УДК 577.2:616-006, 577.2
№ держреєстрації 0120U104548
Інв. №

Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики (ІМБГ)
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143
тел/факс (044) 526-11-69, 200-03-56, e-mail: inform@imbg.org.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор інституту молекулярної
біології і генетики НАН України,
д-р біол. наук, професор, академік НАНУ

_____ Михайло ТУКАЛО
«14» грудня 2021 р.

ЗВІТ
про науково-дослідну роботу
МОЛЕКУЛЯРНІ КОМПОНЕНТИ ІНВАДОПОДІЙ ЯК ПРОГНОСТИЧНІ ФАКТОРИ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»
(заключний)

Науковий керівник проєкту
д-р біол. наук, професор, чл.-кор. НАНУ _____ Алла РИНДИЧ
«14» грудня 2021 р.

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, протокол від «14» грудня 2021 р., № 15

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник проєкту:
Зав. відділу функціональної геноміки, д-р біол. наук, професор, чл.-кор. НАНУ

Риндич (підпис) 14.12.21 (дата) А.В. Риндич (Реферат, Вступ, Висновки)

Відповідальні виконавці:

Старш. наук. співроб., канд. біол. наук

(підпис) 14.12.21 (дата) С.В. Кропивко (Вступ; Розділ 1; підрозділи 2.1-2.10, 2.18-2.21; Висновки)

Старш. наук. співроб., канд. біол. наук

(підпис) 13.12.21 (дата) Т.А. Грязнова (Реферат; Розділ 1; підрозділи 2.11, 2.13, 2.14, 2.18, 2.20; Висновки)

Наук. співроб. канд. біол. наук

(підпис) 14.12.21 (дата) С. В. Паньківський (Вступ; Розділ 1; підрозділи 2.15-2.17, 2.21; Висновки)

Аспірант

(підпис) 13.12.21 (дата) А.О. Губернаторова (Реферат; Розділ 1, підрозділ 2.12, 2.18, 2.20-2.22; Висновки)

РЕФЕРАТ

Звіт про результати реалізації проєкту № 2020.01/0021: 93 с., 2 розділи, 39 рисунків, 2 таблиці, 48 джерел.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми функціонування компонентів інвадоподій – протеїнів родини TKS та верпролінів WIP і CR16.

Предмет дослідження – протеїн-протеїнові взаємодії, пост-трансляційні модифікації, роль в клітинних процесах ізоформ TKS4 та верпролінів WIP і CR16, а також експресію їх генів в зразках пухлин грудної залози людини.

Мета роботи – аналіз експресії генів та функціональна характеристика компонентів інвадоподій TKS4, TKS4b, WIP та CR16 як потенційних біомаркерів для оцінки метастатичного потенціалу пухлин грудної залози людини.

Методи дослідження – Вестерн-блот аналіз, коімунопреципітація, GST-преципітація, імунофлуоресцентний аналіз, аналіз інтерналізації трансферину, отримання стабільних клітинних ліній з використанням CRISPR/cas9 та Flp-In технологій, метод раневої поверхні, МТТ-тест, виділення тотальної РНК з пухлин грудної залози, аналіз експресії генів методом кількісного ПЛР в реальному часі.

Представники родин скафолдних протеїнів TKS та верпролінів відіграють важливу роль в клітинній інвазії, зокрема сприяють метастазуванню.

В результаті виконання проєкту були виявлені нові протеїнові партнери для TKS4, WIP та CR16 серед протеїнів, що асоційовані із злоякісною трансформацією клітин, визначені особливості функціонування ізоформи TKS4b та CR16 в клітинних процесах та показана підвищена експресія генів *WIP* та *TKS4* у зразках пухлин раку грудної залози людини HER2-збагаченого типу, що дає підстави запропонувати їх в якості діагностичних марекрів пухлин грудної залози.

Ключові слова: АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ, ІНВАЗИВНІСТЬ, ПУХЛИНИ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ, CR16, TKS4, TKS4b, WIP.

SUMMARY

Report on intermediate results of project № 2020.01/0021: 93 pp., 2 parts, 39 figures, 2 table, 48 sources.

The research object – mechanism of functioning of protein TKS4 isoforms (TKS4 and TKS4b) and verprolines WIP and CR16 as invadopodia components.

The research subject – protein-protein interactions, posttranslational modifications, and role of TKS4 isoforms and verprolines WIP and CR16 in cellular processes, as well as their expression in different breast cancer types.

The research aim – to analyze the expression levels and functionally characterize TKS4, TKS4b, WIP and CR16 as putative biomarkers for breast cancer tumors metastatic potential assessment.

Methods of research – Western blot analysis, co-immunoprecipitation, GST pull-down assay, immunofluorescence assay, transferrin internalization assay, stable cell lines generation via CRISPR/cas9 and Flp-In technologies, wound healing assay, MTT-test, total RNA extraction from breast cancer samples, RT-qPCR.

TKS family of scaffold proteins and verprolines play an important role in cell invasion, particularly, promote metastasis.

As a result of the project, we identified new protein partners for TKS4, WIP and CR16 among proteins associated with cell malignization; determined the peculiarities of TKS4b isoform and CR16 functioning in cellular processes and showed increased expression levels of *TKS4* and *WIP* genes in HER2-enriched breast cancer samples, which allows to offer them as potential biomarkers of breast cancer tumors.

Ключові слова: BREAST CANCER, CR16, GENE EXPRESSION ANALYSIS, INVASION, TKS4, TKS4b, WIP.

ЗМІСТ

ВСТУП 9
РОЗДІЛ 1 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ 16
1.1 Матеріали 16
1.2 Виділення тотальної РНК із зразків пухлин грудної залози людини 17
1.3 Електрофорез тотальної РНК в агарозному гелі 17
1.4 Видалення геномної ДНК із препаратів тотальної РНК за допомогою ДНКази І. 18
1.5 Синтез кДНК на препараті тотальної РНК 18
1.6 Аналіз експресії методом кількісної ПЛР в реальному часі 18
1.7 Обчислення результатів ПЛР в реальному часі 20
1.8 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 20
1.9 Культивування клітин ссавців 21
1.10 Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК 22
1.11 Створення модельних клітинних ліній з нокаутом гену *TKS4* 22
1.12 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією Myc-CR16 ... 23
1.13 Трансформація клітин плазмідною ДНК 24
1.14 Виділення плазмідної ДНК 24
1.15 Експресія рекомбінантних протеїнів в *E. coli* 25
1.16 Приготування бактеріальних лізатів 25
1.17 Преципітація протеїнових комплексів з використанням GST-злитих протеїнів. 25
1.18 Коімунопреципітація протеїнових комплексів 26
1.19 Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах . 26
1.20 Вестерн-блот аналіз 27
1.21 Аналіз швидкості міграції клітинних ліній T-REx-293 з надекспресією CR16 та TKS4b за методом раневої поверхні (скретч тест) 27

1.22 Дослідження рівня проліферації клітинних ліній T-REx-293 з надекспресією CR16 та TKS4b (MTT-тест) 28
1.23 Імунофлуоресцентний аналіз 28
1.24 Метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу 29
1.25 Аналіз колокалізації протеїнів 29
1.26 Аналіз інтерналізації трансферину 29
1.27 Створення плазмідних конструкцій 30
1.28 Статистична обробка даних 31
1.29 Комп'ютерний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей 31
РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА 32
2.1 Створення плазмідних конструкцій, експресія та очистка рекомбінантних протеїнів 32
2.2 Ідентифікація нових партнерів верпроліна WIP 32
2.3 Визначення мотивів протеїну WIP, що відповідають за зв'язування з новими партнерами 34
2.4 Перевірка взаємодії CR16 з протеїнами, залученими до міграційних та інвазивних процесів клітини 37
2.5 Ідентифікація нових партнерів адаптерного протеїна TKS4 39
2.6 Пошук нових взаємодій TKS4b 41
2.7 Дослідження посттрансляційних модифікацій TKS4b і CR16 та їх впливу на взаємодію з протеїновими партнерами 43
2.8 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією TKS4b за допомогою Flp-In технології 47
2.9 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією CR16 за допомогою Flp-In технології 49
2.10 Створення модельних клітинних ліній з нокаутом гену *TKS4* за допомогою CRISPR/Cas9 технології 50
2.11 Визначення локалізації CR16-вмісних протеїнових комплексів в клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MCF7 51

2.12 Дослідження рівня проліферації та міграції стабільних клітинних ліній, отриманих на основі модельних клітин T-REx-293 з надекспресією TKS4b або CR16 54
2.13 Дослідження особливостей внутрішньоклітинного розташування TKS4 та його ізоформи TKS4b у клітинах лінії MCF7 56
2.14 Дослідження локалізації протеїнів TKS4b та CR16 в інвадоподіях інвазивних клітин лінії MDA-MB-231 58
2.15 Дослідження впливу CR16 та TKS4b на везикулярний транспорт металопротеїназ 61
2.16 Аналіз впливу нокауту гена TKS4 на клатрин-опосередкований ендоцитоз у клітинах лінії MCF7 64
2.17 Виявлення співлокалізації між TKS4b, трансферином та маркерами ендосом… 67
2.18 Створення колекції тотальної РНК з пухлин грудної залози людини різних стадій злоякісності 72
2.20 Підбір праймерів та проб для ЗТ-ПЛР 77
2.21 Аналіз експресії ізоформ мРНК гена *TKS4* та *TKS4b* в різних типах пухлин та навколопухлинних тканинах 81
2.22 Аналіз експресії верпролінів *WIP* та *CR16* в пухлинах та навколопухлинних тканинах раку грудної залози 84
ВИСНОВКИ 86
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАНЬ 89

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

аз – амінокислотні залишки

ЗТ-ПЛР – зворотна транскрипція – полімеразна ланцюгова реакція

кДНК – ДНК-копія мРНК

ММП – матричні металопротеїнази

п.н. – пара нуклеотидів

КЛ – клітинний лізат

CR16 – протеїн, що реагує на кортикостероїди

TKS4 – протеїн субстрат для тирозинової SCR-кінази з чотирма SH3-доменами

TKS5 – протеїн субстрат для тирозинової SCR-кінази з п’ятьма SH3-доменами

WIP – протеїн, що взаємодіє з WASP

DMEM – модифіковане Дульбекко середовище Ігла

N-WASP – протеїн, асоційований із синдромом Віскота-Олдрича

PX-домен – домен, що взаємодіє із фосфоінозитидами мембрани

SH2-домен – Src-гомологічний домен 2

SH3-домен – Src-гомологічний домен 3

Src-кіназа – кіназа, асоційована із саркомою

TKS4 – протеїн субстрат для тирозинової SCR-кінази з чотирма SH3-доменами

TKS4b – TKS4 ізоформа b

WIP – протеїн, що взаємодіє з WASP

ПААГ – поліакриламідний гель

ECL – посилена хемілюмінесценція

GST – глутатіон-S-трансфераза

HA – гемаглютинін

PBS – забуферений фосфатом розчин

ВСТУП

Рак грудної залози є одним із найбільш розповсюджених видів онкозахворювань серед жінок. Відповідно до даних міжнародної агенції з дослідження раку, в 2020 році кількість випадків раку грудної залози у жінок склала 24,5% від загальної кількості випадків всіх видів раку, що складає 2,2 млн випадків, за останні ж п’ять років відсоток випадків захворювання збільшився до 30,3%, або більше 7,7 млн [1]. Своєчасна діагностика раку грудної залози із подальшою гістопатологічною та молекулярною класифікацією виявленої пухлини є необхідною умовою для правильного та ефективного лікування цього захворювання [2]. Сучасний стан терапії та прогнозування перебігу раку грудної залози є наслідком успішного впровадження в клінічну практику методів діагностики, які ґрунтуються на підходах персоніфікованої медицини, зокрема визначенні експресії високоспецифічних біомаркерів. Такі підходи є важливими для диференціації раку грудної залози, який є гетерогенним за своєю природою [2]. Тому, не зважаючи на значний прогрес, залишається відкритим питання своєчасного встановлення інвазивного підтипу злоякісно трансформованих клітин раку грудної залози. Детальне вивчення цього аспекту на фундаментальному рівні дозволить визначити критичні моменти перебігу захворювання та виявити специфічні біомаркери, асоційовані із відповідними клітинними процесами, що надалі покращить контроль за станом пацієнта під час терапії та після її закінчення.

Наразі, в клінічній діагностиці найбільш широко розповсюдженими маркерами метастазуючого раку грудної залози людини є ракові антигени CA15-3, CA27.29 та раково-ембріональний антиген (РЕА), тоді як онкомаркери, що використовуються для визначення базального або люмінального типу, включають рецептори естрогену, прогестерону та епідермального фактору росту (HER2). На відміну від зазначених онкомаркерів, які відображають рівень проліферації та міграції ракових клітин, наші дослідження спрямовані на пошук біомаркерів для прогнозування злоякісності пухлин грудної залози людини серед протеїнів, які

залучені до формування та функціонування інвадоподій, і які безпосередньо пов’язані із інвазією ракових клітин.

Клітинна інвазія відіграє центральну роль у різноманітних біологічних явищах та є основою онкологічного росту та метастазування. Подосоми та інвадоподії – це спеціалізовані мембранні структури, що представлені в клітинах з фізіологічною чи патологічною інвазивною поведінкою та локалізуються на вентральній поверхні клітини. Вони забезпечують клітинно-субстратну адгезію, викликають деградацію компонентів позаклітинного матриксу, і таким чином забезпечують міграцію та інвазію клітин в оточуючі тканини [3, 4]. Утворення інвадоподій із подальшою деградацією позаклітинного матриксу залежить від багатьох клітинних процесів, зокрема перебудов актинового цитоскелету, активації кінази Src, везикулярного транспорту та секреції металопротеїназ [5].

Зазначені процеси координуються або є асоційованими із функціонуванням скафолдних протеїнів, які виконують роль платформ для збірки мультипротеїнових комплексів, що модулюють відповідь клітини на стимули із оточуючого середовища і можуть активувати утворення інвазивних структур [6, 7]. Зокрема, до таких скафолдів належать верпроліни (WIP, WIRE і CR16) та протеїни родини TKS (TKS4 і TKS5).

Скафолдний протеїн TKS4 (tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains) є одним із ключових протеїнів інвадоподій [4]. Він бере участь в процесах полімеризації актину та формуванні вигинів мембрани. Відіграє головну роль на етапі дозрівання інвадоподій, оскільки разом з фактором нуклеації актину кортактином регулює секрецію та залучення мембранних металопротеїназ до сайтів формування інвазивних структур, що спричиняє деградацію позаклітинного матриксу, та забезпечує міграцію та інвазію клітин в оточуючі тканини [3]. Крім того, TKS4 функціонує як організатор оксидаз родини Nox і може сприяти активності оксидаз Nox1 та Nox3, що необхідно для формування інвадоподій в інвазивних ракових клітинах [8, 9]. Але, незважаючи на проведені дослідження, роль TKS4 вивчена досить слабко, наразі відомі лише деякі його партнери – кортактин, NoxA1, $p22^{phox}$, ADAM15 [8]. Тому подальше виявлення інтерактому

TKS4 та вивчення особливостей його експресії в нормі та в пухлинах грудної залози дасть можливість розширити існуючі знання про участь скафолдів у розвитку пухлин та у визначенні його ролі як прогностичного онкомаркеру.

Під час виконання проєкту було виявлено дев'ять протеїнових партнерів для TKS4, що беруть участь в процесах міграції та інвазії клітин. Було встановлено, що TKS4 формує комплекси з адаптерними протеїнами NCK1, NCK2, GRB2 та CRK, які відіграють важливу роль у сигнальних каскадах тирозинкіназ та передачі сигналу від рецепторів факторів росту, завдяки наявності у них SH2- та SH3-доменів [10; 11]. Ідентифіковано взаємодію TKS4 з фосфоінозитол фосфоліпазою Cγ1 (PLCγ1), яка належить до родини фосфоліпаз С та відіграє важливу роль у сигнальному каскаді Ca^{2+}. Оскільки процес формування інвадоподій тісно пов'язаний з процесами екзо- та ендоцитозу, за допомогою преципітації *in vitro* було показано взаємодію TKS4 з амфіфизинами AMPH і BIN1 – протеїнами, залученими до клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

В результаті альтернативного сплайсингу утворюється ізоформа TKS4 – TKS4b, яка характеризується відсутністю двох С-кінцевих доменів SH3. Хоча зазначена ізоформа зберігає здатність взаємодіяти із мембранами, на сьогодні роль цієї ізоформи у формуванні інвадоподій не відома. Тому на першому етапі проєкту в 2021 році нами було проаналізовано вплив ізоформи TKS4b на проліферацію, міграцію, везикулярний транспорт і клатрин-опосередкований ендоцитоз, а також проаналізовано її локалізацію в інвазивних та неінвазивних клітинах раку грудної залози. Було показано локалізацію ізоформи TKS4b в інвазивних структурах, що утворюють клітини лінії MDA-MB-231, та виявлено співлокалізацію TKS4b з маркерами інвадоподій (F-актином і кортактином) та металопртеїназою ММП-9. Отримані результати свідчать про потенційну участь ізоформи TKS4b в інвазивних процесах.

Вважається, що ключовими компонентами інвадоподій є скафолдні протеїни родини TKS, тирозинова протеїнкіназа SRC, трансмембранні матричні металопротеази та фактори нуклеації актину – кортактин та нейрональний протеїн синдрому Віскотта-Олдріча (N-WASP) [4]. Відомо, що N-WASP/Arp2/3-

опосередкована полімеризація актину є основою для утворення та росту інвадоподій. Стабільність, активність та локалізацію N-WASP в клітинах регулює пролін-збагачений протеїн WIP (WASP Interacting Protein*),* який є відомим маркером інвадоподій та належить до родини верпролінів, до якої також відносяться протеїни WIRE (WIP-related protein) та CR16 (Corticoid Regulated*)*. Протеїн WIP регулює перебудови актинового цитоскелету через взаємодії із факторами нуклеації актину – протеїнами N-WASP та кортактином [12]. WIP і його паралог WIRE стимулюють утворення інвадоподій та транспорт металопротеїнази ММП-14 до інвадоподій злоякісних клітин грудної залози, активуючи деградацію позаклітинного матриксу [13]. Протеїни родини верпролінів мають велику кількість пролін-збагаченних послідовностей, які є лігандами для SH3-вмісних протеїнів. Тому на попередніх етапах дослідження нами було виявлено взаємодію між WIP та іншими SH3-вмісних протеїнами, що асоційовані зі злоякісною трансформацією клітин, зокрема сигнальними протеїнами (CRK, PLCγ1, GRB2, SRC) та ендоцитозними протеїнами амфіфізинами (AMPH1 та BIN1). Для характеристики виявлених взаємодій було визначено мотиви протеїну WIP, які відповідають за зв’язування з партнерами. Так, було виявлено, що амінокислотні залишки 450-500 (WBD-домен) у структурі WIP є важливими для взаємодії з BIN1, який функціонує як онкосупресор та викликає Мус-залежний апоптоз [14]. За даними літератури взаємодія WIP з фактором нуклеації актину N-WASP також опосередковується через WBD-домен і є важливою для утворення інвадоподій. Порушення цієї взаємодії через надекспресію домену WBD інгібує інвадоподії у клітинах аденокарциноми MTLn3 щура [15]. Таким чином, протеїн WIP може взаємодіяти через WBD-домен як із протеїном N-WASP, що призводить до зростання метастатичного потенціалу клітин, так і з онкосупресором BIN1, що може перешкоджати зв’язуванню з N-WASP та призводити до протилежних функціональних наслідків. Таким чином, конкурентне зв’язування WIP з BIN1 може суттєво вплинути на стабільність N-WASP, що може призвести до дестабілізації актинових філаментів і вплинути на інвазивний потенціал клітини.

