

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України  
академік НАН України

Михайло ТУКАЛО

(підпис)  
М.П.



## АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

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

«Молекулярні компоненти інвадоподій як прогностичні фактори злоякісних пухлин грудної залози людини»

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0021

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.01/0021 «Молекулярні компоненти інвадоподій як прогностичні фактори злоякісних пухлин грудної залози людини».

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства», протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21, про затвердження результатів конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства», переліку проєктів, що рекомендуються до реалізації за рахунок грантової підтримки Грантонадавача, та обсягів їх фінансування, рішення наукової ради Грантонадавача про надання гранту (протокол № 30 від «26» жовтня 2020 року), рішення наукової ради Грантонадавача про продовження надання грантової підтримки (протокол №39 від «21» грудня 2020 року) та про надання гранту у 2021 році (протокол №13 від «30» квітня 2021 року).

### 1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту

Початок – 27.10.2020

Закінчення – 15.12.2021

Загальна вартість Проєкту, грн. **8 740 600,00**

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 3 000 000,00

2-й рік 5 740 600,00

## **2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ**

до виконання Проєкту буде залучено 5 виконавців, з них:

доктори наук           1;  
кандидати наук        3;  
інші працівники       1.

1. Риндич А.В., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, зав. відділу, д.б.н., професор, член-кореспондент НАН України
2. Кропивко С.В. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, к.б.н., с.н.с.
3. Грязнова Т.А., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, к.б.н., с.н.с.
4. Паньківський С.В., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, к.б.н., н.с
5. Губернаторова А.О., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, аспірант.

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

Національна академія наук України  
Інститут молекулярної біології і генетики  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143  
тел/факс (044) 526 11 69, 200 03 56, факс 526 07 59

## **4. ОПИС ПРОЄКТУ**

### **4.1. Мета Проєкту**

Виявлення нових функціональних зв'язків компонентів інвадоподій – TKS4, TKS4b, WIP, а також CR16, та дослідження експресії їх генів у пухлинах грудної залози людини різних типів.

### **4.2. Основні завдання Проєкту**

Ідентифікація нових протеїнових партнерів WIP, CR16, TKS4 і TKS4b, картування ділянок взаємодії між ними та дослідження їх внутрішньоклітинної локалізації. Створення модельних клітин для дослідження впливу TKS4 та CR16 на процеси міграції, інвазії та везикулярного транспорту. Аналіз експресії генів *WIP*, *CR16*, *TKS4* і *TKS4b* в пухлинах грудної залози людини різних типів.

### **4.3. Детальний зміст Проєкту:**

- Сучасний стан проблеми

Однією з основних причин смертності від онкологічних захворювань є формування метастазів, що формуються завдяки інвадоподіям. В цьому проєкті досліджували їх ключові компоненти, до яких належать протеїни TKS4 та верпроліни, молекулярні механізми функціонування яких і досі повністю не з'ясовані.

- Новизна Проєкту

В ході реалізації проєкту встановлено, що відносний рівень експресії генів *WIP* та *TKS4* зростає в зразках пухлин грудної залози HER+ типу відносно умовно-здорових тканин. Розширено інтерактом *WIP*, *CR16* та *TKS4* серед протеїнів, які асоційовані з міграцією та інвазією клітин. Охарактеризовано локалізацію, посттрансляційні модифікації та функції в клітині протеїнів *CR16* та ізоформи *TKS4b*.

- Методологія дослідження

Експресію генів у пухлинах аналізували за допомогою кількісної ПЛР. Існування протеїнових комплексів в клітині виявляли за допомогою преципітації GST-злитих протеїнів, коімунопреципітації та імунофлуоресцентного аналізу. Використовуючи модельні клітинні лінії, отримані за допомогою технологій Flp-In та CRISPR/Cas9, досліджували функціональну роль протеїнів в клітині.

