньо.

Для дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі інвазії злоякісних клітин нами було використано сублінії клітин аденокарциноми миші лінії 4T1 із підвищеною (сублінія RukUp) та зниженою (сублінія RukDown) продукцією Ruk/CIN85.

Дослідження інвазії клітин за допомогою модифікованої камери Бойдена показало, що за підвищеного вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 відбувається статистично достовірне зростання інвазивності клітин лінії 4T1

через Матригель, тоді як за зниженого вмісту Ruk/CIN85 інвазивність клітин пригнічується. Таким чином, нами показано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю інвазивності клітини.

Активність матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9, головних протеїнів, що відповідають за протелітичну деградацію позаклітинного матриксу, оцінювали методом желатинової зимографії. Було продемонстровано, що активність цих двох ензимів зростає в клітинах сублінії RukDown та знижується у клітинах сублінії RukUp. Також було виявлено достовірне зростання активності лізилоксидази у клітинах сублінії RukUp. Отримані результати дають підстави припустити, що клітини лінії 4T1 із надмірною продукцією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 характеризуються амебоїдним типом міграції, що є значно ефективнішим за мезенхімний тип і надає клітинам більш агресивний фенотип [61]. Дослідження активності інших амінооксидаз показав достовірне підвищення активності чутливої до семікарбазиду амінооксидази та діамінооксидази, а також достовірне зниження активності поліамінооксидази у сублінії клітин RukUp із одночасним зниженням та підвищенням відповідних ферментів у сублінії клітин RukDown. Разом ці результати демонструють залучення адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до регуляції обміну біогенних амінів, що виступають регуляторами клітинного циклу та запрограмованої смерті клітини [28], а також дозволяє розглядати визначення активності амінооксидаз у комплексі із вмістом Ruk/CIN85 у злоякісних клітинах у якості потенційного прогностичного маркера розвитку онкологічного новоутворення.

ВИСНОВКИ

1. Надпродукція адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 супроводжується підвищенням їх інвазивного потенціалу, одночасно з його зниженням за пригніченої продукції Ruk/CIN85;
2. Підвищена продукція адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 характеризується зниженням активності протеолітичних ферментів MMP-2 та MMP-9, тоді як за пригніченої продукції адаптера відбувалось підвищення їх активності;
3. У клітинах із надпродукуванням Ruk/CIN85 відбувалось достовірне підвищення лізилоксидази, чутливої до семікарбазиду амінооксидази та діамінооксидази, а також зниження поліамінооксидази. За пригніченої продукції адаптерного протеїну відбувалось зниження та підвищення активності відповідних ферментів;
4. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 приймає активну участь у контролі інвазивності клітин аденокарциноми миші лінії 4T1 шляхом регуляції епітелійно-мезенхімного переходу;
5. Ruk/CIN85, як самостійно, так і у комплексі із активністю амінооксидаз, потенційно може слугувати новим прогностичним маркером для пацієнток із злоякісними новоутвореннями молочної залози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):439–48.
2. Friedl P, Zänker KS, Bröcker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: Differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech.* 1998;43(5):369–78.
3. Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5818–23.
4. Kozlova N, Mennerich D, Samoylenko A, Dimova EY, Koivunen P, Biterova E, et al. The pro-oncogenic adaptor CIN85 acts as an inhibitory binding partner of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2. *Cancer Res.* 2019;79(16):4042–56.
5. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010;10(4):232–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2827>
6. Wilbur MA, Shih IM, Segars JH, Fader AN. Cancer Implications for Patients with Endometriosis. *Semin Reprod Med.* 2017;35(1):110–6.
7. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 2017;7(5):1016–36.
8. Epstein T, Gatenby RA, Brown JS. The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLoS One.* 2017;12(9):1–14.
9. Devic S. Warburg effect - a consequence or the cause of carcinogenesis? *J Cancer.* 2016;7(7):817–22.
10. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703–7.
11. O. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science* (80-).

1956;123(3191):309–14.

12. Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Saavedra E, Pardo JP, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S. Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014;50(1):10–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.01.025>

13. Pascual G, Domínguez D, Benitah SA. The contributions of cancer cell metabolism to metastasis. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(8).

14. Liberti M V, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016). *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016;41(3, SI):287. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778478><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4783224>

15. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate Patrick. *Cancer Cell*. 2012;21(3):297–308.