Протеїн CR16 є ще одним представником верпролінів, який експресується переважно в нервовій тканині, сім'яниках та яєчниках. В попередніх дослідженнях нами було виявлено експресію гена CR16 у тканинах раку грудної залози [16], а також взаємодію CR16 із сигнальними та ендоцитозними протеїнами, хоча роль CR16 в інвазивних процесах ракових клітин невідома. Тому під час виконання проєкту нами було проаналізовано локалізацію CR16-вмісних протеїнових комплексів в клітинах лінії MCF7 та інвазивних клітинах MDA-MB-231, а також досліджено виплив CR16 на проліферацію і міграцію клітин. Отримані дані виявили його часткову співлокалізацію з клатрин- та кавеолін-вмісними везикулами, а також з ендогенними металопротеїназами ММП-14 і ММП-9 та ГТФазою RAB4 яка є маркером рециркулюючих ендосом. Одержані результати дозволяють припустити участь CR16 у везикулярному транспорті металопротеїназ та регуляції RAB4-залежних сигнальних шляхів.

Важливим активатором утворення інвадоподій є тирозинкіназа SRC, яка є одним з ключових компонентів інвадоподій, залучена до різноманітних сигнальних каскадів клітини, і регулює транскрипцію генів, адгезію клітин, прогресію клітинного циклу, апоптоз та міграцію клітин [17]. Кіназа SRC регулює функції протеїнів, що модулюють перебудови актиновиих філаментів, зокрема скафолдних протеїнів, і регулює метастатичний потенціал клітин [18]. За даними літератури відомо, що TKS4 фосфорилюється кіназою SRC, в результаті чого змінюється його внутрішньоклітинна локалізація. Протеїн TKS4 має цитоплазматичне розташування, а у ракових інвазивних клітинах виявляється у місцях формування інвадоподій [19, 20]. Під час виконання проєкту було виявлено взаємодію *in vitro* між SRC-кіназою та протеїнами TKS4 і CR16. Нами також було проаналізовано вплив SRC -опосередкованого фосфорилювання протеїнів TKS4, TKS4b і CR16 на їх взаємодію із партнерами. Вперше показана можливість фосфорилювання TKS4 b і CR16 та встановлено, що фосфорилювання останнього забезпечує його взаємодію з SH2-доменами протеїнів, а саме: адаптерними протеїнами NCK2 та CRK, кіназами ITK, FGR та FYN, а також регуляторною субодиницею кінази Pi3K. Виявлено, що фосфорилювання ізоформи TKS4b може залежати від стимуляції

форболовим ефіром, який активує сигнальні шляхи, що індукують формування інвадоподій. Встановлено, що клітини з надекспресією ізоформи TKS4b або CR16 характеризуються підвищеним рівнем рухливості та збільшеним проліферативним потенціалом. Отримані результати свідчать про участь ізоформи TKS4b та CR16 у інвазивних процесах клітини.

Таким чином, виявлення складних мереж протеїнових взаємодій ізоформ TKS4 та верполінів, а також вивчення особливостей експресії їх генів в нормі та в пухлинах грудної залози, дасть можливість розширити існуючі знання про участь скафолдів і регуляторів перебудов актинового цитоскелету в клітинних процесах, в розвитку пухлин та у визначенні ролі TKS4, TKS4b, WIP та CR16 як прогностичних онкомаркерів.

За даними літератури рак грудної залози поділяють на 4 основні молекулярні типи за експресією рецепторів естрогену (ER), прогестерону (PR) та епідермального фактору росту 2 (HER2/neu). На цій класифікації базується основне визначення ступеню злоякісності пухлин та подальшого лікування. Проте багаторічні дослідження вказують на те, що навіть в межах одного типу існують різні підтипи [21]. Наприклад, тричі негативний тип, що характеризується відсутністю експресії ER, PR та низьким рівнем експресії HER2/neu, має щонайменше сім підтипів, серед яких три з несприятливим прогнозом, два – з проміжним та два – із сприятливим [21]. Кожний підтип характеризується експресією специфічних маркерних генів, кількість яких може сягати десятка та більше, тому останніми роками підвищилася кількість досліджень, спрямованих на персоналізований підхід до лікування раку грудної залози відповідно до експресії цих генів у кожного окремого пацієнта, що дозволяє покращити терапевтичний ефект. Своєчасна діагностика раку грудної залози із подальшою правильною гістопатологічною та молекулярною класифікацією виявленої пухлини є необхідною умовою для правильного та ефективного лікування. Тому дослідження з виявлення маркерних генів актуальні і зараз, адже попри значний прогрес залишається відкритим питання своєчасного встановлення діагнозу. Детальне вивчення процесів малігнізації на фундаментальному рівні дозволить

запропонувати маркери, асоційовані із відповідними клітинними процесами, що надалі може покращити якість спостереження за станом пацієнта під час терапії та після її закінчення та уникнути рецидивування.

За час виконання проєкту було проаналізовано експресію генів *TKS4*, *TKS4b*, *WIP* та *CR16* в зразках пухлин грудної залози людини різних типів. Було виявлено, що відносний рівень експресії *TKS4* та *WIP* змінюється в зразках HER2-збагаченого типу, тоді як відносний рівень експресії *TKS4b* та *CR16* достовірно не змінювався.

Таким чином, пошук нових потенційних маркерів інвазивності клітин раку грудної залози є необхідною передумовою для специфічної діагностики та високоефективного лікування. Гетерогенність раку грудної залози вказує на необхідність пошуку нових маркерів, асоційованих із метастазуванням клітин. Скафолдні протеїни TKS4, TKS4b, WIP та CR16 відіграють важливу роль в інвазивних процесах клітини, координуючи утворення інвадоподій, і тому є потенційними біомаркерами метастатичного потенціалу ракових клітин. Дослідження молекулярних механізмів функціонування зазначених скафолдних протеїнів є критичним для виявлення ключових клітинних процесів, перебіг яких сприяє міграції та інвазії клітин раку грудної залози.

РОЗДІЛ 1 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

1.1 Матеріали

В роботі використовували органічні та неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній «Fluka» (США), «Merck» (США), «Sigma-Aldrich» (США), «Bio-Rad» (США), «Amersham Pharmacia Biotech» (Великобританія), («Thermo Fisher Scientific» (США) або вітчизняні реактиви кваліфікації «хч» і «осч». Також використовували ферменти компанії «Thermo Fisher Scientific» (Литва): ендонуклеази рестрикції; інгибітор РНКаз RiboLock; ДНКаза I; ДНК полімераза DreamTaq DNA; зворотня транскриптаза RevertAid H Minus; РНКаза А та High Fidelity PCR Enzyme Mix. Суміш dNTP для проведення ПЛР було придбано у компанії «Thermo Fisher Scientific» (Литва). Для виділення тотальної РНК з зразків пухлин грудної залози людини використовували реагенти TRIzol® виробництва «Invitrogen» (США) та RNA Go виробництва «BioLabTech» (Україна). Використовували глутатіон-сефарозу 4B виробництва «GE Healthcare» (Великобританія), Protein A/G-агарозу «Santa Cruz Biotechnology» (США) та суміш інгібіторів протеаз «Roche» (Швейцірія). Набір для виділення ДНК із гелю «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» було придбано у компанії «Thermo Fisher Scientific» (США). Середовище для культивування ліній клітин ссавців (DMEM), ембріональну сироватку теляти (FBS) та поліетиленімін (ПЕІ) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (США).

В роботі використовували первинні антитіла: моноклональні антитіла анти-Omni D-8 (sc-7270), анти-Myc 9E10 (sc-40), анти-ММП-14 (C-7), анти-ММП-9 (2C3), анти-ММП-2 (8B4), анти-RAB5 (D-11), анти-EEA1 (G-4) були придбані в компанії «Santa-Cruz Biotechnology» (США). Моноклональні антитіла анти-β-актин, анти-НА (16B12), анти-кортактин 4F11 (p80/85) отримали у «Sigma» (США), «Covance» (США) та «Millipore» (США), відповідно. Поліклональні антитіла проти GFP були придбані в компанії «Santa-Cruz Biotechnology» (США). Поліклональні кролячі антитіла до TKS4 були отримані в «Merck»

(США). Кон'юговані з пероксидазою хрону вторинні антитіла проти імуноглобулінів кози, миші та кроля було придбано в компанії «Promega» (США). Вторинні антитіла вислюка проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 555 та Alexa Fluor 488; антитіла кози проти імуноглобулінів кроля, кон'юговані з Alexa Fluor 555 або Alexa Fluor 680; фалоїдин, кон'югований з Alexa Fluor 555; FITC-желатин (G13186) були придбані в компанії «Invitrogen» (США). Трансферин, кон'югований з Alexa Fluor 633, було отримано в «Sigma» (США).

У роботі було використано наступний біологічний матеріал. Клінічні зразки пухлин раку грудної залози та тканини пухлинного оточення були отримані в Національному інституті раку. Всі суб'єкти надали свою інформовану добровільну згоду. Також використовували лінії клітин людини 293 (клітини ембріональної нирки людини), T-REx-293 (лінія 293 із вбудованим сайтом рекомбінації), MCF-7 (неінвазивні клітини аденокарциноми грудної залози людини), MDA-MB-231 (інвазивні клітини раку грудної залози) та бактеріальні клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) «Novagen» (США) і XL1-Blue^{tet} «Stratagen» (США).

1.2 Виділення тотальної РНК із зразків пухлин грудної залози людини

Зразки пухлин заморожували в рідкому азоті відразу після операції в Національному інституті раку та зберігали при –70°С. Тотальну РНК виділяли гуанідинізотіоціонатним методом із використанням реагентів TRIzol («Invitrogen» США) або RNA Go («BioLabTech» Україна) відповідно до методик наданих виробниками.

1.3 Електрофорез тотальної РНК в агарозному гелі

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот протводили в 1,5% агарозному гелі при напрузі 5-10 В/см, використовуючи 1хТАЕ буфері (40мМ трис-ацетат, рН 8,3 та 1мМ ЕДТА), бромистий етидій в якості фарбника для візуалізації РНК та гліцериновий буферний розчин для нанесення зразків. Гель аналізували під

ультрафіолетовим опроміненням за допомогою приладу ChemiDoc XRS+ («BioRad» США).

1.4 Видалення геномної ДНК із препаратів тотальної РНК за допомогою ДНКази І.

Для остаточного видалення геномної ДНК, препарати тотальної РНК обробляли ДНКазою І («Fermentas»). 15 мкл реакційної суміші, яка містила 1-5 мкг тотальної РНК, 1,5 мкл 10хбуфера, 0,5 мкл інгібітора РНКази RiboLock (40 од./мкл) та 3 мкл ДНКази І (1 од./мкл) інкубували протягом 60 хв при $+37^0$С. Потім проводили інактивацію ДНКази І – додавали 1,5 мкл 50мМ ЕДТА та інкубували при $+65^0$С протягом 10 хв. Отриманий препарат РНК відразу використовували для синтезу кДНК.

1.5 Синтез кДНК на препараті тотальної РНК

Для отримання кДНК використовували метод зворотної транскрипції на препаратах тотальної РНК із пухлин грудної залози людини. Для цього в реакційну суміш, загальним об’ємом 20 мкл, вносили 1-5 мкг тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою І, праймер (Oligo dT_{15}) в кількості 100 мкМ, 4 мкл 5х буфера, 2 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл інгібітора РНКази RiboLock (40 од./мкл) та 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (50 од./мкл). Для денатурації РНК та приєднання до мРНК праймера Oligo dT_{15} проводили інкубацію препарату РНК з Oligo dT_{15} окремо від інших компонентів суміші при $+65^0$С протягом 10 хв. Потім додавали решту компонентів суміші та проводили синтез при $+42^0$С протягом 1-2 годин. Інактивацію ферментів проводили при $+65^0$С протягом 10 хв. Отриману кДНК розводили в два рази додаванням 20 мкл H_2O та зберігали при $–20^0$С.

1.6 Аналіз експресії методом кількісної ПЛР в реальному часі

ПЛР виконували з використанням праймерів та флюорисцентноміченого Taq-Man-зонду. ПЛР проводили в 25 мкл суміші, яка містила 0,2 мкМ кожного

специфічного праймера, 0,1 мкМ Taq-Man зонду, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,2 мМ dNTP, 2,5 од. DreamTaq ДНК-полімерази («Fermentas») та відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – $+95^0$C, 20 сек (в першому циклі – 2 хв); температура реасоціації праймерів – $+60^0$C, час реасоціації праймерів та синтезу об'єднували – 1 хв, протягом 50 циклів. ПЛР проводили на приладі CFX96 («Bio Rad»).

Праймери та зонди, які використовували для ПЛР:

qFor.*CR16*_1494 5'-AAACCATGCCAGAAGATTTA-3';

ProbeF *CR16*_1524 5'-(Hex)ATCCCCAGAAGCCGTACACC(BHQ1)-3';

qRev.*CR16*_1587 5'-GAATTTCTGCCTTTGATGTC-3';

qFor.*WIP*_1597 5'-AACTGGCAAGAAACGAAAGC-3';

ProbeF.*WIP*_1646 5'-(ROX)TGCTCCACCACTCCCTCCCATCCC(BHQ2)-3';

qRev.*WIP*_1673 5'-GAAGAGCAGGCAAAGATCAC-3';

qFor.*TKS4*_226 5'-CGGGTGCCCAACAAGCATTATGTCT-3';

ProbeF.*TKS4*_279 5'-(BHQ2)CTCCACCGAGGCCATTTACCGGCGCT(ROX)-3';

qRev.*TKS4*_352 5'-GGGTCCTTCTGTCCTCCTTCCAT-3';

qFor.*TKS4b*_1286 5'-AGTATTACACCATCGCCGAA-3';

ProbeF.*TKS4b*_1320 5'-(BHQ1)CCCAGACGGCATCAGCTTCC(Hex)-3';

qRev.*TKS4b*_1369 5'-GGGCTCTCCAAGTGAACATT-3';

qFor.*PUM1*_753-772 5'-AGTGGGGGACTAGGCGTTAG-3';

ProbeF.*PUM1*_802-826 5'-(BHQ1)CGGGCGATTCCTGTCTAAGAAAAGG(Hex)-3';

qRev.*PUM1*_842-864 5'-CGTTTTCATCACTGTCTGCATCC-3';

qFor.*TBP*_634-654 5'-GTGCCCGAAACGCCGAATATA-3';

ProbeF.*TBP*_655-676 5'-(BHQ1)ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGGT(FAM)-3';

qRev.*TBP*_708-688 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCTTA-3';

мРНК *TBP* та *PUM1* було використано в якості референсних генів.

Позиції нуклеотидів для праймерів відповідають кДНК з реєстраційними номерами GenBank: *TBP* – NM_006277; *PUM1* – NM_001020658.1; *TKS4* – NM_001017995; *TKS4b* – NM_001308175.1; *CR16* – NM_001080529 та *WIP* – NM_001077269.

1.7 Обчислення результатів ПЛР в реальному часі

Для обчислення результатів ПЛР використовували формулу: Exp = 2^(E_{ref} $^{-Ct(ref)}$–E_{target} $^{-Ct(target)}$), де E_{target} – ефективність ПЛР досліджуваного гена, E_{ref} – ефективність ПЛР референсного гена, $^{Ct(target)}$ – середнє значення циклів досліджуваного гена, $^{Ct(ref)}$ – середнє значення циклів референсного гена. Ефективність ПЛР визначали за допомогою методу серійних розведень. Для цього готували серію 10-кратних розведень (1:1-1:10000) кДНК, отримували значення Ct для кожного з них та будували калібрувальну криву. Всі вимірювання проводили в двох технічних повторах. На вісі абсцис відкладали логарифм ступеню розведення, на вісі ординат – середнє значення Ct. Після цього обраховували нахил кривої. Далі обчислювали ефективність ПЛР за формулою $E = (10^{\frac{1}{S}}-1)*100$, де E – ефективність ПЛР, S – нахил кривої Отримані значення ефективності підставляли у формулу обчислення результатів ПЛР в реальному часі. Значення циклів досліджуваного та референсного генів визначали за точкою перетину кривими їх ампліфікації порогового рівню флуоресценції (threshold), вище якого значення флуоресценції вважаються статистично значущими. Пороговий рівень встановлювався для всіх експериментів однаковим, на рівні 100 RFU. Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм OriginPro9.1 («OriginLab Corporation», США) з використанням критерію Манна-Уітні.

1.8 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

ПЛР проводили на приладі 2720 Thermal Cycler «Applied Biosystem» (США) з використанням набору реагентів High Fidelity PCR Enzyme Mix «Thermo Scientific» (США). Реакцію проводили в 25 або 50 мкл суміші, яка містила 1,5 мМ $MgCl_2$, 20 пмоль кожного праймера, 0,2 мМ dNTPs, 1,5 U полімерази згідно з протоколом до набору реагентів. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – 94°С, 40 сек (в першому циклі – 2 хв); температура реасоціації праймерів 56-58°С; синтез – 68-72°С та фінальна елонгація 7 хв. Умови проведення реакції визначали згідно з

рекомендаціями виробника набору реагентів в залежності від довжини очікуваного фрагменту ПЛР, температуру реасоціації праймерів визначали за допомогою програми Oligo7 (Molecular Biology Insights, Inc.).

Праймери, які використовували для ПЛР:

For.BIN1_1502 ccgggaattcggacctgcccccag;

Rev.BIN1 gcctcgagtcatgggaccctctcag;

For.SH3_1_NCK1(EcoRI) gagaattcgcagaagaagtggtgg;

Rev.SH3_1_NCK1(XhoI) tcctcgaggtttttcacaatagat;

For.SH3_2_NCK1(EcoRI) gggaattcctctatgacctcaaca;

Rev.SH3_2_NCK1(XhoI) acctcgaggactgtcaccttctt;

For.SH3_3_NCK1(EcoRI) ccgaattcctgggcaagtgttgca;

Rev.SH3_3_NCK1(XhoI) acctcgagttaatggattattctg;

For.SH3_1_NCK2(EcoRI) gagaattcaccgtgacagaagaag;

Rev.SH3_1_NCK2(XhoI) cgctcgagcccttcttcaggctgt;

For.SH3_2_NCK2(EcoRI) gcgaattccgcatctacgacctca;

Rev.SH3_2_NCK2(XhoI) agctcgaggactccgcagccgcct;

For.SH3_3_NCK2(EcoRI) aggaattccgc-gtgctgcatgtgg;

Rev.SH3_3_NCK2(XhoI) cgctcgaggca-gggcaggcccgtc;

For.CTTN(SH3)_EcoRI cccgaattccta-tcccgcagaggac;

Rev.CTTN aattaaccctcactaaaggg;

For.Grb2 tcgaattcgaagccatcgccaaa;

Rev.Grb2 ctctcgagttagacgttccggttca;

For.TKS4b(BamHI) cggggatcccgccgcggcgcagca;

Rev.TKS4b(BamHI) gcaaggatccgacgtggttctcac.

1.9 Культивування клітин ссавців

Клітини ліній 293, T-REx-293, MCF7 та MDA-MB-231 вирощували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), яке містило 10% ембріональну сироватку теляти (FBS), 4.6 г/л глюкози, 10 мкг/мл пеніциліну та 0.25 мкг/мл стрептоміцину, при +37°C та вмісті 5% CO_2. При досягнені клітинами 70-

80% стану конфлюентності, їх пересівали у нові культуральні чашки. Пасирування клітин проводили за допомою 0.05% трипсину з 0.053 мМ ЕДТА протягом 3-10 хв та переносили у нове середовище відповідно до рекомендацій банку клітинних ліній ATCC.