## 5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ:

Під час виконання 1 етапу 2020 року були виявлені нові взаємодії для *WIP* та *CR16* серед протеїнів, які залучені до міграційних та інвазивних процесів. Для цього були клоновані необхідні конструкції для експресії рекомбінантних протеїнів та створені модельні клітинні лінії зі стабільною надекспресією *TKS4b* за допомогою Flp-In технології (завдання 2 календарного плану на 2020 рік). В результаті проведених експериментів (завдання 1, 3 календарного плану на 2020 рік) було ідентифіковано шість нових протеїнових партнерів *WIP*: ендоцитозні протеїни амфіфізини (*AMPH1* та *BIN1*) та протеїни сигнальних каскадів – *CRK*, фосфоінозитол фосфоліпаза  $\gamma 1$  (*PLC\gamma 1*), *GRB2*, *SRC*. Крім того були картовані ділянки у структурі *WIP*, які опосередковують зв'язування з новими партнерами. Встановлено, що амінокислотні залишки 450-500 (*WBD*-домен) у структурі *WIP* є важливими для взаємодії з *BIN1*, тоді як амінокислотні залишки 216-450 необхідні для зв'язування *AMPH1* і *SRCn*. Цікаво, що *WIP* через *WBD*-домен може взаємодіяти як зі своїм конститутивним партнером – фактором нуклеації актину *N-WASP*, що призводить до утворення інвадоподій, так і з онкосупресором *BIN1*, функціональні наслідки чого потребують подальших досліджень.

Для верпроліна *CR16* та ключового протеїна інвадоподій *TKS4* було ідентифіковано вісім нових партнерів: *AMPH1*, *BIN1*, *CTTN*, *CRK*, *PLC\gamma 1*, *NCK1*, *NCK2*, *GRB2* та *SRC*, що вказує на їх потенційну роль в клатрин-опосередкованому ендоцитозі та передачі сигналів від рецепторів факторів росту. На відміну від *TKS4*, інша ізоформа цього гена – *TKS4b*, не взаємодіяла з жодним з перевірених протеїнів-партнерів, що може свідчити про суттєву відмінність у функціонуванні ізоформи *TKS4b* порівняно з *TKS4*. Таким чином всі індикатори виконання проєкту в 2020 році були виконані.

Під час виконання запланованих досліджень в рамках першого етапу 2021 року, було створено ще дві стабільні клітинні лінії: клітинна лінія 293 з надекспресією *CR16*, створена за допомогою Flp-In технології та клітинна лінія *MCF7* з нокаутом (вимкненням) гена *TKS4* за допомогою CRISPR/Cas9 технології редагування геному (завдання 2 та 5 календарного плану на 1 етап 2021 року).

Також вивчали участь та вплив *TKS4*, *TKS4b* та *CR16* везикулярний транспорт та клатрин-опосередкований ендоцитоз (завдання 8 та 9 календарного плану на 1 етап 2021 року). Участь верпроліна *WIP* в цих процесах показана нами раніше.

Отримані нами результати виявили, що CR16 співлокалізується з клатрин- та кавеолін-вмісними везикулами, з RAB4-позитивними везикулами та ендогенними металопротеїназами ММП-14 і ММП-9. Показано, що TKS4b співлокалізується з ММП-9, що свідчить про можливу участь цих протеїнів у транспорті металопротеїназ під час клітинної інвазії. Також було виявлено, що TKS4 та його ізоформа TKS4b не впливають на клатрин-опосередкований ендоцитоз та інтерналізацію рецепторів, асоційованих з мембраною, зокрема рецептор трансферину, проте показано, що TKS4b співлокалізується із інтерналізованим трансферином та ГТФазою RAB5, її ефектором EEA1, ГТФазою RAB4 та протеїном апарату Гольджі TGN38, вказуючи на зв'язок ізоформи TKS4b із везикулярним транспортом та сортуванням мембранних рецепторів у ракових клітинах.

Під час функціональних досліджень показано, що клітини з надекспресією CR16 або ізоформи TKS4b характеризуються підвищеним рівнем рухливості та збільшеним проліферативним потенціалом. Крім того TKS4b локалізується в інвадоподіях та співлокалізується з маркерами інвазивних структур – F-актином та кортактином, що вказує на участь TKS4b та CR16 в процесах міграції та інвазії (завдання 3, 6 та 7 календарного плану на 1 етап 2021 року).