16. Boroughs LK, Deberardinis RJ, Cell N, Author B. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth HHS Public Access Author manuscript. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015;17(4):351–9. Available from: www.nature.com/reprints.

17. Madhukar NS, Warmoes MO, Locasale JW. Organization of enzyme concentration across the metabolic network in cancer cells. *PLoS One*. 2015;10(1):1–14.

18. Fu Y, Liu S, Yin S, Niu W, Xiong W, Tan M, et al. The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*. 2017;8(34):57813–25.

19. Kawaguchi M, Akagi M, Gray MJ, Liu W, Fan F, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1 β . *Surgery*. 2004;136(3):686–92.

20. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-

Hashim A, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res.* 2013;73(5):1524–35.

21. Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, et al. Spermine oxidation induced by *Helicobacter pylori* results in apoptosis and DNA damage: Implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(23):8521–5.

22. Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: Cause and cure. *BioEssays.* 2000;22(11):1007–17.

23. Romanenko AM. Apoptosis and cancer. *Arkh Patol.* 1996;58(3):18–23.

24. Wallace HM, Fraser A V., Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003;376(1):1–14.

25. Toninello A, Salvi M, Pietrangeli P, Mondovì B. Biogenic amines and apoptosis: Minireview article. *Amino Acids.* 2004;26(4):339–43.

26. Toninello A, Salvi M, Mondovì B. Interaction of Biologically Active Amines with Mitochondria and Their Role in the Mitochondrial-Mediated Pathway of Apoptosis. *Curr Med Chem.* 2012;11(17):2349–74.

27. Kunduzova OR, Bianchi P, Pizzinat N, Escourrou G, Seguelas MH, Parini A, et al. Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. *FASEB J.* 2002;16(9):1129–31.

28. Toninello A, Pietrangeli P, De Marchi U, Salvi M, Mondovì B. Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2006;1765(1):1–13.

29. Cha YJ, Jung WH, Koo JS. Site-specific expression of amine oxidases in breast cancer metastases. *Tumor Biol.* 2018;40(5):1–10.

30. Pietrangeli P, Mondovì B. Amine Oxidases and Tumors. *Neurotoxicology.* 2004;25(1–2):317–24.

31. Sarabia SF, Liehr JG. Induction of monoamine oxidase B by 17 β -estradiol in the hamster kidney preceding carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 1998;355(2):249–53.

32. Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, et al. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.* 2004;64(18):6410–5.
33. Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, et al. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(5):407–24.
34. Kostoro J, Chang SJ, Clark Lai YC, Wu CC, Chai CY, Kwan AL. Overexpression of vascular adhesion protein-1 is associated with poor prognosis of astrocytomas. *Apmis.* 2016;124(6):462–8.
35. Sun WY, Choi J, Cha YJ, Koo JS. Evaluation of the expression of amine oxidase proteins in breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):1–14.
36. Ward ST, Weston CJ, Shepherd EL, Hejmadi R, Ismail T, Adams DH. Evaluation of serum and tissue levels of VAP-1 in colorectal cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2183-7>
37. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010;8(5):629–42.
38. Biological E, Of P. Global sulfur technology review: John Zink. *Hydrocarb Eng.* 2004;9(4):46.
39. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442–54.
40. Nieto MA. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. *Science* (80-). 2013;342(6159).
41. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol.* 2017;11(1):28–39.
42. Craene B De, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013;13(2):97–110. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3447>

43. Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell* [Internet]. 2008;134(2):215–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3512574/pdf/nihms412481.pdf>
44. Lo H-W, Hsu S-C, Xia W, Cao X, Shih J-Y, Wei Y, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial- Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. *Cancer Res.* 2007;67(19):9066–76.
45. Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J.* 2006;394(2):449–57.
46. Fang X, Cai Y, Liu J, Wang Z, Wu Q, Zhang Z, et al. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene.* 2011;30(47):4707–20.
47. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117(7):927–39.
48. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1–2):15–33.
49. Huang RYJ, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelialmesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2012;125(19):4417–22.
50. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2):1–10.
51. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* [Internet]. 2011;145(7):1012–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>
52. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol Biol Cell.* 2011;22(24):4750–64.

53. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28(1–2):129–35.
54. Poincloux R, Collin O, Lizárraga F, Romao M, Debray M, Piel M, et al. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(5):1943–8.
55. Friedl P, Maaser K, Klein CE, Niggemann B, Krohne G, Zänker KS. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrins and CD44. *Cancer Res.* 1997;57(10):2061–70.
56. Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2010;22(5):690–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.020>
57. Lorentzen A, Bamber J, Sadok A, Elson-Schwab I, Marshall CJ. An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J Cell Sci.* 2011;124(8):1256–67.
58. Palecek SP, Loftust JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. Vol. 385, *Nature.* 1997. p. 537–40.
59. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes for tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(8):711–9.
60. Friedl P, Noble PB, Shields ED, Zänker KS. Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA^{high} and CD45RO^{high} CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in three-dimensional collagen lattices. *Immunology* [Internet]. 1994;82(4):617–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1414901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
61. Paňková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms

of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(1):63–71.

62. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and Myosin-Dependent Matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Curr Biol.* 2006;16(15):1515–23.

63. Parri M, Chiarugi P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal.* 2010;8:1–14.

64. Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, Marshall CJ. DOCK10-Mediated Cdc42 Activation Is Necessary for Amoeboid Invasion of Melanoma Cells. *Curr Biol.* 2008;18(19):1456–65.

65. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* (80-). 2003;302(5651):1704–9.

66. Scott JD, Pawson T. Cell communication: the inside story. Vol. 282, *Scientific American*. 2000. p. 72–9.

67. Pawson T. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):112–6.

68. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* (80-). 1997;278(5346):2075–80.

69. Huang L, Watanabe M, Chikamori M, Kido Y, Yamamoto T, Shibuya M, et al. Unique role of SNT-2/FRS2 β /FRS3 docking/adaptor protein for negative regulation in EGF receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Oncogene.* 2006;25(49):6457–66.

70. Villalobo A, Ishida H, Vogel HJ, Berchtold MW. Calmodulin as a protein linker and a regulator of adaptor/scaffold proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2018;1865(3):507–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.12.004>

71. Buday L, Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and

related molecules. *FEBS J.* 2010;277(21):4348–55.

72. Alexa A, Varga J, Reményi A. Scaffolds are “active” regulators of signaling modules. *FEBS J.* 2010;277(21):4376–82.

73. Shaw AS, Filbert EL. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(1):47–56.

74. Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. Docking proteins. *FEBS J.* 2010;277(21):4356–69.

75. Langeberg LK, Scott JD. A-kinase-anchoring proteins. *J Cell Sci.* 2005;118(15):3217–20.

76. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, et al. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell.* 1992;70(3):431–42.

77. Dikic I. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett.* 2002;529(1):110–5.

78. Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Letters140302 172..202. 2002;1–6. Available from: papers2://publication/uuid/ED05F248-C44B-4928-9ADC-624145FEF7DC

79. Gout I, Middleton G, Adu J, Ninkina NN, Drobot LB, Filonenko V, et al. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *EMBO J.* 2000;19(15):4015–25.

80. Tibaldi E V., Reinherz EL. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol.* 2003;15(3):313–29.

81. Kowanetz K, Szymkiewicz I, Haglund K, Kowanetz M, Husnjak K, Taylor JD, et al. Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39735–46.

82. Havrylov S, Rzhetsky Y, Malinowska A, Drobot L, Redowicz MJ.

Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome Sci.* 2009;7(21).

83. Buchman VL, Luke C, Borthwick EB, Gout I, Ninkina N. Organization of the mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene*. 2002;295(1):13–7.

84. Vynnytska-Myronovska BO, Bobak YP, Pasichnyk G V., Igumentseva NI, Samoylenko AA, Drobot LB. Multiple molecular forms of adaptor protein RUK/CIN85 specifically associate with different subcellular compartments in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Ukr Biochem J.* 2014;86(5):102–10.

85. Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(2):321–8.

86. Gaidos G, Soni S, Oswald DJ, Toselli PA, Kirsch KH. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *J Cell Sci.* 2007;120(14):2366–77.

87. Lynch DK, Winata SC, Lyons RJ, Hughes WE, Lehrbach GM, Wasinger V, et al. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2003;278(24):21805–13.

88. Sato Y, Taoka M, Sugiyama N, Kubo KI, Fuchigami T, Asada A, et al. Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5. *Genes to Cells.* 2007;12(12):1315–27.

89. Hutchingst NJ, Clarkson N, Chalkley R, Barclay AN, Brown MH. Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem.* 2003;278(25):22396–403.

90. Schmidt MHH, Chen B, Randazzo LM, Böglér O. SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci.* 2003;116(14):2845–55.