1.10 Трансфекція клітин ссавців плазмідною ДНК

Тимчасову трансфекцію еукаріотичних клітин проводили за допомогою поліетиленіміну (ПЕІ) або jetPEI® виробництва «Sigma» та «Polyplus-transfection SA» відповідно. Плазмідну ДНК та ПЕІ розчиняли окремо в 150 мМ NaCl, інкубували 5 хв, змішували рівні об'єми та інкубували протягом 15 хв. Утворений комплекс додавали в середовище до клітин з конфлюентностю 70-80%, які вирощували протягом наступних 24-36 год. Лізис клітин проводили в буфері для преципітації (20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин) з сумішшю інгібіторів протеаз «Roche»).

1.11 Створення модельних клітинних ліній з нокаутом гену *TKS4*

Для створення клітинної лінії з нокаутом гена *TKS4* використовували технологію CRISPR/Cas9. В нашій роботі було використано плазмідну конструкцію pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, яка кодує як Cas9, так і РНК-посередник, а також містить ген резистентності до антибіотика пуроміцина, для негативної селекції клітин, в яких не відбудеться нокаут гена-мішені. Для створення відповідної генно-інженерної конструкції, було клоновано 20-ти нуклеотидну послідовність ДНК, яка відповідає кодуючій послідовності гена *TKS4* у плазмідну конструкцію pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Для цього, згідно інструкції виробника, були підібрані ДНК праймери: For. *TKS4* 5' CACCgatgttggacaaatttccca 3' та Rev. *TKS4* 5'-AAACtgggaaatttgtccaacatc-3', що утворюють димер з липкими кінцями (для клонування по сайтам впізнавання ендонуклеази рестрикції BbsI), та гомологією до кодуючої послідовності гена *TKS4,* на 3'-кінці якої знаходився так званий ПАМ-сиквенс (PAM-sequence) – NGG, необхідний для роботи Cas9.

Сам процес клонування складався з наступних етапів. Праймери змішувалися, та оброблялися Т4 полінуклеотид кіназою, за для приєднання фосфатних груп до 5’-кінців праймерів. Після цього проводилася димеризація праймерів, із поступовим зниженням температури (на 1°С за 15 секунд) з 95 до 25°С. Далі, димер утворений з праймерів в рекомендованих співвідношеннях змішувався з плазмідною конструкцією pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, попередньо обробленою та очищеною ендоклеазою рестрикції BbsI. Фрагменти ДНК лігувалися за допомогою Т4 ДНК-лігази та трансформувалися у клітини *Escherichia coli* штаму Top10 («Invitrogen life technologies», США). Отримані клони перевірялися секвенуванням. В результаті була отримана плазмідна конструкція pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0-TKS4.

З використанням отриманої плазмідної конструкції була проведена трансфекція клітин MCF7 протягом 24 годин. Далі клітини інкубували з антибіотиком пуроміцином в концентрації 1,5-3 мкг/мл впродовж 24 год, після чого використане середовище замінювали на середовище без антибіотика. Через 1-2 тижні коли більшість клітин помирало, живі клітини розсівали на 96-лунковий планшет таким чином, щоб в кожну лунку потрапила одна клітина. Серед цих клонів обиралися 24 клони, які нарощувалися та перевірялися на наявність експресії TKS4 за допомогою вестерн-блот аналізу.

1.12 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією Myc-CR16

Клітини лінії T-REx-293 з індукованою надекспресією CR16 було створено за допомогою Flp-In технології «Invitrogen Life Technologies» (США). Для цього, на першому етапі, була отримана конструкція на основі плазмідного вектора pcDNA5/FRT/TO, що кодує CR16, злитий з Myc-тагом. Для клонування фрагменту ДНК, що кодує CR16-Myc, плазмідні вектори pcDNA5/FRT/TO та конструкція pRK5-CR16-Myc були оброблені рестриктазою BamHI. Потрібні фрагменти ДНК були очищені за допомогою виділення з гелю, змішані у відповідних пропорціях та ліговані за допомогою Т4 ДНК-лігази. Отримана лігазна суміш трансформована у клітини *Escherichia coli* штаму Top10 «Invitrogen Life Technologies», (США).

Клони pcDNA5/FRT/TO-CR16-Myc перевіряли рестриктазою EcoRI, яка мала розрізати конструкцію на три очікувані фрагменти ДНК розмірами 4414 п.н., 1511 п.н. та 879 п.н.

На наступному етапі отриману плазмідну конструкцію pcDNA5/FRT/TO-CR16-Myc котрансфікували разом з плазмідною конструкцією pOG44 в клітинній лінії Flp-In T-REx-293. Під час трансфекції відбувався синтез фермента ревертази з плазміди pOG44, що вбудовував отриману конструкцію в геном клітин по сайтам FRT, які присутні як в отриманій конструкції pcDNA5/FRT/TO-CR16-Myc, так і в клітинах-господарях Flp-In T-REx-293. Клітини, в яких трансфекція не відбулася, піддавалися негативній селекції за допомогою антибіотика Гігроміцина Б в концентрації 100-150 мкг на 1 мл поживного середовища з інкубацію впродовж 24 год. Після даного етапу середовище клітин змінювали на середовище без антибіотика. Впродовж 1-2 тижнів, раз на кілька днів, повторно змінювали поживне середовище, для вилучення мертвих клітин. Селекцію проводили 2-3 рази, до етапу, коли клітини стабільно виживали після додавання гігроміцину Б.

1.13 Трансформація клітин плазмідною ДНК

Аліквоту компетентних клітин *E. coli* розморожували при +4°С, після чого додавали плазмідну ДНК або лігазну суміш, об’єм яких не перевищував 5% від загального об’єму аліквоти. Клітини витримували у крижаній бані 15-30 хв, після чого проводили «тепловий шок» на водяній бані при +42°С протягом 2 хв с наступним охолодженням. Далі додавали 1 мл середовища LB і вирощували годину за температури +37°С. Клітини висівали чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB, 1,5% бактоагара) у присутності селективного антибіотика.

1.14 Виділення плазмідної ДНК

Плазмідну ДНК з малих об’ємів бактеріальної культури (1,5-3 мл середовища LB) виділяли методом лужного лізису. Виділення плазмідної ДНК з великих об’ємів бактеріальної культури (100 мл і більше поживного

середовища) проводили на колонках Tip-100 за допомогою набору Plasmid Midi Kit за стандартною методикою виробника «Qiagen» (США).

1.15 Експресія рекомбінантних протеїнів в *E. coli*

Експресію GST-злитих протеїнів проводили у клітинах *E. coli* (штам BL21-DE3), які вирощували в середовищі 2xYTA (0,5% NaCl, 1,6% бакто-триптон, 1% дріжджовий екстракт) в присутності селективних антибіотиків при +37°C та постійного перемішування при 120 об/хв. Експресію цільових протеїнів індукували додаванням ІПТГ до фінальної концентрації в поживному середовищі 1 мМ протягом 3-4 год.

1.16 Приготування бактеріальних лізатів

Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням протягом 7 хв при 5000 об/хв. Біомасу, що містить GST-злиті протеїни, ресуспендували в PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 1,8 мМ KH_2PO_4, pH 7,4) із додаванням 1% Тритон X-100 та інгібіторів протеаз «Complete protease inhibitor» («Roche»). Лізис бактеріальних клітин проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора шляхом обробки ультразвуком 20 кГц, 3 рази по 30 сек. Екстракт збирали центрифугуванням при 15000g протягом 15 хв. Лізати зберігали при температурі -70°C.

1.17 Преципітація протеїнових комплексів з використанням GST-злитих протеїнів

Для іммобілізації GST-злитих протеїнів на глутатіон-сефарозі сорбент двічі промивали буфером PBS, додавали лізат клітин, що експресували необхідний протеїн з GST-тагом або GST (контроль) та інкубували при перемішуванні одну годину при +4°C. Потім сорбент тричі промивали буфером для преципітації та після третьої промивки обережно видаляли супернатант. До відмитої глутатіон-сефарози додавали лізат культури еукаріотичних клітин або бактерій з індукованою експресією партнера та інкубували з ним при $+4^0$C

протягом ночі при перемішуванні. На наступному етапі сорбент промивали тричі, осаджували центрифугуванням при 2400 об/хв протягом 5 хв, супернатант видаляли. До зразку додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення (500 мМ Tris-HCl, 10% гліцерин, 1,2% ДСН, 1,2% β-меркаптоетанол, 0,1% бромфеноловий синій, pH 6,8), кип'ятили протягом 10 хв та розділяли протеїни за допомогою протеїнового електрофорезу в ПААГ. Гель фарбували за допомогою розчину (0,15% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% льодова оцтова кислота, 10% ізопропанол) або аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

1.18 Коімунопреципітація протеїнових комплексів

Лізати культури еукаріотичних клітин розморожували при +4°С, центифугували 15 хв при 13000 об/хв. До лізатів додавали 15 мкл 30% суспензії попередньо відмитої A/G-агарози («Santa Cruz Biotechnology»), відповідні антитіла (2-5 мкг) та інкубували 3 год при активному перемішуванні при +4°С. Агарозу промивали тричі буфером для імунопреципітації, осаджували центрифугуванням 500 g протягом 3 хв. Елюцію протеїнів проводили за допомогою буферу для нанесення Леммлі (150 мМ трис- HCl, pH 6,8, 2,5% гліцерин, 10% SDS, 3% β-меркаптоетанол, 0,5% бромфеноловий синий) при +95°С протягом 10 хв. Зразки зберігали при температурі -20°С.

1.19 Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Електрофоретичне розділення протеїнів у денатуруючих умовах проводили у камерах для вертикального електрофорезу за стандартною методикою. Для протеїнового електрофорезу використовували 4% концентруючий та розділяючий гелі концентрацією 7,5-15%. Для приготування розділяючого гелю змішували 30% розчин акриламіду (при співвідношенні акриламіду і біс-акриламіду – 29:1), dH_2O, 1,5 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 10% розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 мМ та 0,1% персульфат амонію. Полімеризація акриламіду ініціювалася додаванням 0,1% TEMED. Проводили

електрофорез в тріс-гліциновому буфері (195 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 0,1% ДСН) при фіксованій силі струму 20-30 мА.

1.20 Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення протеїнів в ПААГ за методом Леммлі, протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану в буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 год у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Великобританія). Після переносу мембрану фарбували понсо С або блокували протягом 1 год у розчині 5% знежиреного молока в TBST (20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100), щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 1 год та відмивали від первинних антитіл три рази по 5 хв. Після промивки мембрану інкубували протягом години в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою TBS-T.

Для хемолюмінісцентної детекції (ECL) змішували рівні об'єми розчину А (100 мМ Tris-HCl, pH8.5, 2,5 мМ люмінал, 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (100 мМ Tris-HCl, pH8,5, 0.023% H_2O_2) та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемолюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США). Інтенсивність сигналів обраховували, використовуючи програмне забезпечення ImageLab. Обробку даних здійснювали за допомогою програми OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation).

1.21 Аналіз швидкості міграції клітинних ліній T-REx-293 з надекспресією CR16 та TKS4b за методом раневої поверхні (скретч тест)

Скретч тест проводили в моношарі клітин Flp-In™ T-REx-293, що надекспресували відповідний ген, як контроль використовували клітини без надекспресії. Клітини нарощували до конфлюентності близько 80%, після цього відбирали середовище і робили подряпину. Далі чашку Петрі промивали буфером

PBS і заливали новим середовищем з доксицикліном для індукції досліджуваного протеїну. Подряпину фотографували під мікроскопом одразу після маніпуляцій та через 24 години. Фотографії аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

1.22 Дослідження рівня проліферації клітинних ліній T-REx-293 з надекспресією CR16 та TKS4b (MTT-тест)

Клітини висівали на 96-лункові планшети в кількості 500 клітин на лунку та культивували в присутності 10% сироватки протягом 24 або 48 год. Після цього середовище відбирали та додавали середовище без сироватки і MTT-реагент (MTT, Sigma, США) у кількості 10 мг/мл, потім інкубували 4 год при 37°C. Далі клітини лізували у розчині 89,4% DMSO, 0,6% оцтової кислоти, 10% SDS протягом 10 хв при 37°C та вимірювали оптичне поглинання при 490 нм.

1.23 Імунофлуоресцентний аналіз

Клітини ліній MCF7 та MDA-MB-231 висівали на покривні скельця за 24 год до фарбування або трансфекції. Далі клітини фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду в PBS при кімнатній температурі протягом 15 хв. Залишки формальдегіду відмивались тричі по 5 хв в PBS. Потім клітини блокували 2% розчином БСА в PBS-T (PBS із 0.2% Тритон X-100) протягом 30 хв. Клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні протягом 1 год, промивали тричі по 5 хв буфером PBS-T та додавали відповідні вторинні антитіла, мічені флуоресцентними мітками. Після 1 год інкубації клітини знову промивали буфером PBS-T. Фарбування ядер проводили за допомогою 1 мкг/мл DAPI протягом 2 хв. Далі препарат на скельцях полімеризували за допомогою середовища Mowiol («Sigma»). Отримані препарати аналізували за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії, використовуючи конфокальну систему Leica TCS SPE та інвертований мікроскоп DMi8 («Leica», Німеччина). Використовували масляний об’єктив 63×/1.30 та програмне забезпечення «Leica Application Suite X». Аналіз інтенсивності флуоресценції та

співлокалізації флуоресцентних сигналів пікселів вздовж ліній на мікрофотографіях проводили за допомогою програми «ImageJ 1.53e».

1.24 Метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу

Стерильні покривні 12-мм скельця інкубували 20 хв у розчині 0,5 мкг/мл полі-L-лізину («Sigma»), промивали PBS та фіксували розчином 0,5% глутарового альдегіду («Sigma») при кімнатній температурі. Після фіксації скельця промивали 3 рази PBS та наносили тонкий шар FITC-желатину («Invitrogen») на 10 хв, який використовували в якості позаклітинного матриксу. Скло з желатином промивали PBS тричі по 3хв та інкубували з розчином боргідриду натрію (5мг/мл) протягом 3 хв. Далі скельця промивали PBS з 0,2% Triton X-100, потім інкубували у середовищі DMEM протягом 1 год при +37°C та висівали на них інвазивні клітини лінії MDA-MB-231 (30 000-50 000 клітин на скло). Для утворення інвадоподій клітини ростили від 6 до 20 годин. Потім клітини фіксували розчином 4% формальдегіду, тричі промивали PBS з 0,2% Triton X-100 та проводили імунофлуоресцентне фарбування.

1.25 Аналіз колокалізації протеїнів

Для кількісної оцінки колокалізації між двома протеїнами використовували коефіцієнт кореляції Спірмена, який розраховували за допомогою плагіну колокалізації PSC (Pearson-Spearman correlation) з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.37c. Розрахунок коефіцієнту кореляції Спірмена проводили за всією площею клітини.

Графіки інтенсивності сигналу відображають інтенсивність флуоресценції для пікселів вздовж ліній 2,0-2,5 мкм, які були побудовані за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

1.26 Аналіз інтерналізації трансферину

Трансфіковані клітини лінії MCF7, що були вирощені на покривних скельцях, промивали двічі PBS та інкубували в середовищі DMEM, що не містить FBS, при

+37°C протягом 3 год. Потім клітини інкубували з трансферином, кон'югованим із Alexa Fluor 633 (50 мг/мл), протягом 30 хв при +37°C. Після інкубації клітини промивали два рази PBS, фіксували 4% формальдегідом та проводили імунофлуоресцентний аналіз, як описано вище.

Вимірювання інтенсивності флуоресценції інтерналізованого трансферину у клітинах проводили, як описано у [22]. На першому етапі, використовуючи зелений канал, визначали межі клітин, які експресували GFP-злиті протеїни. Далі у визначеній ділянці вимірювали тотальну інтенсивність флуоресценції червоного каналу (трансферин, мічений Alexa Fluor-633) та визначали її площу, використовуючи відповідний інструмент у програмі «ImageJ 1.53e». Також вимірювали середню фонову флуоресценцію щонайменше трьох ділянок зразка без клітин. Нормалізовану інтесивність флуоресценції на одиницю площі в клітині визначали за наступною формулою:

$$НІФК = \frac{ТІФК - (ПК \times СФІФ)}{ПК}, \quad (1)$$

де НІФК – нормалізована інтенсивність флуоресценції в клітині;

ТІФК – тотальна інтенсивність флуоресценції в клітині;

СФІФ – середня фонова інтенсивність флуоресценції;

ПК – площа клітини.

1.27 Створення плазмідних конструкцій

Фрагмент ДНК TKS4b був субклонований з плазмідної конструкції TKS4b-max в плазмідний вектор pEGFP-C2 за допомогою рестриктази BamHI. Рестрикційний аналіз отриманих клонів плазмідної конструкції TKS4b-GFP проводився рестриктазами Pvull та Avall.

Фрагмент ДНК TKS4 був субклонований з плазмідної конструкції flag-TKS4-wt в плазмідний вектор pEGFP-N1 рестриктазами EcoRl та Pstl. Рестрикційний аналіз отриманих клонів плазмідної конструкції TKS4-GFP проводився рестриктазами Ncol та Notl.

1.28 Статистична обробка даних

Всі дані наведено як середнє арифметичне значення ± стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення MS Excel («Microsoft»), OriginPro 9.1 («OriginLab Corporation», США) або «GraphPad Prism 5» («GraphPad Software», США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за W-критерієм Шапіро-Уілка. Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою t-тесту. Для порівняння трьох і більше вибірок проводили за допомогою One-Way ANOVA. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою критерію Манна-Уітні. Для порівняння трьох і більше вибірок використовували ANOVA з критерієм Краскела-Воліса. В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при $p<0.05$.

1.29 Комп’ютерний аналіз нуклеотидних та амінокислотних послідовностей

Всі нуклеотидні та амінокислотні послідовності були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації [23]. Аналіз послідовностей нуклеїнових кислот, отриманих за допомогою секвенування проводили за допомогою програми Chromas 1.55 («Technelysium LTD»). Аналіз послідовностей нуклеїнових кислот, проводили за допомогою пакетів програм Vector NTI 10 та DNAStar (DNAStar Inc). Дизайн праймерів проводили за допомогою програми Oligo 7 («Molecular Biology Insights, Inc.»).

РОЗДІЛ 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Створення плазмідних конструкцій, експресія та очистка рекомбінантних протеїнів

GST-злиті SH3-домени протеїнів ITSN1 та ITSN2, CRK, CSK, PLCγ1, SRC та SRCn, які потенційно можуть взаємодіяти із проліновими мотивами протеїнів родини TKS та верпролінів, GST-злиті SH2-домени протеїнів Pi3K-N, Pi3K-C, NCK1, NCK2, GRB2 та CRK, кінази ITK, FGR, FYN та ABL, які потенційно можуть взаємодіяти з фосфорильованими залишками тирозинів, а також конструкції, що кодують рекомбінантні протеїни WIP(аз 13-450), WIP(аз 13-215), WIP(аз 318-500), HA-WIP та Myc-CR16, були отримані співробітниками відділу раніше.

Для отримання GST-злитих SH3-доменів протеїнів CTTN, AMPH1, BIN1, NCK1, NCK2 та повнорозмірного протеїна GRB2, у вектор pGEX4T3 за допомогою ПЛР було клоновано кДНК відповідних SH3-доменів та протеїна GRB2.

Конструкцію, що несе рекомбінантний протеїн Omni-TKS4b, було створено за допомогою ПЛР з використанням кДНК, отриманої з аденоми молочної залози людини та наступної пари праймерів: for.TKS4b_Bam cggggatcccgccgcggcgcagca, rev.TKS4b_Bam gcaaggatccgacgtggttctcac та вбудовано у вектор, що містив Omni-таг pcDNA4/His MaxA за сайтом клонування BamHI.