Також нами було охарактеризовано особливості ізоформи TKS4b відносно TKS4. Так, було виявлено переважно ядерну локалізацію ізоформи, на відміну від TKS4, що переважно виявляється в цитоплазмі (завдання 4 календарного плану на 1 етап 2021 року), що може свідчити про участь TKS4b в ядерних процесах.

Заключним завданням 1 етапу 2021 року був аналіз фосфорилування за залишками тирозину протеїнів TKS4b і CR16 та його впливу на взаємодію з протеїновими партнерами (завдання 1 календарного плану на 1 етап 2021 року), оскільки було виявлено взаємодію цих протеїнів з тирозинкіназою SRC, яка є важливим активатором утворення інвадоподій. В результаті досліджень було виявлено фосфорилування ізоформи TKS4b, яке може залежати від стимуляції форболовим ефіром, який є активатором сигнальних шляхів, що індукують формування інвадоподій. Для протеїна CR16 показано, що він підлягає SRC-залежному фосфорилуванню, що сприяє його взаємодії з SH2-доменами адаптерних протеїнів NCK2 та CRK, кіназ ІТК, FGR та FYN, а також регуляторною субодиницею кінази Pi3K.

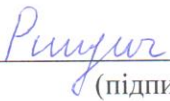
На останньому етапі проєкту (2 етап 2021 року) нами було заплановано створення колекції зразків тотальної РНК виділеної з пухлин раку грудної залози різних типів та навколопухлинних тканин (завдання 1 календарного плану на 2 етап 2021 року) та аналіз експресії генів *TKS4*, *WIP* та *CR16* (завдання 2 та 3 календарного плану на 2 етап 2021 року) в цих зразках. З Національного інституту раку було отримано 67 зразків пухлин раку грудної залози людини та навколопухлинних тканин, які було розділено на п'ять груп відповідно до типу: 14 з навколопухлинних тканин; 12 – пухлин тричі негативного типу; 13 – пухлин люмінального А типу; 11 – пухлин люмінального Б типу та 17 – пухлин HER2-збагаченого типу. На РНК виділеної з отриманих зразків проводили аналіз експресії генів *WIP*, *CR16*, *TKS4* та *TKS4b*. Показано, що відносний рівень експресії *WIP* та *TKS4* збільшується в зразках пухлин грудної залози HER2-збагаченого типу відносно умовно-здорових тканин, натомість, відносний рівень експресії *CR16* та *TKS4b* в проаналізованих зразках статистично достовірно не змінювався. Відповідно до цих результатів ми вважаємо, що гени *WIP* та *TKS4* можуть бути запропоновані як потенційні маркери раку грудної залози та додаткові маркерні гени для HER2-збагаченого типу. Таким чином всі індикатори виконання на 2 етап проєкту 2021 року та проєкту в цілому були виконані.

Результати проєкту будуть використані для розширення молекулярно-діагностичних панелей на основі нових прогностичних факторів *WIP* та *TKS4*, що дозволить точніше прогнозувати виникнення дистальних метастазів та рецидивів пухлин грудної залози. Крім того,

результати дослідження молекулярних механізмів інвазії злоякісних клітин, пов'язаних із функціонуванням протеїнів WIP, CR16, TKS4 та TKS4b, можуть бути використані для подальшого скринінгу нових потенційних мішеней хіміотерапевтичних агентів, спрямованих на інгібування інвадоподій. Створення специфічних інгібіторів для утворення інвазивних структур дозволить знизити метастатичний потенціал злоякісних клітин. Таким чином, отримані результати можуть бути використані у фундаментально-науковій, лабораторній, клінічній та фармацевтичній практиці для наукових досліджень, діагностики та лікування злоякісних пухлин грудної залози, ґрунтуючись на молекулярних механізмах формування інвадоподій.

### **Науковий керівник Проєкту**

Завідувач відділу функціональної геноміки  
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України  
д.б.н., професор, член-кор. НАН України  
Алла РИНДИЧ

  
\_\_\_\_\_  
(підпис)