91. Narita T, Nishimura T, Yoshizaki K, Taniyama T. CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF- α -induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):256–64.
92. Jay S. Desgrosellier, Cherech DA. Integrins in cancer: biological implications in therapeutic opportunities. *Cancer, Nat Rev.* 2015;10(1):9–22.
93. Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. Fak alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol.* 2009;185(2):357–70.
94. Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, et al. Regulation of c-SRC Activity and Function by the Adapter Protein CAS. *Mol Cell Biol.* 2000;20(16):5865–78.
95. Brábek J, Constancio SS, Shin NY, Pozzi A, Weaver AM, Hanks SK. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene.* 2004;23(44):7406–15.
96. Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(3):122–8.
97. Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: The role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(2):263–74.
98. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279–90.
99. Neilsen BK, Frodyma DE, Lewis RE, Fisher KW. KSR as a therapeutic target for Ras-dependent cancers. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(5):499–509.
100. Kortum RL, Lewis RE. The Molecular Scaffold KSR1 Regulates the Proliferative and Oncogenic Potential of Cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24(10):4407–16.
101. Fisher KW, Das B, Kim HS, Clymer BK, Gehring D, Smith DR, et al. AMPK Promotes Aberrant PGC1 β Expression To Support Human Colon Tumor Cell Survival. *Mol Cell Biol.* 2015;35(22):3866–79.
102. Samoylenko A, Vynnytska-Myronovska B, Byts N, Kozlova N, Basaraba O, Pasichnyk G, et al. Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85

contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis*. 2012;33(10):1976–84.

103. Nam JM, Onodera Y, Mazaki Y, Miyoshi H, Hashimoto S, Sabe H. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J*. 2007;26(3):647–56.

104. Ma Y, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. Significance of PTPRZ1 and CIN85 expression in cervical carcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(3):699–704.

105. Yakymovych I, Yakymovych M, Zang G, Mu Y, Bergh A, Landström M, et al. CIN85 modulates TGF β signaling by promoting the presentation of TGF β receptors on the cell surface. *J Cell Biol*. 2015;210(2):319–32.

106. Cascio S, Finn OJ. Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in colon cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel)*. 2015;7(1):342–52.

107. Samoylenko A, Dimova EY, Kozlova N, Drobot L, Kietzmann T. The adaptor protein Ruk/CIN85 activates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression via hypoxia-inducible factor-1 α . *Thromb Haemost*. 2010;103(5):901–9.

108. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015;83.

109. Henze AT, Acker T. Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*. 2010;9(14):2821–35.

110. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, et al. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: Novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost*. 2004;91:450–6.

111. Mayevska O, Shuvayeva H, Igumentseva N, Havrylov S, Basaraba O, Bobak Y, et al. Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma. *Exp Oncol*. 2006;28(4):275–81.

112. Gudkova OO, Latyshko N V, Zaitseva O V, Shandrenko SG. Purification Procedure and assay for the activity of lysyl oxidase. *Ukr Biochem J*. 2018;90(5):98–105.

113. Hirakawa K. Fluorometry of hydrogen peroxide using oxidative decomposition of folic acid. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(2):244–8.
114. Havrylov S, Jolanta Redowicz M, Buchman VL. Emerging Roles of Ruk/CIN85 in Vesicle-Mediated Transport, Adhesion, Migration and Malignancy. *Traffic.* 2010;11(6):721–31.
115. Bian M, Yu M, Yang S, Gao H, Huang Y, Deng C, et al. Expression of Cbl-interacting protein of 85 kDa in MPTP mouse model of Parkinson's disease and 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(6):505–12.
116. Janina MD, Teng B, Schroder P, Schenk H, Staggs L, Tossidou I, et al. CIN85 deficiency prevents nephrin endocytosis and proteinuria in diabetes. *Diabetes.* 2016;65(12):3667–79.
117. Cascio S, Farkas AM, Hughey RP, Finn OJ. Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: The role of this novel complex in cancer cell invasion and migration. *Oncotarget.* 2013;4(10):1700–11.
118. Aspenström P. The WASP-binding protein WIRE has a role in the regulation of the actin filament system downstream of the platelet-derived growth factor receptor. *Exp Cell Res.* 2002;279(1):21–33.
119. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5287–97.
120. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011;278(1):16–27.
121. Weaver AM. Invadopodia: Specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2006;23(2):97–105.
122. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):265–

73.