Плазмідні конструкції, що кодують рекомбінантні протеїни GFP-SRC, GFP-клатрин, GFP-кавеолін 1, GFP-RAB4, GFP-RAB5, GFP-TGN38, GFP-TKS4 та GFP-TKS4b були переклоновані з наявних у відділі конструкцій у векторну плазміду pEGFP-C1 по наявним сайтам клонування.

2.2 Ідентифікація нових партнерів верпроліна WIP

Характерною рисою верпролінів, до яких відноситься WIP, є наявність пролін-збагачених мотивів, які забезпечують зв’язування з SH3-доменами протеїнів-партнерів. Тому для перевірки взаємодії WIP з новими потенційними партнерами були використані GST-злиті SH3-домени ендоцитозних протеїнів AMPH1 і BIN1,

адаптерних протеїнів CRK та GRB2, а також сигнальних протеїнів CSK, PLCγ1 та SRC. SRC характеризується наявністю двох ізоформ: повсюдно експресована SRC та нейрональна SRCn, що мають відмінності в їх SH3-доменах, тому в експериментах були використані обидві ізоформи.

Іммобілізовані на глутатіон-сефарозі GST-злиті SH3 домени інкубували з лізатами клітин 293, які експресували HA-WIP. У якості позитивного контролю для оцінки рівня зв'язування WIP з партнерами використовували SH3-домен кортактину (CTTN), взаємодія з яким була показана раніше [24]. У якості негативного контролю для оцінки чистоти зв'язування використовували GST. Після преципітації проводили ПААГ-електрофорез з наступним Вестерн-блот аналізом та детекцією моноклональними антитілами, специфічними до гемаглютиніну (анти-HA). Результати Вестерн-блот аналізу, представлені на рисунку 2.1, вказують на те, що WIP взаємодіє з SH3-доменами AMPH1, BIN1, GRB2, CRK, PLCγ1, SRC та SRCn.

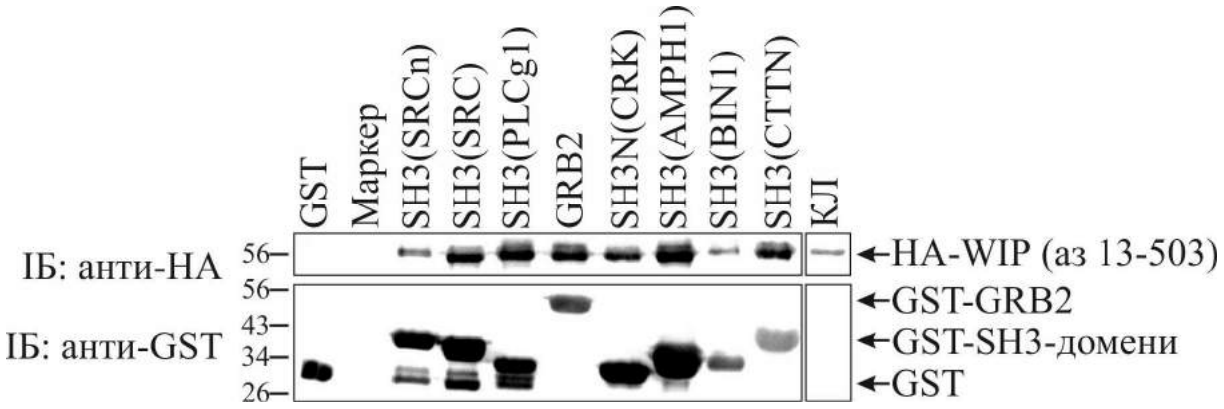

Рисунок 2.1 – Вестерн-блот аналіз преципітації WIP з SH3-доменами AMPH1, BIN1, CRK, PLCγ1, SRC, SRCn та повнорозмірним GRB2 за умов *in vitro*. Іммобілізовані на сорбенті протеїни, GST (контроль) або GST-злиті протеїни, інкубували з лізатом клітин 293, які експресували HA-WIP. Протеїн WIP та GST-злиті протеїни детектували за допомогою анти-HA і анти-GST антитілами відповідно. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Отже, ідентифіковано шість нових протеїнових партнерів для WIP серед протеїнів різних функціональних груп, а саме: ендоцитозних протеїнів AMPH1 і BIN1 та протеїнів сигнальних каскадів клітини – CRK, PLCγ1, GRB2, SRC.

Виявлені взаємодії можуть бути важливими для утворення інвадоподій, оскільки WIP є одним з ключових компонентів цих інвазивних структур. Надалі планується перевірити можливість існування комплексів між WIP та новими партнерами *in vivo* за допомогою коімупреципітації та імунофлуоресцентного аналізу у клітинах аденокарциноми грудної залози людини.

2.3 Визначення мотивів протеїну WIP, що відповідають за зв'язування з новими партнерами

Наступним завданням вивчення WIP було визначення у його структурі ділянок, які забезпечують взаємодію з виявленими партнерами. Доменна структура повнорозмірного WIP людини складається з N-кінцевого VH-домену, який опосередковує взаємодію з актином, центрального пролін-збагаченого домену, С-кінцевого N-WASP-зв'язувального домену (WBD) та трьох мотивів, що взаємодіють з профіліном (ABM-2). Відомо, що пролін-збагачений домен WIP взаємодіє з SH3-доменами адаптерних протеїнів Nck та Crkl, кіназ Syk та PKCθ та протеїнами, що зв'язуються з актином, наприклад, кортактином та Abp1 [25, 26]. Для визначення пролін-збагачених ділянок у структурі WIP, які являють собою інтерфейс взаємодії з його новими партнерами, були використані делеційні конструкції WIP з HA-тагом, які експресували в клітинах ссавців (рисунок 2.2):

1) WIP(аз 13-450) з відсутнім WBD-доменом, який забезпечує взаємодію з нуклеатороми актину N-WASP (експресується повсюдно) та WASP (експресується в гемопоетичних клітинах);

2) WIP(аз 13-215), що складається із VH-домену та N-кінцевої частини пролін-збагаченого домену, яка забезпечує взаємодію з маркером інвадоподій – кортактином;

3) WIP(аз 318-500), що включає С-кінцеву частину пролін-збагаченого домену та WBD-домен.

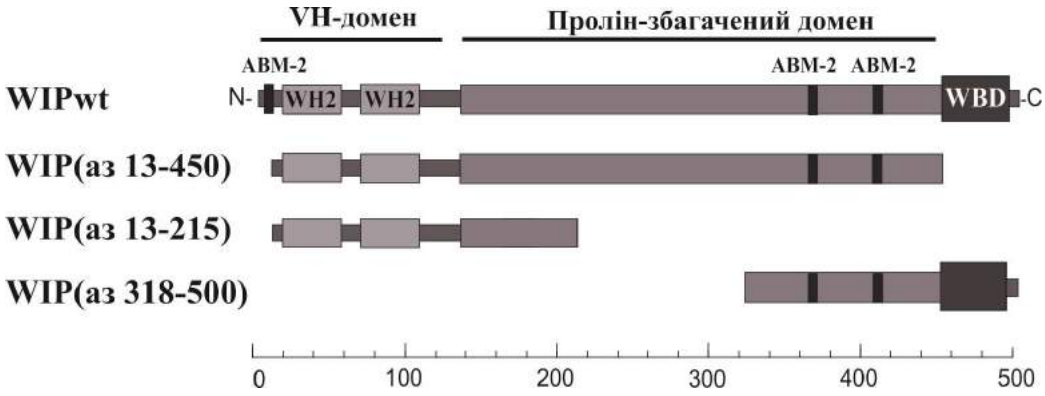

Рисунок 2.2 – Схематичне зображення структури повнорозмірного WIP (WIPwt) та його делеційних конструкцій

Делеційні конструкції WIP були використані для трансфекції клітин лінії 293 з подальшою преципітацією з GST-SH3-доменами AMPH1, BIN1, CRK, PLCγ1, SRC, SRCn та GST-GRB2. Іммобілізовані на глутатіон-сефарозі GST-злиті протеїни інкубували з лізатами клітин 293, які експресували делеційні конструкції WIP. У якості негативного контролю для оцінки чистоти зв'язування використовували GST. Після преципітації проводили ПААГ-електрофорез з наступним Вестерн-блот аналізом та детекцією моноклональними антитілами, специфічними до гемаглютиніну (анти-HA).

Результат Вестерн-блот аналізу, представлений на рисунку 2.3 А вказує, що AMPH1, CRK, PLCγ1, SRC, SRCn та GRB2 преципітують делеційну конструкцію WIP(аз 13-450), тоді як специфічної смуги у преципітатах з BIN1 не виявлено. Наступний Вестерн-блот аналіз показав, що конструкція WIP(аз 13-215) преципітує з протеїнами SRC, PLCγ1, GRB2, CRK і не взаємодіє з SRCn та AMPH1 (рисунок 2.3 Б). Остання делеційна конструкція WIP(аз 318-500) преципітує усі досліджувані протеїни з різним рівнем сигналу (рисунок 2.3 В).

Таким чином отримані дані вказують на те, що амінокислотні залишки 450-500 (WBD-домен) у структурі WIP є важливими для взаємодії з BIN1, тоді як амінокислотні залишки 216-450 пролін-збагаченого домену WIP необхідні для зв'язування AMPH1 і SRCn. Для протеїнів SRC, PLCγ1, GRB2, CRK виявлені численні сайти зв'язування вздовж усієї доменної структури WIP.

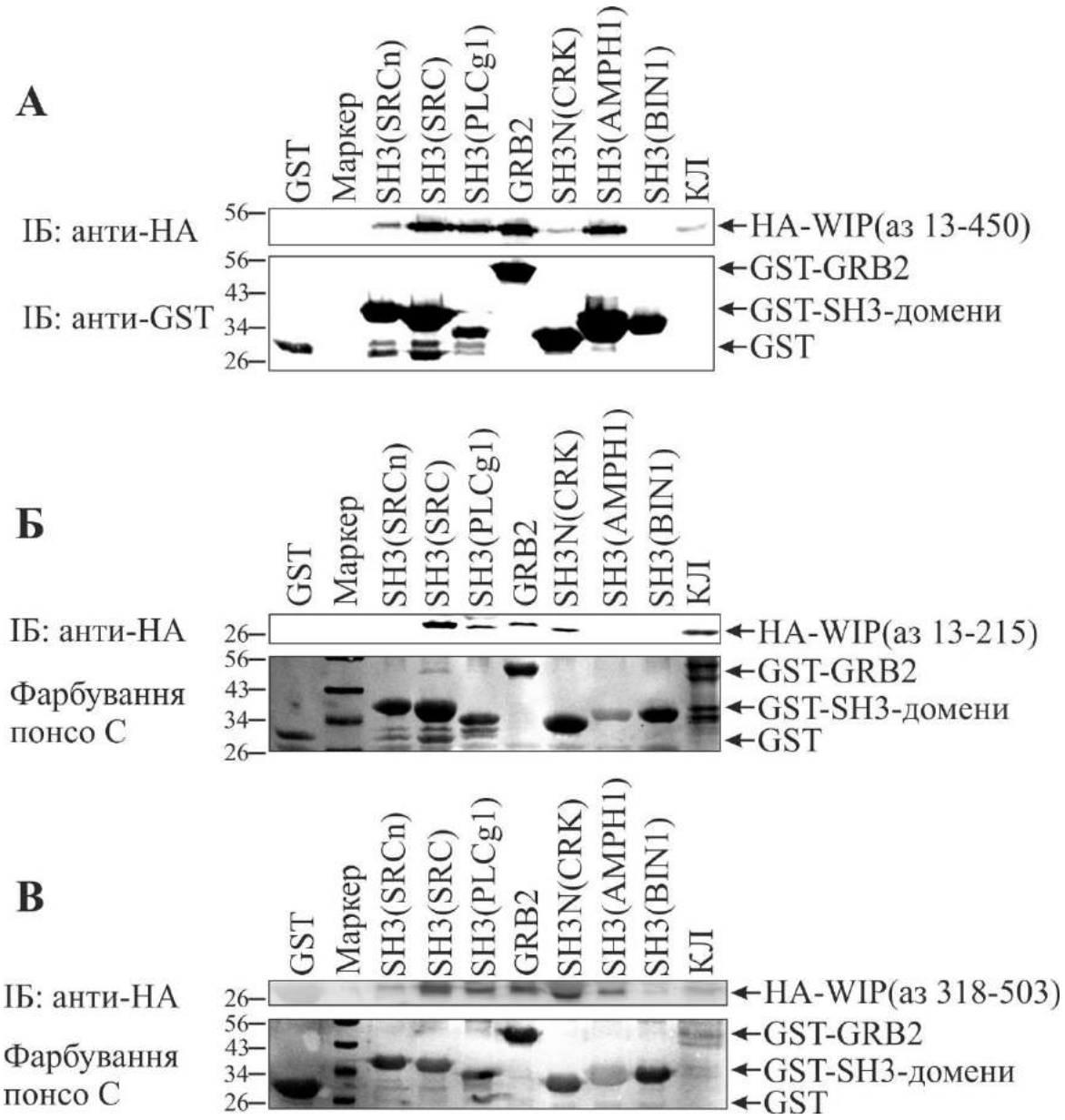

Рисунок 2.3 – Вестерн-блот аналіз преципітації делеційних конструкцій WIP з AMPH1, BIN1, CRK, PLCγ1, SRC, SRCn та GRB2 за умов *in vitro*. Іммобілізовані на сорбенті GST-злиті протеїни та GST (контроль) інкубували з лізатом клітин 293, які експресували: (А) HA-WIP(аз 13-450), (Б) HA-WIP(аз 13-215) та (В) HA-WIP(аз 318-500). Преципітовані протеїни детектували анти-HA антитілами, GST-злиті протеїни детектували анти-GST антитілами або за допомогою фарбування понсо С. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Відомо, що взаємодія WIP з фактором нуклеації актину N-WASP опосередковується WBD-доменом і є важливою для утворення інвадоподій. Порушення цієї взаємодії через надекспресію домену WBD інгібує інвадоподії у

клітинах аденокарциноми MTLn3 щура [15]. В результаті проведеної експериментальної роботи встановлено, що WBD-домен протеїну WIP важливий також і для взаємодії з протеїном BIN1, який функціонує як онкосупресор та викликає Мус-залежний апоптоз [14]. Таким чином, протеїн WIP може взаємодіяти через WBD-домен як із протеїном N-WASP, що призводить до зростання метастатичного потенціалу клітин, так і з онкосупресором BIN1, що може перешкоджати зв'язуванню з N-WASP та призводити до протилежних функціональних наслідків.

Дані літератури свідчать, що ідентифіковані у цьому проєкті партнери WIP можуть брати участь у розвитку патологічних станів людини та тварин, зокрема, розвитку злоякісних новоутворень. Тому одержані дані є важливими для пошуку і ідентифікації нових мішеней, які інгібують інвадоподії, для розробки відповідних фармакологічних препаратів скерованої дії.

2.4 Перевірка взаємодії CR16 з протеїнами, залученими до міграційних та інвазивних процесів клітини

Протеїн CR16 належить до родини верпролінів ссавців, бере участь у передачі синаптичних сигналів в нейронах та відіграє важливу роль у сперматогенезі. CR16 є тканинно-специфічним протеїном, та, як показано на моделі мишей, експресується головним чином у мозку і яєчках [16]. Згідно з базою даних «The Human Protein Atlas», найвищий рівень експресії CR16 у тканинах людини також спостерігається у сім'яниках, яєчниках та мозку [27].

Отримані нами результати вперше виявили експресію гена *CR16* в злоякісних пухлинах молочної залози людини [16]. Оскільки наразі відомо лише кілька партнерів протеїна CR16, а його доменна структура дуже подібна до такої у WIP, нами було перевірено можливість його взаємодії з SH3-доменам вищенаведеній протеїнів. Для виявлення таких взаємодій іммобілізовані на глутатіон-сефарозі SH3-домени сигнальних і ендоцитозних протеїнів та актин-зв'язувального протеїна CTTN інкубували із лізатами клітин 293, в яких експресували CR16, злитий із тагом Мус. Преципітовані протеїни детектували

за допомогою Вестерн-блот аналізу з використанням антитіл, специфічних до Мус-тагу та GST, або за допомогою фарбування Понсо С.

Отримані результати вказують на те, що Мус-CR16 було преципітовано доменами SH3-1 та SH3-2 протеїну NCK1 і доменами SH3-1 та SH3-3 протеїну NCK2 (рисунок 2.4 А). Також було виявлено зв'язування Мус-CR16 із протеїном GRB2, SH3-доменами кінази SRC та адаптеру CRK, і меншою мірою із SH3-доменами нейрон-специфічної ізоформи SRCn, фосфоліпази PLCγ1, AMPH1 та CTTN (рисунок 2.4 Б).

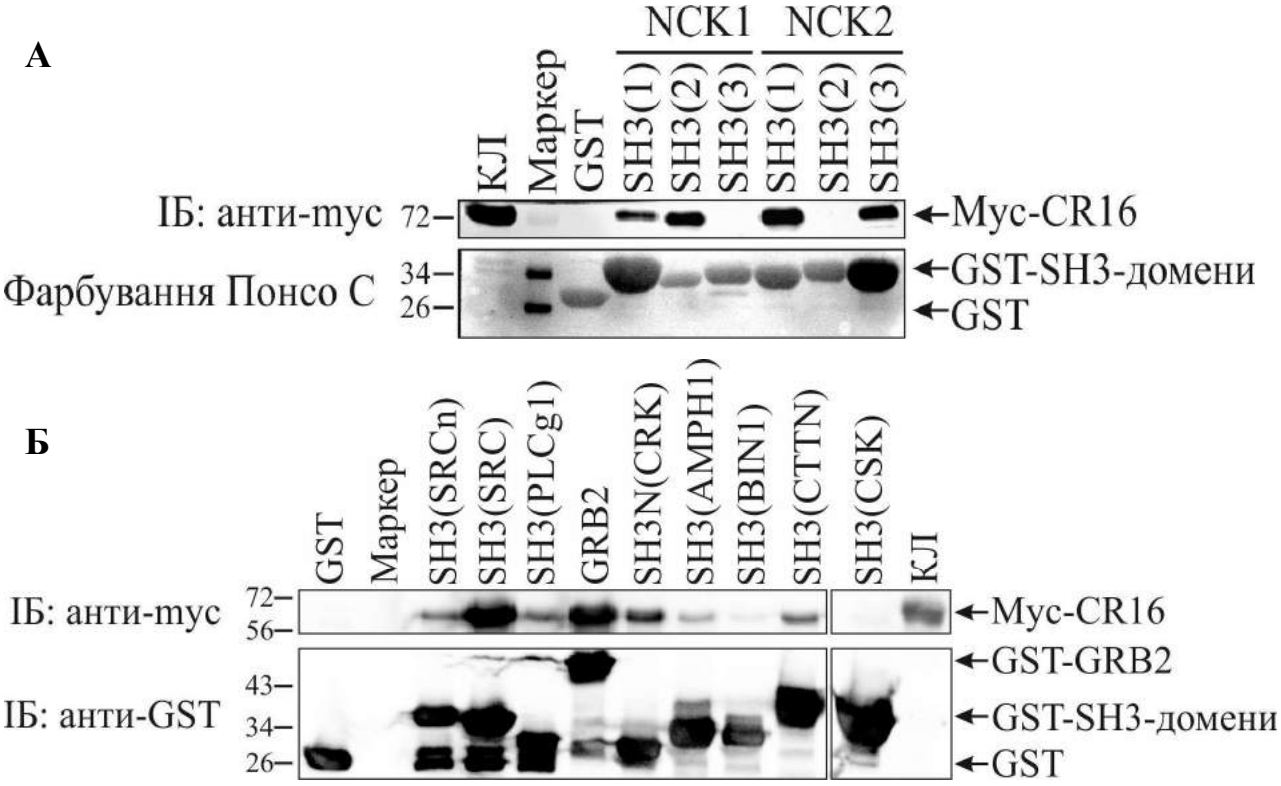

Рисунок 2.4 – Вестерн-блот аналіз результатів преципітації CR16 із SH3-доменами NCK1 і NCK2 (А) та AMPH1, BIN1, CRK, GRB2, CTTN, PLCγ1, SRC, SRCn і CSK (Б). Іммобілізовані на сорбенті протеїни GST або GST-злиті SH3-домени інкубували з лізатом клітин 293 з надекспресованим Мус-CR16. Преципітовані протеїни CR16 та GST-злиті протеїни детектували анти-Мус та анти-GST антитілами відповідно. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот.

Отже, в ході дослідження було ідентифіковано вісім нових партнерів актин-зв'язувального протеїну CR16 серед різних функціональних груп, а саме:

AMPH1, BIN1, CTTN, CRK, PLCγ1, NCK1, NCK2, GRB2 та SRC. Отримані результати можуть свідчити про потенційну участь CR16 у клатрин-опосередкованому ендоцитозі та різноманітних сигнальних шляхах клітини, зокрема в сигнальних каскадах, що опосередковуються фосфоінозитолфосфатами та тирозинкіназами.

2.5 Ідентифікація нових партнерів адаптерного протеїна TKS4

Наступним завданням був пошук нових потенційних партнерів протеїну інвадоподій – TKS4. Оскільки в структурі TKS4 також наявні пролін-збагачені ділянки, було проаналізовано можливість взаємодії між TKS4 та вищенаведеними SH3-доменами.

Для виконання цього завдання GST-злиті SH3-домени відповідних протеїнів іммобілізували на глутатіон-сефарозі та інкубували із лізатами клітин 293. Преципітовані протеїни було проаналізовано за допомогою Вестерн-блот аналізу з використанням специфічних антитіл, що детектують ендогенний протеїн TKS4. Рекомбінантні протеїни GST-SH3 візуалізували за допомогою фарбування Кумассі або Понсо С.

Нами показано, що домени SH3-2 протеїна NCK1 та SH3-3 протеїна NCK2 преципітували ендогенний TKS4 із лізатів клітин 293 (рисунок 2.5 А). TKS4 також було преципітовано SH3-доменами протеїнів SRC, CRK, PLCγ1, AMPH1 та BIN (рисунок 2.5 Б), вказуючи на можливість взаємодії досліджуваних протеїнів *in vitro* та їх здатність формувати комплекси в інвадоподіях ракових клітин.

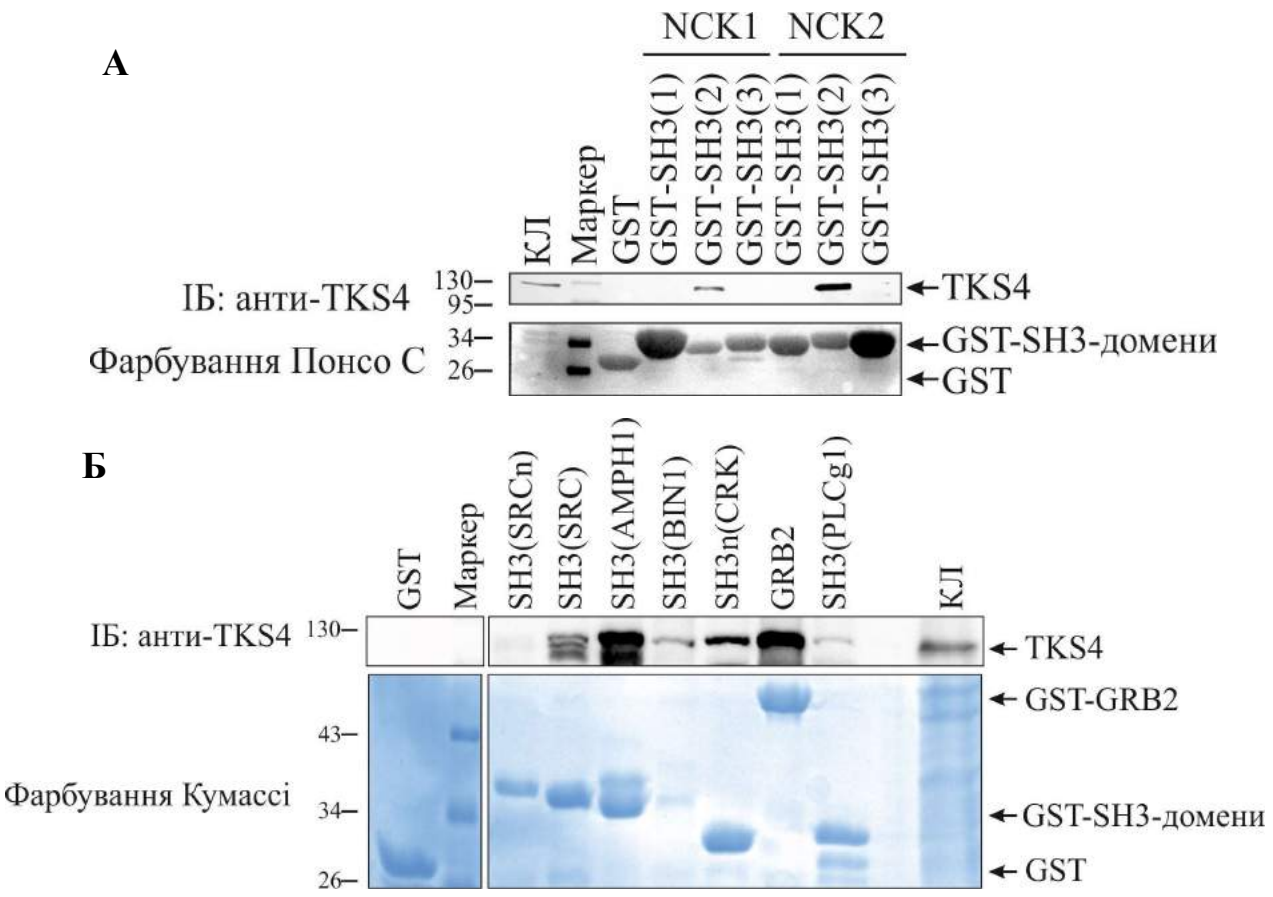

Рисунок 2.5 – Вестерн-блот аналіз результатів преципітації TKS із SH3-доменами NCK1, NCK2, AMPH1, BIN1, GRB2, PLCγ1, SRC, SRCn і CSK. Іммобілізовані на сорбенті протеїни GST або GST-злиті SH3-домени інкубували з лізатом клітин 293. Преципітовані протеїни TKS4 та GST-злиті протеїни детектували антитілами анти-TKS4, GST-SH3-домени – фарбуванням Понсо С або Кумассі. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Формування комлексів між TKS4 та GRB2 було підтверджено також *in vivo* коімунопреципітацією в інвазивних клітинах MDA-MB-231 з надекспресованим рекомбінантним протеїном Omni-GRB2. Відомо, що форболовий ефір активує сигнальні шляхи, що індукують формування інвадоподій, тому ми припустили, що він може впливати на утворення комплексу між TKS4 та GRB2. Коімунопреципітацію проводили в присутності і без форболового ефіру, використовуючи анти-TKS4 антитіла (рисунок 2.6).

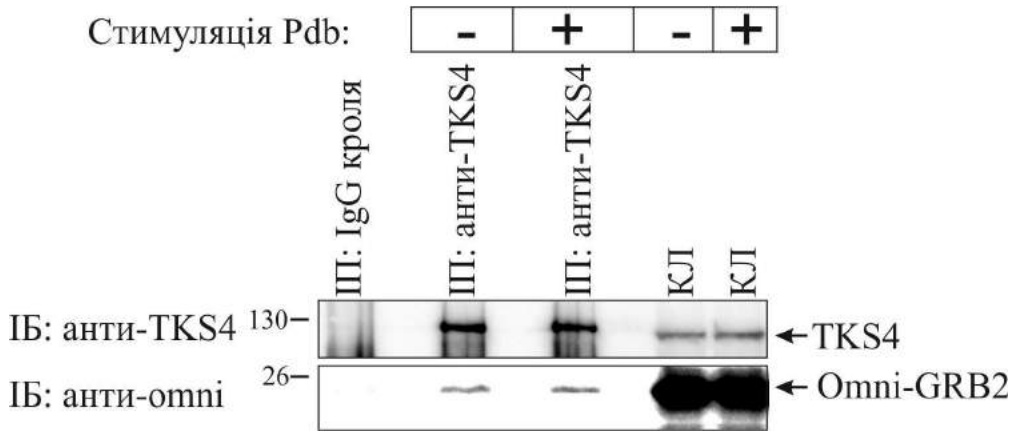

Рисунок 2.6 – Вестерн-блот аналіз взаємодії TKS4 та GRB2 при стимуляції форболовим ефіром з лізату клітин MDA-MB-231, з надекспресією Omni-GRB2. IgG кроля було використано як негативний контроль. Егдогенний TKS4 та Omni-GRB2 детектували антитілами анти-TKS4 та анти-omni, відповідно. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот, ІП – імунопреципітація, Pdb – форболовий ефір

Таким чином, можна припустити, що стимуляція клітин форболовим ефіром не має вираженого впливу на афінність зв'язування TKS4 з GRB2.

2.6 Пошук нових взаємодій TKS4b

Оскільки ізоформа TKS4b, яка утворюється в результаті альтернативного сплайсингу пре-мРНК TKS4, є нещодавно виявленою і її партнери насьогодні невідомі, наступним завданням роботи було проаналізувати взаємодії між TKS4b та SH3 доменами вищезазначених протеїнів. Для перевірки взаємодій використовували рекомбінантні GST-злиті SH3-домени потенційних протеїнових партнерів та лізати клітин 293, які експресували omni-TKS4b. Отримані результати свідчать, що ізоформа TKS4b не преципітується досліджуваними SH3-доменами протеїнів AMPH1, BIN1, GRB2, PLCγ1, SRC, SRCn і CRK (рисунок 2.7 А).

Інтерсектини (ITSN1 та ITSN2) – це родина мультидоменних скафолдних протеїнів, що беруть участь в ендо- та екзоцитозі, сигнальній трансдукції та перебудовах актинового цитоскелету. Відомо, що обидва представники цієї родини локалізуються в інвадоподіях та беруть участь у перебудовах актинового цитоскелету шляхом активації малої ГТФази Cdc42 та безпосередньої взаємодії з

ефектором Cdc42 – N-WASP. За даними літератури, саме Cdc42/N-WASP/WIP/Arp2/3-залежний шлях полімеризації актину є необхідною передумовою формування інвадоподій [28]. У своїй структурі інтерсектини мають 5 SH3-доменів, тому вони потенційно можуть взаємодіяти з пролін-збагаченими мотивами TKS4b. Так, наступним завданням було дослідження взаємодії окремих SH3-доменів ITSN1 (рисунок 2.7 Б) та ITSN2 (рисунок 2.7 В) з TKS4b, проте взаємодії виявлено не було.

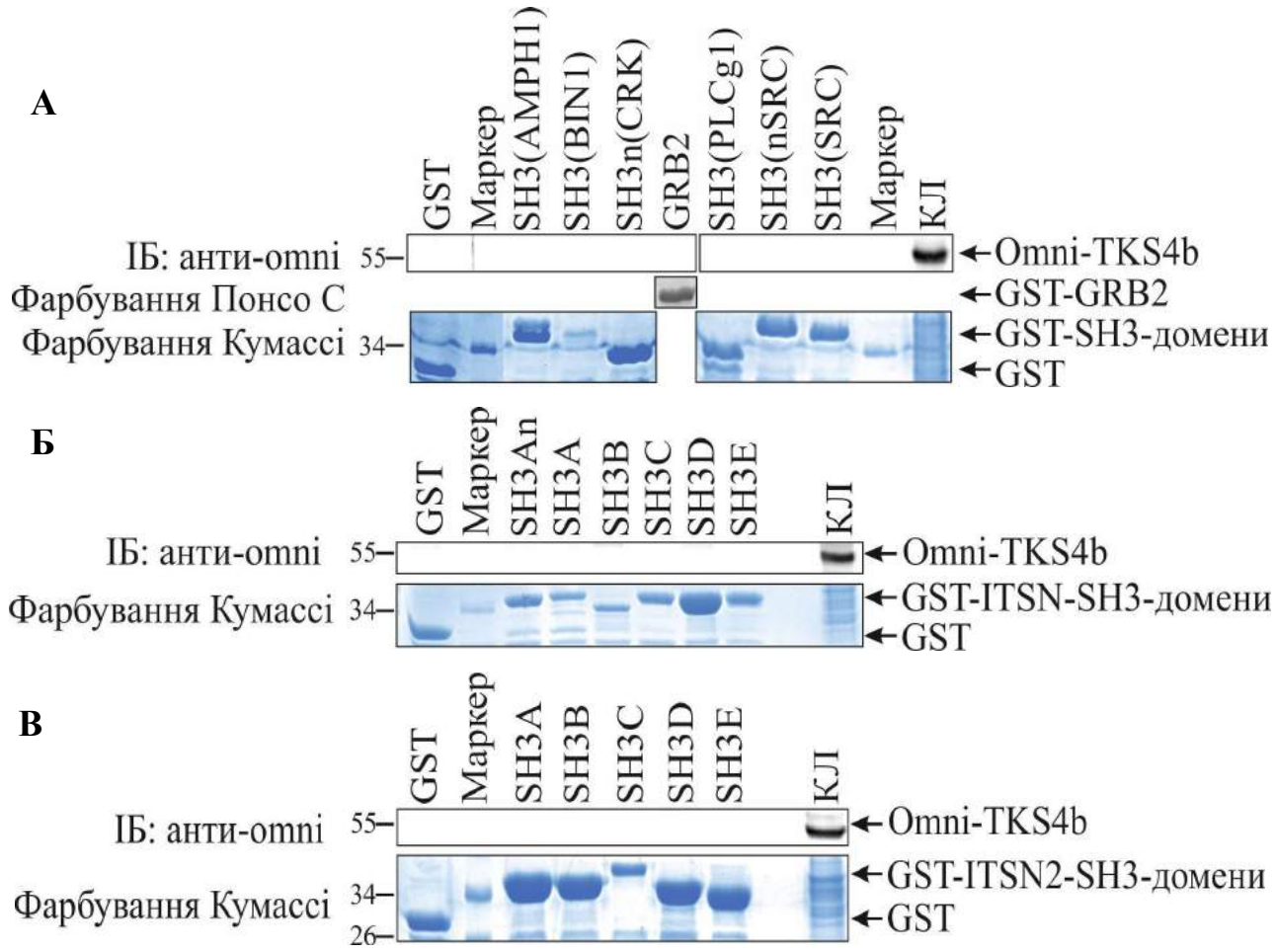

Рисунок 2.7 – Вестерн-блот аналіз результатів преципітації TKS4b: із SH3-доменами AMPH1, BIN1, CRK, GRB2, PLCγ1, SRC, SRCn (А); із SH3-доменами ITSN1 (Б); із SH3-доменами ITSN2 (В). Іммобілізовані на сорбенті GST або GST-злиті SH3-домени інкубували з лізатом клітин 293, які експресували Omni-TKS4b. TKS4b детектували антитілами анти-Omni, GST-злиті протеїни візуалізували фарбуванням Кумассі. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Отримані результати вказують на те, що ізоформа TKS4b, на відміну від основної ізоформи, не взаємодіє із SH3-доменами протеїнів ендоцитозу (AMPH1, BIN1, ITSN1, ITSN2) та сигнальних протеїнів (CRK, GRB2, SRC, PLC γ1), що свідчити про альтернативні функції цієї ізоформи в клітині.

2.7 Дослідження посттрансляційних модифікацій TKS4b і CR16 та їх впливу на взаємодію з протеїновими партнерами

Важливим механізмом регуляції функцій протеїнів є посттрансляційні модифікації, які визначають активність, локалізацію, стабільність, внутрішньоклітинний транспорт та деградацію протеїнів. За допомогою біоінформатичного аналізу у CR16 виявлено чотири потенційні сайти фосфорилювання за залишками тирозинів в позиціях 272, 299, 437 та 444 (рисунок 2.8 А).

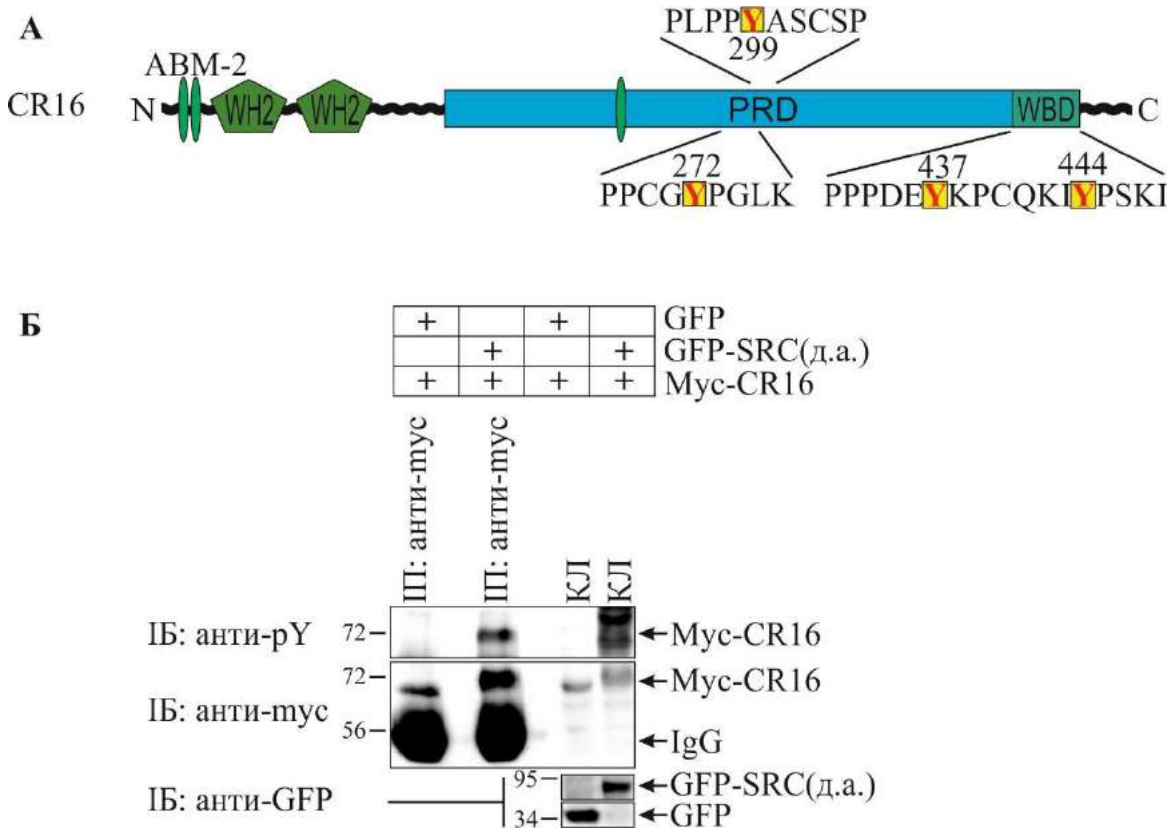

Рисунок 2.8 – Схематичне зображення доменної структури та розташування консервативних залишків тирозинів у складі CR16 (А). Вестерн-блот аналіз імунопреципітатів, отриманих за допомогою антитіл проти Myc, із використанням лізатів клітин лінії 293, котрансфікованих Myc-CR16 та домінантно-активним

мутантом GFP-SRC або Myc-CR16 та GFP (Б)

Для аналізу фосфорилювання CR16 було проведено імунопреципітацію CR16 з лізатів клітин 293, трансфікованих домінантно-активним мутантом GFP-SRC, або в якості контролю пустим вектором з GFP-тагом. Отримані зразки аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу із використанням антитіл, специфічних до фосфотирозину. Одержані дані вказують, що CR16 підлягає фосфорилюванню за залишками тирозину (рисунок 2.8 Б).