123. Torre C, Wang SJ, Xia W, Bourguignon LYW. Reduction of hyaluronan-CD44-mediated growth, migration, and cisplatin resistance in head and neck cancer due to inhibition of Rho kinase and PI-3 kinase signaling. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2010;136(5):493–501.

124. Yumura S, Mori H, Fukui Y. Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* 1984;99(3):894–9.

125. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SFT, Nieva DRC, Sullivan CM, Edwards EM, et al. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res.* 2002;62(15):4478–83.

126. Csiszar K. Lysyl oxidases: A novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:1–32.

127. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res.* 2006;66(21):10238–41.

128. De Donato M, Petrillo M, Martinelli E, Filippetti F, Zannoni GF, Scambia G, et al. Uncovering the role of nuclear Lysyl oxidase (LOX) in advanced high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2017;146(1):170–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.05.001>

129. STEWART GD, GRAY K, PENNINGTON CJ, EDWARDS DR, RIDDICK ACP, ROSS JA, et al. Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score. *Oncol Rep.* 2008;20:1561–7.

130. Miller BW, Morton JP, Pinese M, Saturno G, Jamieson NB, McGhee E, et al. Targeting the LOX / hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy . *EMBO Mol Med.* 2015;7(8):1063–76.

131. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, Fukuoka T, Morisaki T, Masuda

G, et al. Lysyl oxidase is associated with the epithelial–mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric Cancer*. 2016;19(2):431–42.

132. Chen LC, Tu SH, Huang CS, Chen CS, Ho CT, Lin HW, et al. Human breast cancer cell metastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesion kinase and the paxillin-signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(3):989–1004.

133. Zheng Y, Wang X, Wang H, Yan W, Zhang Q, Chang X. Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance. *Oncol Rep*. 2014;31(4):1669–76.

134. Bais M V., Ozdener GB, Sonenshein GE, Trackman PC. Effects of Tumor Suppressor Lysyl Oxidase Propeptide on Prostate Cancer Xenograft Growth and Its Direct Interactions with DNA Repair Pathways. *Oncogene*. 2015;34(15):1928–37.

135. Ozdener GB, Bais M V., Trackman PC. Determination of cell uptake pathways for tumor inhibitor lysyl oxidase propeptide. *Mol Oncol*. 2016;10(1):1–23.

136. Sato S, Zhao Y, Imai M, Simister PC, Feller SM, Trackman PC, et al. Inhibition of CIN85-Mediated Invasion by a Novel SH3 Domain Binding Motif in the Lysyl Oxidase Propeptide. *PLoS One*. 2013;8(10).

137. Pannecoeck R, Serruys D, Benmeridja L, Delanghe JR, Van Geel N, Speeckaert R, et al. Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(6):284–300.

138. Ekblom J, Grönvall J, Lennernäst B, Nilsson S, Garpenstrand H, Orelund L. Elevated activity of semicarbazide-sensitive amine oxidase in blood from patients with skeletal metastases of prostate cancer. *Clin Sci*. 1999;97(1):111–5.

139. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Kawamoto A, Kusunoki M. Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): Decreased serum levels in progression of colorectal cancer and predictive marker of lymphatic and hepatic metastasis. *J Surg Oncol*. 2009;99(6):368–72.

140. Yasuda H, Toiyama Y, Ohi M, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. Serum

soluble vascular adhesion protein-1 is a valuable prognostic marker in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2011;103(7):695–9.

141. Rogers MS, Yim SF, Li KC, Wang CC, Arumanayagam M. Cervical intraepithelial neoplasia is associated with increased polyamine oxidase and diamine oxidase concentrations in cervical mucus. *Gynecol Oncol*. 2002;84(3):383–7.

142. Pretlow TP, Whitehurst GB, Pretlow TG, Harris BE, Whitehurst GB, Pretlow TG, et al. Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 1983;43(6):3008–12.

143. Chanda R, Ganguly AK. Diamine-oxidase activity and tissue di- and polyamine contents of human ovarian, cervical and endometrial carcinoma. *Cancer Lett*. 1995;89(1):23–8.

144. Dai H, Kramer DL, Yang C, Murti KG, Porter CW, Cleveland JL. The polyamine oxidase inhibitor MDL-72,527 selectively induces apoptosis of transformed hematopoietic cells through lysosomotropic effects. *Cancer Res*. 1999;59(19):4944–54.

145. Seiler N, Duranton B, Raul F. The polyamine oxidase inactivator MDL 72527. *Prog Drug Res*. 2002;59:1–40.