За допомогою біоінформатичного аналізу виявлено 4 сайти фосфорилювання за залишками тирозинів, які розташовуються на пролін-збагаченому та WASP-зв'язувальному (WBD) доменах протеїну CR16. Для перевірки впливу SRC-залежного фосфорилювання CR16 на взаємодію з протеїновими партнерами було проведено преципітації надекспресованого протеїну CR16 з лізатів клітин 293, котрансфікованих Myc-CR16 та домінантно-активним мутантом GFP-SRC або Myc-CR16 та GFP, за допомогою антитіл проти Myc (рисунок 2.9).

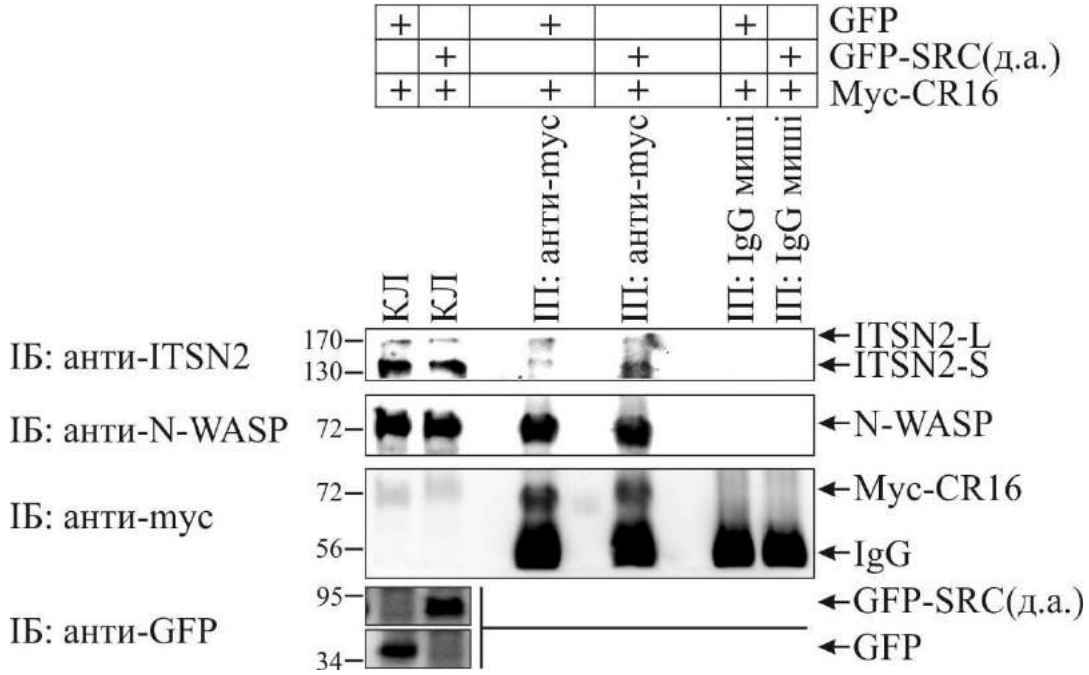

Рисунок 2.9 – Вплив SRC-залежного фосфорилювання CR16 на взаємодію з N-WASP та короткою і довгою ізоформами ITSN2. Протеїни CR16 та SRC детектували антитілами проти MYC та GFP, відповідно. Ендогенні протеїни N-WASP та ITSN2 детектували анти-N-WASP та анти-ITSN2 антитілами

Отримані результати свідчать, що фосфорилювання протеїну CR16 за залишками тирозинів, за участі SRC-кінази, не впливає на взаємодію з протеїновими партнерами N-WASP та ITSN2.

Відомо, що мотиви протеїнів, що містять фосфорильовані залишки тирозину, можуть взаємодіяти з доменами SH2 або PTB. За допомогою біоінформатичного аналізу було проведено пошук протеїнів, що містять SH2-домени, які здатні специфічно взаємодіяти із мотивами CR16, що можуть зазнавати фосфорилювання. Серед них адаптерні протеїни NCK1, NCK2, GRB2 та CRK, кінази ITK, FGR, FYN та ABL, а також регуляторна субодиниця кінази Pi3K, які беруть участь в міграції, проліферації, перебудовах цитоскелету, передачі мітогенного сигналу від рецепторних тирозинових кіназ та інших клітинних процесах. Іммобілізовані GST-SH2-домени потенційних партнерів було використано для преципітації CR16 з лізату клітин 293, котрансфікованих GFP-SRC та Myc-CR16. У випадку Pi3K наявні декілька SH2-доменів – Pi3K-N та Pi3K-C. Протеїн GST було використано як негативний контроль зв'язування. Отримані дані свідчать про те, що всі використані SH2-домени, окрім NCK1, GRB2 та ABL1, здатні преципітувати CR16, з лізату клітин, трансфікованих домінантно-активним мутантом GFP-SCR (рисунок 2.10).

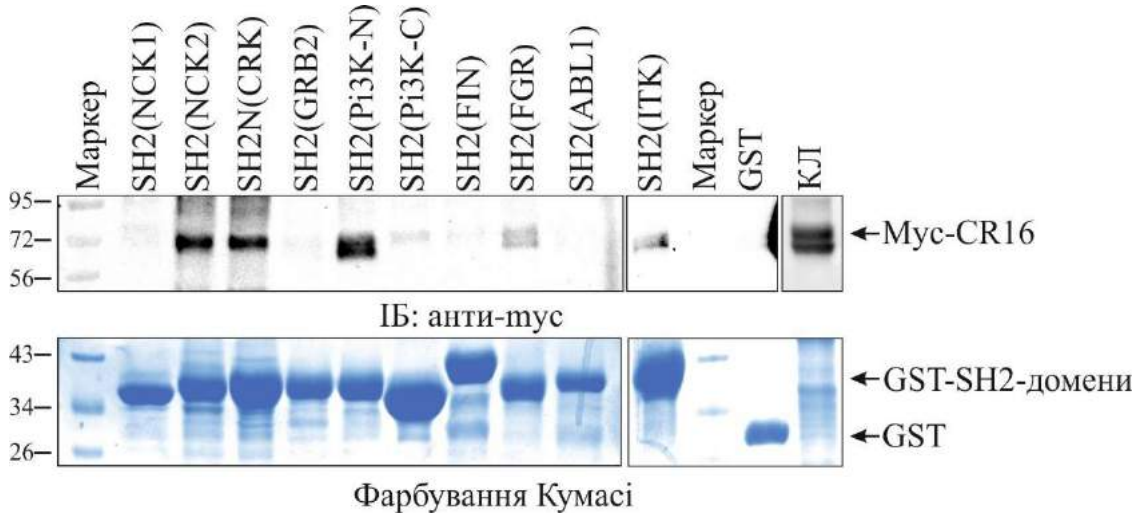

Рисунок 2.10 – Вестерн-блот аналіз результатів преципітації CR16 з використанням злитих з GST доменів SH2 з лізату клітин 293, що були котрансфіковані домінантно-активним мутантом GFP-SRC та Myc-CR16

Варто зазначити, що за допомогою преципітації протеїнів злитих з GST, взаємодію не було детектовано в лізатах клітин, які містили тільки Myc-CR16 або тільки домінантно-активним мутантом GFP-SRC (дані не представлені).

Отже отримані результати вказують на те, що протеїн CR16 підлягає посттрансляційній модифікації, а саме фосфорилюванню кіназою SRC з наступним впізнаванням його певними SH2-вмісними протеїнами.

За даними літератури відомо, що скафолдний протеїн TKS4 має три сайти фосфорилювання тирозиновою кіназою SRC, що призводить до рекрутування протеїнів до ділянок утворення інвадоподій [19]. Ізоформа TKS4 – TKS4b, яка утворюється в результаті сплайсингу по альтернативному сайту для 3'-екзону втрачає два останніх SH3-домени та один з трьох залишків тирозинів, але два присутніх залишки можуть підлягати фосфорилюванню (рисунок 2.11 А).

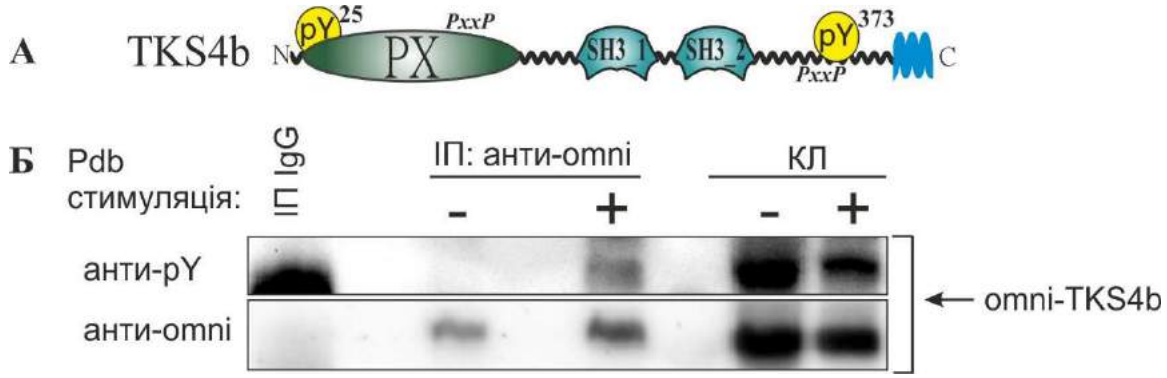

Рисунок 2.11 – Схематичне зображення структури ізоформи TKS4b та залишків тирозинів у її складі, що фосфорилюються SRC-кіназою (А). Вестерн-блот аналіз результатів преципітації надекспресованої ізоформи TKS4b-omni із лізатів лінії MDA-MB-231, стимульованих форболовим ефіром, за допомогою антитіл проти фосфотирозину (Б)

Тому надалі було досліджено, чи залежить фосфорилювання ізоформи TKS4b від активації сигнальних шляхів клітини. Для цього клітини лінії MDA-MB-231 після транзієнтної трансфекції Omni-TKS4b, витримували в середовищі без сироватки протягом 16 годин, а потім їх стимулювали за допомогою 100 мкг/мл форболового ефіру (Pdb) протягом 30 хвилин. Лізати не стимульованих і стимульованих форболовим ефіром клітин були використані для імунопреципітації

надексресованного TKS4b за допомогою антитіл проти omni з подальшим Вестерн-блот аналізом антитілами проти фосфотирозину (рисунок 2.11 Б). Отримані дані вказують на фосфорилювання ізоформи TKS4b в клітинах після обробки форболовим ефіром, чого не спостерігалось у нестимульованих клітинах. Отже фосфорилювання ізоформи TKS4b залежить від активації сигнальних шляхів, асоційованих із утворенням інвадоподій.

2.8 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією TKS4b за допомогою Flp-In технології

Для подальших функціональних досліджень ізоформи TKS4b було створено клітинну лінію 293 з регульованою стабільною надекспресією цього протеїну за допомогою Flp-In технології. Для цього лігували фрагмент ДНК, що кодував Omni-TKS4b, та вектор pcDNA5-FRT-TO, попердньо оброблені ендонуклеазами рестрикції HindIII та EcoRV. Далі проводили рестрикційний аналіз отриманих клонів pcDNA5-FRT-TO-Omni-TKS4b і для подальшої роботи обирали ті, що утворювали фрагменти очікуваної довжини (5619 п.н., 879 п.н. та 187 п.н.). Електрофореграма рестрикційного аналізу представлена на рисунку 2.12. Для подальшої роботи обрали клон №3.

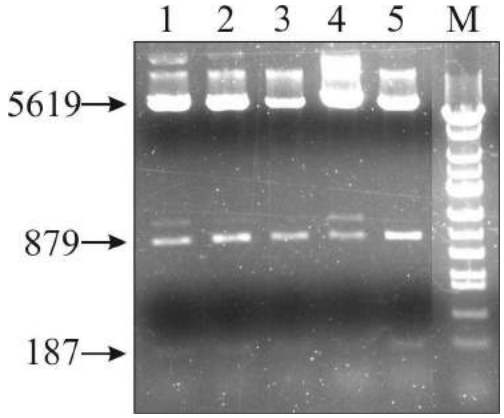

Рисунок 2.12 – Електрофореграма рестрикційного аналізу клонів № 1-5 pcDNA5-FRT-TO-Omni-TKS4b після оброблення їх ендонуклеазою рестрикції EcoRI. M – маркер

На наступному етапі використовували клітини лінії Flp-In™ T-REx™-293, в геномі яких присутній сайт для рекомбінації – FRT. Ці клітини котрансфікували плазмідами pOG44 та pcDNA5-FRT-TO-Omni-TKS4b (клон №3). Через двадцять чотири години після котрансфекції в культуральне середовище додавали селективний антибіотик (гігроміцин Б) в концентрації 100-150 мкг/мл, з яким клітини витримували протягом 24 год, після чого змінювали середовище клітин на середовище без гігроміцину Б. Протягом наступних 7-ми діб загиблі клітини, що не містили pcDNA5-FRT-TO-Omni-TKS4b №3, видаляли відмиванням поживним середовищем. Процедуру селекції проводили двічі. Далі проводили індукцію експресії Omni-TKS4b шляхом додавання в поживне середовище доксицикліну в концентраціях 0.25 мкг, 0.5 мкг, 1 мкг та 2 мкг на 1 мл поживного середовища протягом 24-х годин. Експресію Omni-TKS4b визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу клітинних лізатів. Як видно з рисунку 2.13, експресія Omni-TKS4b індукується будь-якою концентрацією доксицикліну.

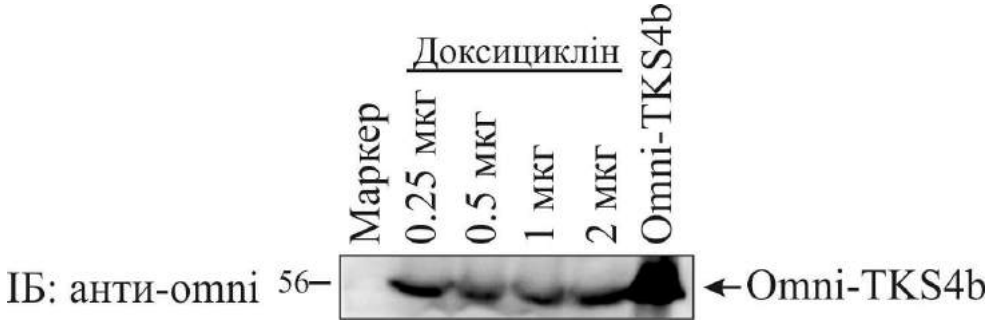

Рисунок 2.13 – Вестерн-блот аналіз експресії Omni-TKS4b у клітинах лінії T-REx-293 при індукції доксицикліном

Для подальшої роботи ми обрали концентрацію 0.5 мкг/мл. Для зберігання отриманої клітинної лінії були приготовані аліквоти клітин T-REx-293-omni-TKS4b для зберігання в рідкому азоті.

Таким чином, нами було створено стабільну лінію клітин T-REx-293 із індукованою надекспресією Omni-TKS4b. На наступних етапах дослідження створена модель буде використана для аналізу впливу TKS4b на формування інвадоподій та міграцію і проліферацію клітин.

2.9 Створення модельних клітин лінії T-REx-293 з надекспресією CR16 за допомогою Flp-In технології

Для дослідження впливу надекспресії верпроліна CR16 на процеси міграції та проліферації клітин було створено клітини лінії T-REx-293 з індукованою надекспресією CR16. Для цього була отримана конструкція на основі плазмідного вектора pcDNA5/FRT/TO, що кодує CR16 злитий з Мус-тагом. Після рестрикційного аналізу рестриктазою EcoRI отриманих клонів плазмідної конструкції для подальшої роботи обрали клон №1, який утворював ДНК-фрагменти очікуваного розміру (рисунок 2.14).

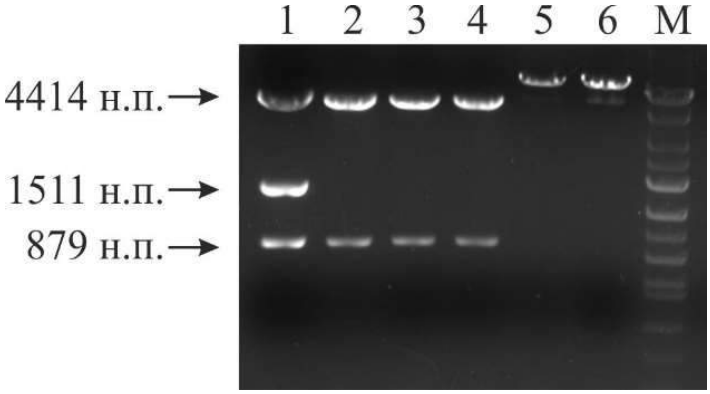

Рисунок 2.14 – Електрофореграма клонів № 1-6 плазмідної конструкції pcDNA5/FRT/TO-CR16-Мус після обробки їх ендонуклеазою рестрикції EcoRI. М – маркер

В результаті було отримано конструкцію, що кодує CR16 злитий з Мус-тагом – pcDNA5/FRT/TO-CR16-Мус.

Далі проводили котрансфекцію pcDNA5/FRT/TO-CR16-Мус із плазмідною конструкцією pOG44 в клітинах лінії Flp-In T-REx-293, де відбувалось вбудовування відповідного ДНК-фрагменту у геном клітин. Селекцію клітин проводили за допомогою антибіотика Гігроміцин Б.

Наступним кроком була перевірка експресії CR16 в отриманій модельній клітинній лінії T-REx-293-CR16-Мус. Рекомбінантний CR16-Мус індукували концентраціями 0.5 мкг, 1 мкг та 2 мкг доксицикліна на 1 мл поживного середовища

протягом 24-х годин. Як видно з рисунку 2.15, CR16-Myc експресується за усіх досліджуваних концентрацій доксицикліну.

Рисунок 2.15 – Вестерн-блот аналіз експресії CR16-Myc у клітинах лінії Flp-In T-REx-293-CR16-Myc при індукції доксицикліном. ІБ – імуноблот

Для подальшої роботи було обрано концентрацію 2 мкг/мл. Таким чином, нами було створено стабільну лінію клітин Flp-In T-REx-293 із індукованою надекспресією CR16-Myc.

2.10 Створення модельних клітинних ліній з нокаутом гену *TKS4* за допомогою CRISPR/Cas9 технології

Для створення клітинної лінії з нокаутом гена *TKS4* використовували технологію CRISPR/Cas9 [29]. Для того, щоб РНК-посередник направляв Cas9 на ген *TKS4,* було клоновано 20-ти нуклеотидну послідовність ДНК, яка відповідає кодуючій послідовності гена *TKS4*, у зазначену плазмідну конструкцію – pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0-TKS4, яку використовували для трансфекції клітин MCF7. Після селекції клітин, як описано у розділі Матеріали і Методи в пункті 1.11, було перевірено ефективність нокауту гену *TKS4* за допомогою Вестерн-блот аналізу. Як видно з рисунку 2.16, експресія TKS4 відсутня в усіх проаналізованих клонах MCF7ΔTKS4.

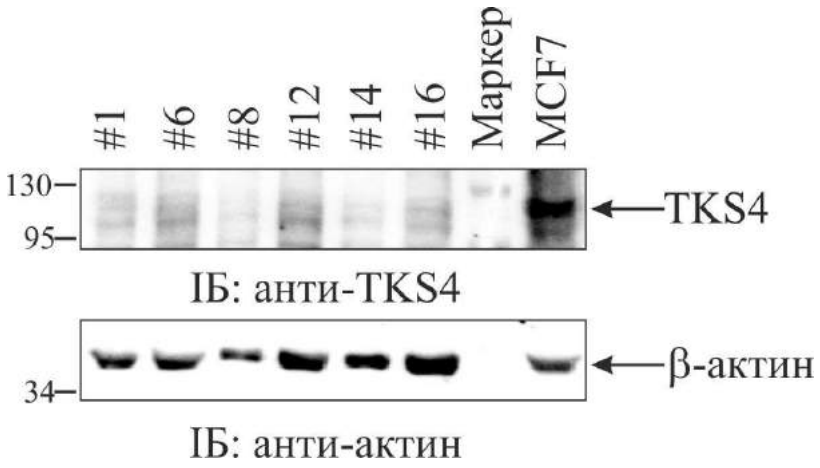

Рисунок 2.16 – Вестерн-блот аналіз експресії TKS4 у клітинах лінії MCF7ΔTKS4 №1, 6, 8, 12, 14, 16 та MCF7 в якості контролю. ІБ – імуноблот

Для подальшої роботи використовувався клон №1. Таким чином, нами було створено стабільну лінію MCF7ΔTKS4 з нокаутом гена *TKS4*.

2.11 Визначення локалізації CR16-вмісних протеїнових комплексів в клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MCF7

Протеїн CR16, як і WIP, відноситься до родини верпролінів ссавців та є найменш вивченим серед членів своєї родини. Експресія CR16 переважно виявлена в нейронах та яєчках [30]. Дослідження нашого відділу, проведені з метою вивчення особливостей експресії *CR16,* вперше виявили його мРНК у пухлинах грудної залози людини та аденокарциномних клітинах грудної залози людини лінії MCF7 [16]. Надалі для розуміння ролі CR16 в біологічних процесах вивчали локалізацію CR16 у клітинах лінії MCF7. Вважається, що внутрішньоклітинна локалізація протеїну тісно пов’язана з його фізіологічною функцією, і тому має вирішальне значення для розуміння його ролі в клітинних процесах. Тому наступною метою нашого проєкту було дослідження співлокалізації протеїну CR16 із маркерами везикулярного транспорту в клітинах лінії MCF7. Оскільки відомо, що протеїни родини верпролінів (WIP та WIRE) беруть участь в ендоцитозі, спочатку було досліджено співлокалізацію CR16 з надекспресованими ендоцитарними везикулами, які містили GFP-таг, за

допомогою скануючої конфокальної мікроскопії. Клатрин та кавеолін 1 – це протеїни, які відіграють найважливішу роль в утворенні оболонки везикул та є маркерами клатрин-опосередкованого і кавеолярного ендоцитозів відповідно. Результати імунофлуоресцентної мікроскопії демонструють, що CR16 співлокалізується з клатрином (коефіцієнт кореляції Спірмена (КС) складає 0.61±0.08, n=14) та кавеоліном 1 (КС, 0.47±0.11, n=14) (рисунок 2.17 А, Б).

Важливими регуляторами везикулярного транспорту вважаються малі гуанозинтрифосфат гідролази родини Rab. Дослідження останніх років демонструють важливу роль протеїнів цієї родини в канцерогенезі. Представником родини Rab є ГТФаза RAB4, яка є маркером рециркулюючих ендосом та її надекспресія сприяє розповсюдженню пухлини [31]. Одержані результати імунофлуоресцентного аналізу демонструють співлокалізацію протеїнів CR16 та RAB4, коефіцієнт кореляції Спірмена складав 0.63±0.07, n=11 (рисунок 2.17 В). Надалі було досліджено співлокалізацію між CR16 та TGN38, гетеродимерним інтегральним протеїном, що циклічно рухається між мережею транс-Гольджі та клітинною поверхнею. Отримані результати свідчать про слабку співлокалізацію між протеїнами CR16 та TGN38, КС – 0.39±0.13, n=10 (рисунок 2.17 Г).

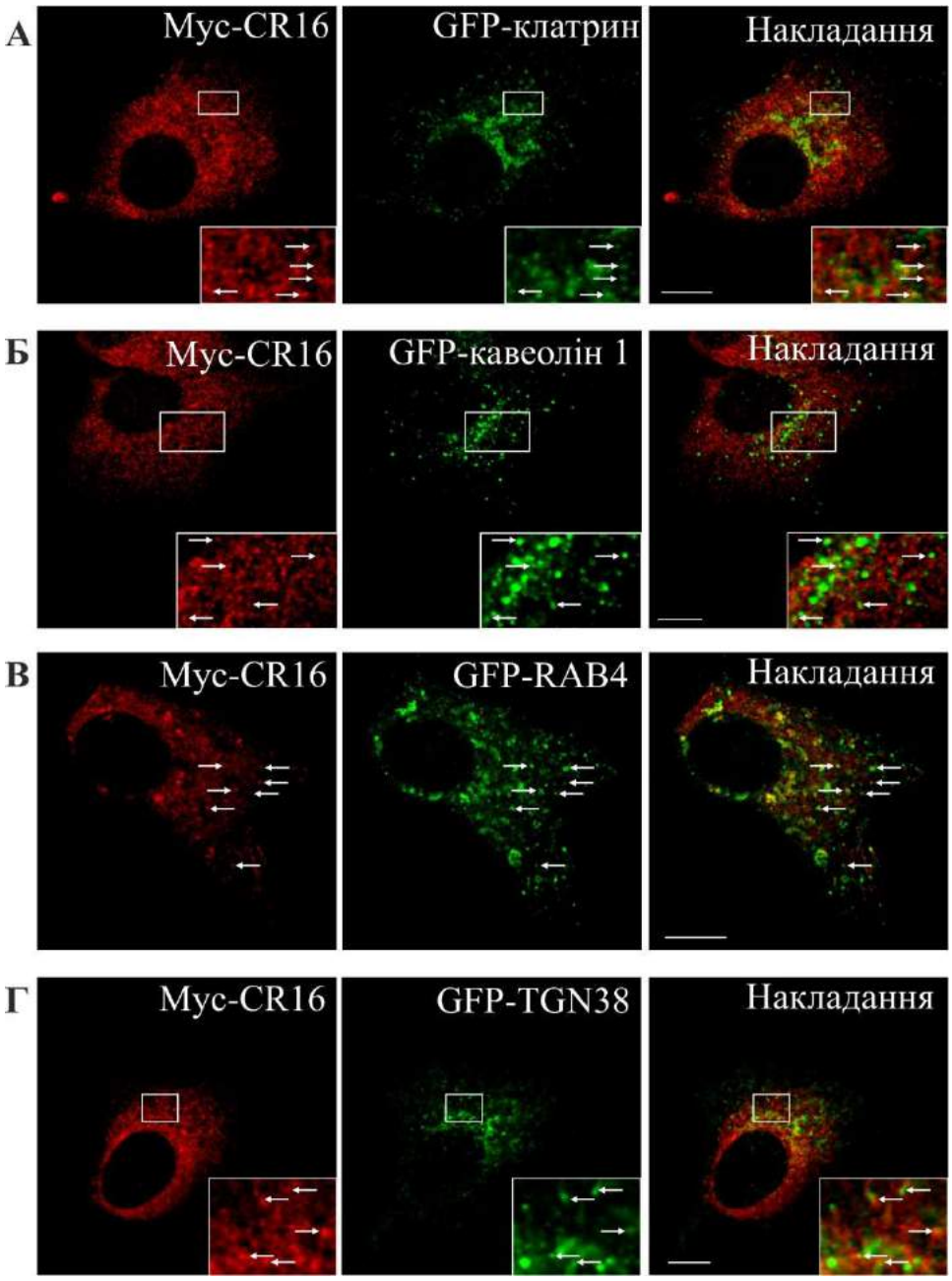

Рисунок 2.17 – Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації CR16 з клатрином, кавеоліном 1, RAB4 та TGN38. Клітини лінії MCF7 було котрансфіковано: (А) Myc-CR16 та GFP-клатрином; (Б) Myc-CR16 та GFP-кавеоліном 1; (В) Myc-CR16 і GFP-RAB4 та (Г) Myc-CR16 і GFP-TGN38. Протеїн CR16 детектували за допомогою анти-Myc антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555. Клатрин, кавеолін 1, RAB4 та TGN38 були візуалізовані прямою детекцією флуоресцентних протеїнів. Масштабний відрізок – 10 мкм

Таким чином, одержані результати показали співлокалізацію CR16 з рециклюючими ендосомами, клатрин- та кавеолін-вмісними структурами, що свідчить про його потенційну участь у всіх цих шляхах везикулярного транспорту.

2.12 Дослідження рівня проліферації та міграції стабільних клітинних ліній, отриманих на основі модельних клітин T-REx-293 з надекспресією TKS4b або CR16

Одним із завдань проєкту було дослідження впливу надекспресії CR16 або TKS4b на проліферативні властивості та міграцію клітин. На сьогодні міграція та проліферація клітин активно досліджується в контексті розвитку патологічних станів, адже порушення їх перебігу може призводити до неадекватної відповіді на деякі клітинні стимули, і, як наслідок, розвитку захворювань. Відомо, що однією із специфічних рис злоякісних клітин є посилена проліферація та міграція, що дозволяє пухлині підтримувати та нарощувати клітинну масу, а також формувати прилеглі та віддалені метастази. Оскільки експресія *CR16* та *TKS4b* у злоякісних клітинах збільшується було вирішено перевірити їх участь у процесах проліферації та міграції клітин.

Вплив протеїну CR16 та ізоформи TKS4b на міграцію клітин досліджували на модельних клітинних лініях T-REx-293 зі стабільною надекспресією зазначених протеїнів за допомогою моделі загоєння раневої поверхні. Отримані результати свідчать, що подряпини моношару клітин із надекспресією CR16 та TKS4b загоювалися значно швидше порівняно з контрольними клітинами, без надекспресії цих генів (рисунок 2.18).

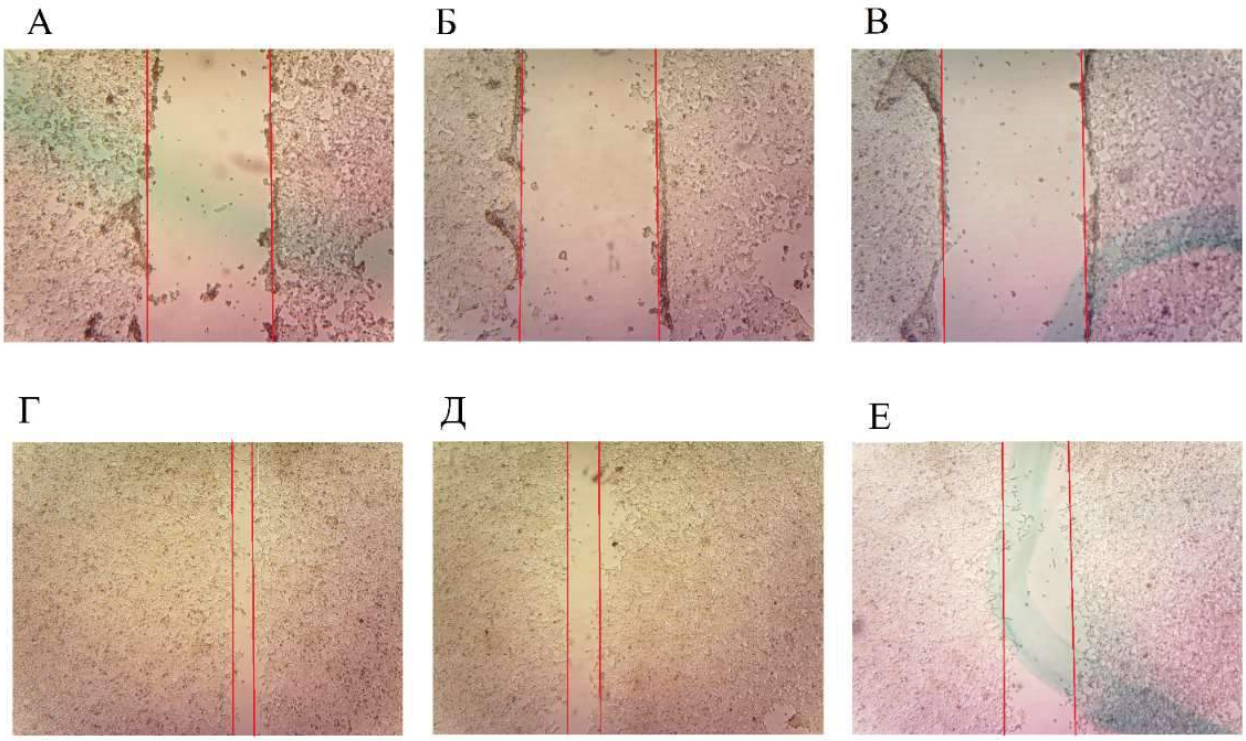

Рисунок 2.18 – Фотографія моношару клітин T-REx-293 відразу після подряпини (А-В) та через 24 години (Г-Е). А, Г – клітини із надекспресією CR16; Б, Д – клітини із надекспресією TKS4b; В, Е – клітини без надекспресії цих генів

Слід зазначити, що клітини із надекспресією TKS4b рухалися повільніше порівняно з клітинами з надекспресією CR16 (рисунок 2.19).

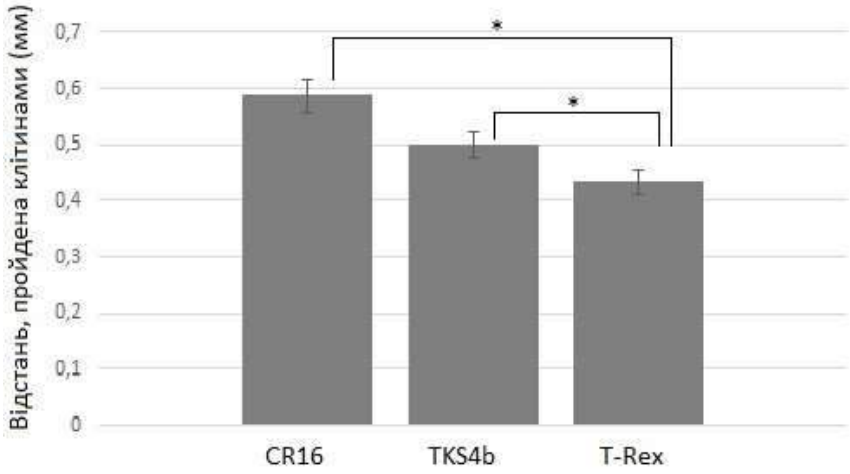

Рисунок 2.19 – Діаграма демонструє відстань, на яку мігрували клітини через 24 години після нанесення подряпини. Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уітні, * - $p < 0,05$

Оскільки проліферація клітин тісно пов’язана з реорганізацією актинового цитоскелету, зміни в експресії *CR16* та *TKS4b* можуть впливати також на здатність клітин до поділу. Вплив надекспресії CR16 та TKS4b на проліферативні властивості клітин проводили за допомогою МТТ-тесту. В якості контролю використовували клітини, що були трансфіковані пустим вектором без вставки. Одержані дані свідчать, що надекспресія CR16 та TKS4b збільшує проліферативну активність клітин у порівнянні з контрольними клітинами (рисунок 2.20).

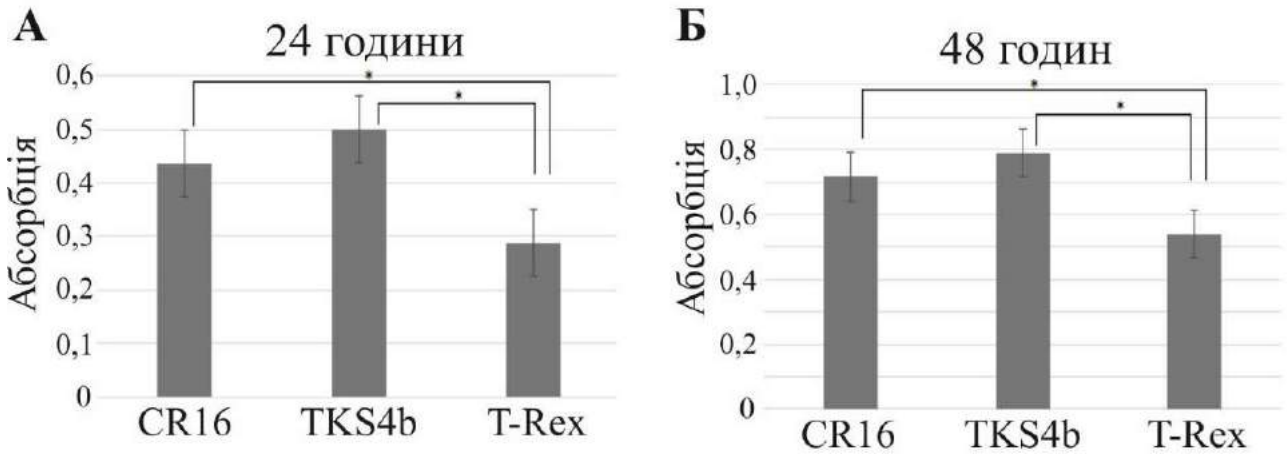

Рисунок 2.20 – Діаграми демонструють результати впливу протеїнів CR16 та TKS4b на проліферацію клітин за допомогою МТТ-тесту через (А) 24 та (Б) 48 годин після інкубації. Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уітні, * - $p < 0,05$

Таким чином, проведені дослідження виявили вплив надекспресії CR16 та TKS4b на механізми процесів проліферації та міграції клітин.

2.13 Дослідження особливостей внутрішньоклітинного розташування TKS4 та його ізоформи TKS4b у клітинах лінії MCF7

Відомо, що скафолдний протеїн TKS4 має цитоплазматичне розташування, а у Src-трансформованих та ракових інвазивних клітинах виявляється у місцях формування інвадоподій та подосом [19]. Внутрішньоклітинна локалізація ізоформи TKS4 – TKS4b на сьогодні не вивчена. У цьому проєкті було досліджено внутрішньоклітинне розташування ізоформи TKS4b та виявлені особливості

локалізації протеїну TKS4b у порівнянні з TKS4 для того щоб встановити, чи може ізоформа TKS4b функціонувати у відмінних від показаних для TKS4 компартментах клітини. Отримані нами результати імунофлуоресцентного аналізу демонструють, що ізоформа TKS4b локалізується як в цитоплазмі так і в ядрі (рисунок 2.21).

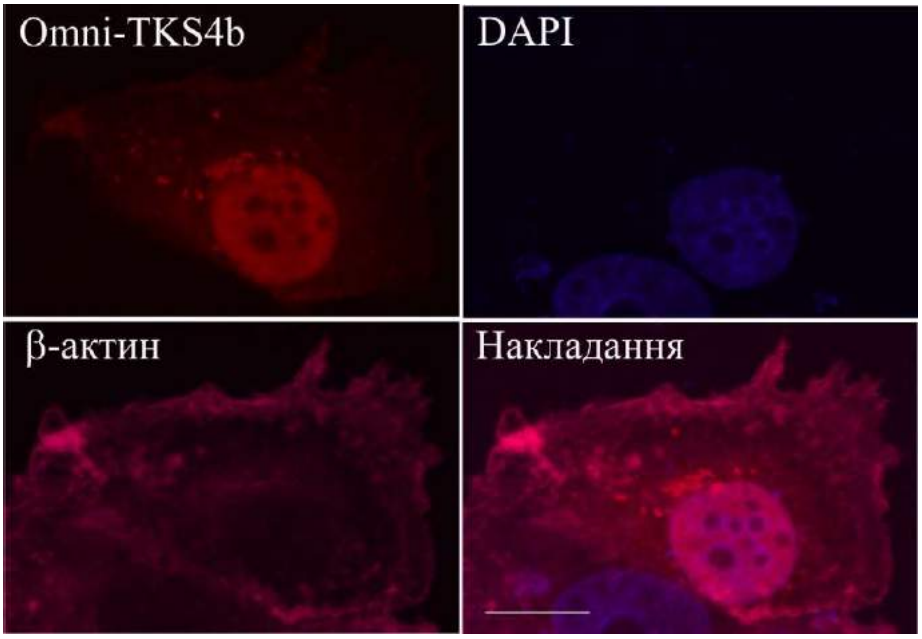

Рисунок 2.21 – Внутрішньоклітинна локалізація надекспресованого TKS4b в клітинах лінії MCF7. Протеїн TKS4b було детектовано за допомогою анти-omni антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами кон’югованими з Alexa Fluor-555. F-актин візуалізували за допомогою фалоїдину з Alexa Fluor-555. Масштабний відрізок – 15 мкм

Причому кількість ізоформи TKS4b в ядрі в клітинах лінії MCF7 приблизно в два рази більше порівняно з основною формою TKS4 (рисунок 2.22).

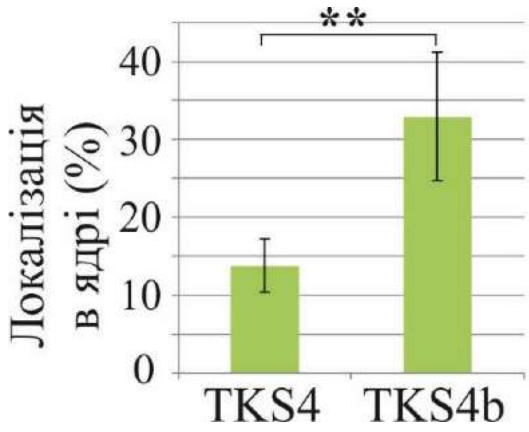

Рисунок 2.22 – Діаграма демонструє відсоткове значення інтенсивності сигналів протеїнів TKS4 та TKS4b в ядрі відносно їх загальної кількості в клітині. Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Стьюдента ** – $p \leq 0.01$

Також співлокалізації TKS4b з полімеризованим актином не спостерігали, на відміну від протеїну TKS4, який знаходиться в комплексі з актином та бере участь у перебудовах актинового цитоскелету. Співлокалізація ізоформи TKS4b із маркерами везикулярного транспорту продемонстрована нижче у розділі 2.17.

2.14 Дослідження локалізації протеїнів TKS4b та CR16 в інвадоподіях інвазивних клітин лінії MDA-MB-231

Протеїни CR16 та ізоформа TKS4b відносяться до протеїнів родин верпролінів та TKS, які беруть участь на різних етапах формування інвадоподій. Тому було зроблено припущення, що ізоформа TKS4b та CR16 також можуть бути компонентами інвадоподій.

Для дослідження локалізації TKS4b та CR16 в інвадоподіях було використано метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу. Моделлю для експерименту обрані клітини лінії раку молочної залози MDA-MB-231, що характеризуються високою інвазією та здатністю утворювати інвадоподії. Клітини лінії MDA-MB-231 культивували на скельцях, покритих тонким шаром желатину, міченого флуоресцеїном ізотіоціанатом (FITC). Потім було проведено транзієнтну трансфекцію із використанням генно-інженерної конструкції, що кодує omni-TKS4b. Через 12 годин клітини фіксували і

досліджувані протеїни детектували специфічними антитілами. Під час утворення інвадоподій, відбувається руйнування позаклітинного матриксу (в нашому експерименті – FITC-желатину), внаслідок чого з'являються чорні прогалини, де відсутній флуоресцентний сигнал (зелений) у желатині. В якості маркера інвадоподій були використані F-актин, кортактин та TKS5. Отримані результати імунофлуоресцентного аналізу свідчать, що ізоформа TKS4b співлокалізується з F-актином. Також спостерігається перекривання сигналів комплексу TKS4b та F-актину із сайтами деградації позаклітинного матриксу (темними прогалинами в желатині) (рисунок 2.23 А).

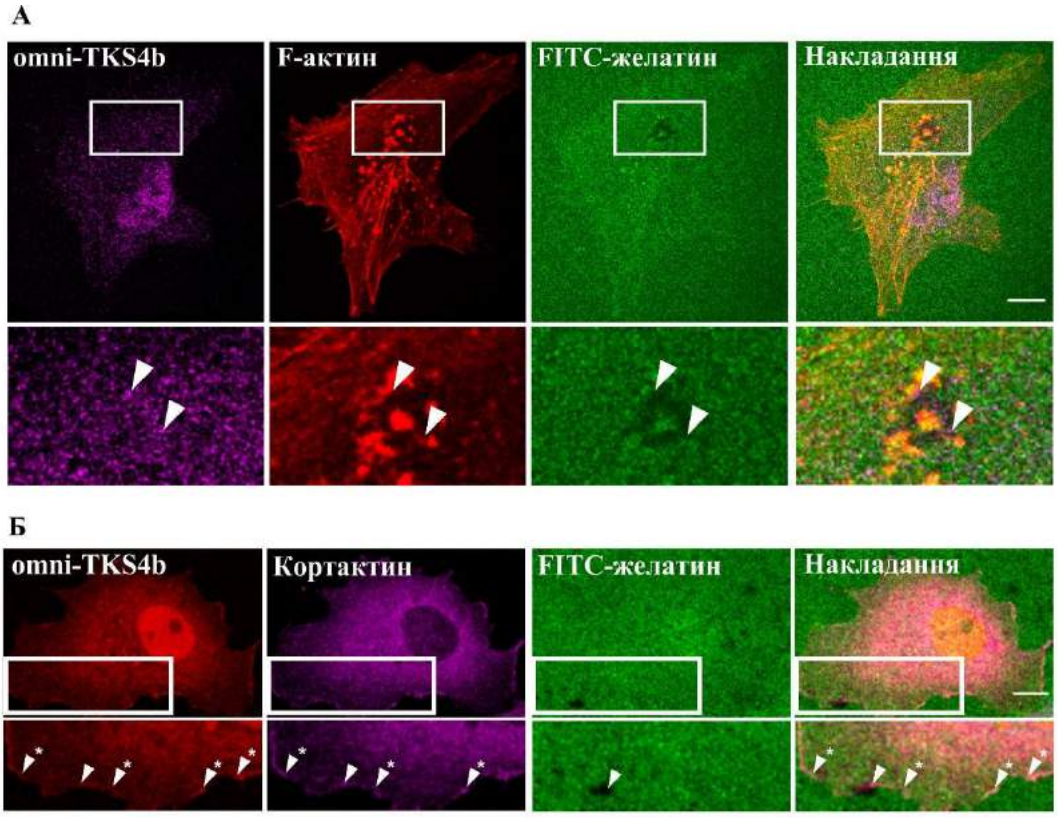

Рисунок 2.23 – Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації ізоформи TKS4b з маркерами інвазивних структур F-актином (А) та кортактином (Б) в інвадоподіях. Клітини лінії MDA-MB-231 було культивовано на скельцях, покритих тонким шаром FITC-желатину протягом чотирьох годин, після чого проведено транзієнтну трансфекцію omni-TKS4b протягом 12 годин. Клітини фіксували та детектували протеїн TKS4b за допомогою анти-omni антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-680 або Alexa Fluor-555 (Б). F-актин було візуалізовано за допомогою фалоїдину,

кон’югованого з Alexa Fluor-555. Кортактин детектували первинними антителами проти кортактину та вторинними кон’югованими з Alexa Fluor-680. Зірочкою відмічене співлокалізація TKS4b та кортактину. Масштабний відрізок – 10 мкм

Кортактин також розглядається як маркерний протеїн для інвадоподій. Він бере участь у активних перебудовах актинового цитоскелету. Основна роль кортактину в інвадоподіях полягає в забезпеченні секреції протеаз, тобто кортактин може здійснювати транспорт везикул і динамічну збірку актину для регулювання секреції протеаз у сайтах деградації позаклітинного матриксу [32]. Оскільки кортактин разом з TKS4 відіграють важливу роль на етапі дозрівання інвадоподій через регуляцію секреції та локалізації мембранних металопротеїназ, було досліджено співлокалізацію ізоформи TKS4b з кортактином. Результати імунофлуоресцентного аналізу переконливо показують, що протеїни співлокалізуються між собою та локалізуються в інвадоподіях. На рисунку 2.23 Б, відмічені білими стрілками приклади сигналів, що перекриваються, комплексу TKS4b/кортактин в інвадоподіях, тоді як приклади співлокалізації TKS4b та кортактину відмічені білими стрілками із зірочками.

Таким чином аналіз протеолітичної деградації позаклітинного матриксу продемонстрував локалізацію надекспресованого TKS4b в інвадоподіях та співлокалізацію з маркерами інвадоподій – F-актином та кортактином.

Подальші дослідження були присвячені вивченню внутрішньоклітинної локалізації CR16 в клітинах лінії MDA-MB-231. Результати імунофлуоресцентного аналізу виявили цитоплазматичне дисперсне розташування надекспресованого протеїну, що, на жаль, заважає визначенню його локалізації в інвадоподіях.

За даними літератури відомо, що CR16 зв’язується з низкою протеїнів-партнерів, що залучені до динамічних перебудов актинового цитоскелету та локалізації металопротеїназ, а саме: F-актином, N-WASP, SRC-кіназою та кортактином [30, 33]. Отже ці дані разом із нашими експериментальними

дослідженнями щодо наявності транскриптів *CR16* в інвазивних клітинах аденокарциноми грудної залози лінії MDA-MB-231 свідчать, що CR16 може брати участь у розвитку злоякісних новоутворень.

2.15 Дослідження впливу CR16 та TKS4b на везикулярний транспорт металопротеїназ

Інвадоподії складаються із актин-збагаченого ядра, оточеного F-актином, регуляторів полімеризації актину, скафолдних протеїнів та матричних металопротеїназ, які забезпечують деградацію позаклітинного матриксу. Матричні металопротеїнази (ММП) – це різноманітна родина цинк-зв'язувальних ферментів, які специфічно взаємодіють з різними протеїнами позаклітинного матриксу. Залежно від типу секреції металопротеїназ відбувається деградація колагену, фібронектину, ламініну та інших матриксних компонентів. Особливу увагу заслуговують желатинази ММП2, ММП9 та мембранного типу ММП-14, які вважаються ключовими ферментами у розвитку та розповсюджені пухлини (24). Регуляція протеолітичної активності металопротеїназ відбувається шляхом інтерналізації їх до клітини через клатрин-залежний та кавеолярний ендоцитоз. Після рециклінгу в ендосомах металопротеази можуть знову надходити за допомогою RAB4-позитивних везикул до плазматичної мембрани, зокрема в ділянки утворення інвадоподій, де відбувається їх секреція у позаклітинний матрикс шляхом екзоцитозу.

Оскільки результати проведених досліджень на даному етапі роботи показали, що протеїн CR16 може брати участь у RAB4-залежному рециклюванні ендосом, а також у кавеолярному та клатрин-опосередкованому ендоцитозах, було перевірено його співлокалізацію з ММП-14, ММП-2 та ММП-9. Отримані результати свідчать про часткову співлокалізацію CR16 із ендогенними ММП-14 та ММП-9 у цитоплазмі клітин лінії MCF7 (рисунок 2.24 А, В). Співлокалізаціїї між протеїнами CR16 та ММП-2 виявлено не було. Слід зазначити, що для ММП-2 характерно ядерне розташування в клітинах лінії MCF7, тоді як надекспресований CR16 локалізується в цитоплазмазмі (рисунок 2.242 Б).

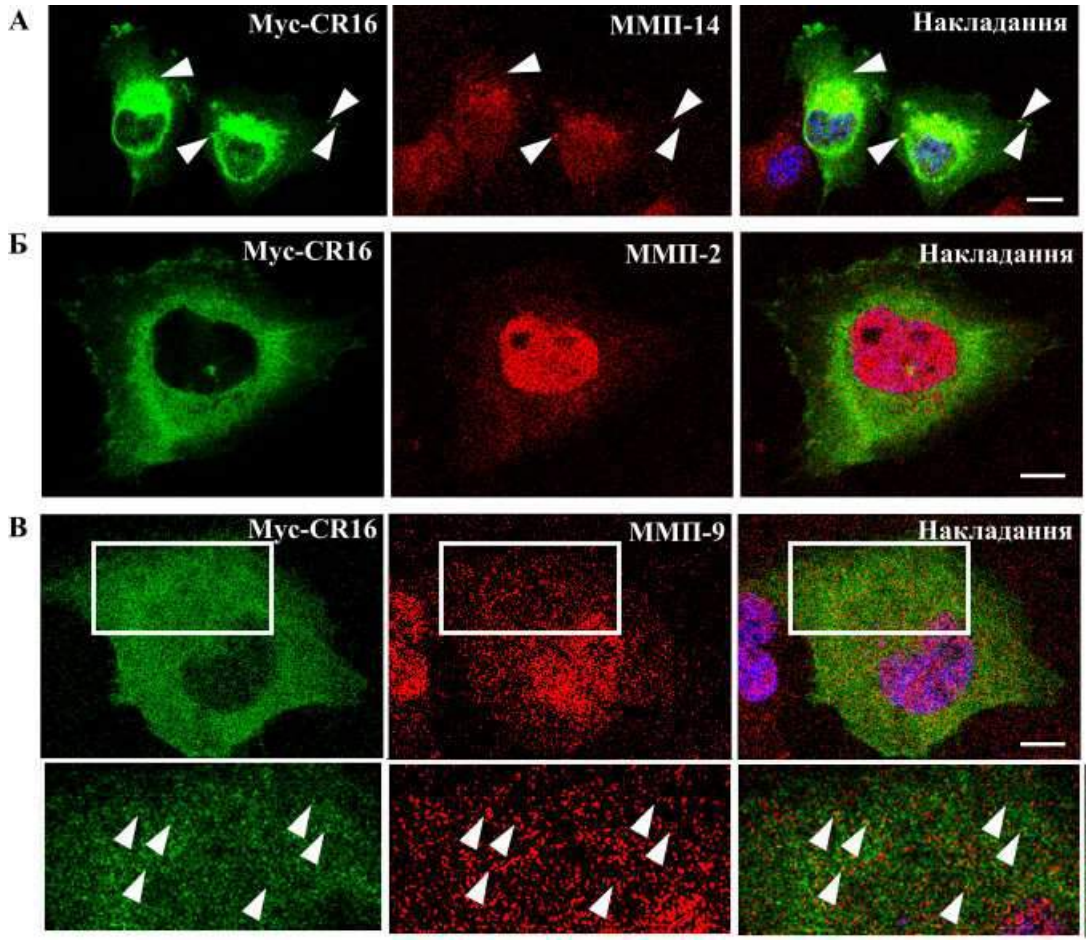

Рисунок 2.24 – Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації протеїну CR16 із ендогенними металопротеїназами ММП-14 (А), ММП-2 (Б) та ММП-9 (В). Клітини лінії MCF7 було трансфіковано конструкцією, що містила Myc-CR16, протеїн було детектовано за допомогою специфічних антитіл до Myc-тагу, з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-488. Ендогенні протеїни ММП-14, ММП-2 та ММП-9 детектували анти-ММП-14, анти-ММП-2 та анти-ММП-9 антитілами відповідно, з подальшою візуалізацією вторинними антитілами з Alexa Fluor-555. Масштабний відрізок – 10 мкм

За даними літератури відомо, що ключову роль у залучені мембранних ММП-14 до сайтів формування інвадоподій може відігравати скафолдний протеїн TKS4. При нестачі TKS4 утворюються незрілі інвадоподії, тому що не відбувається локалізації ММП-14 до цих структур, і як наслідок, пригнічується деградація позаклітинного матриксу [34].

Проведений на моделі аденокарциномних клітин лінії MCF7 зі транзієнтною експресією TKS4b імунофлуоресцентний аналіз продемонстрував цитоплазматичну та ядерну співлокалізацію TKS4b з ендогенними металопротеїназами типу ММП-9, що свідчить про можливу участь цього протеїну у внутрішньоклітинному транспорті ММП (рисунок 2.25). Не було виявлено співлокалізації між TKS4b та металопротеїназами ММП-14 і ММП-2 (дані не представлені).

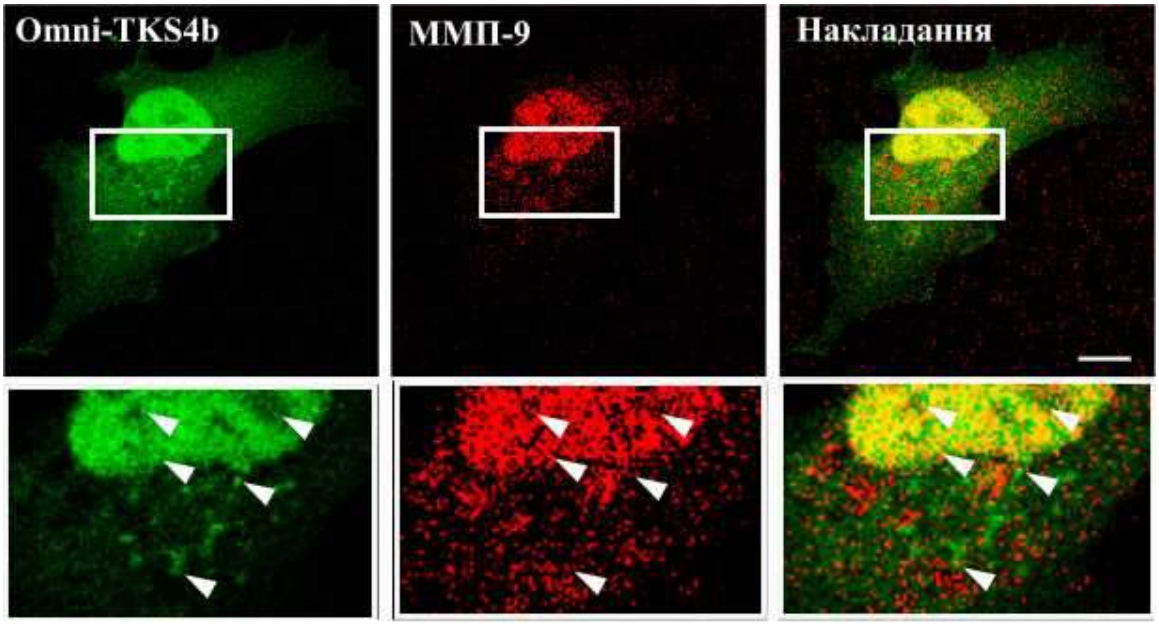

Рисунок 2.25 – Співлокалізація ізоформи TKS4b з металопротеїназами ММП-9. Клітини лінії MCF7 було трансфіковано Omni-TKS4b. Протеїн TKS4b детектували за допомогою анти-Omni антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-488. Масштабний відрізок – 10 мкм

Отже, встановлено, що в клітинах лінії раку грудної залози MCF7 надекспресований CR16 може частково співлокалізуватися з ендогенними мембранною ММП-14 та матричною ММП-9, тоді як TKS4b співлокалізується з ММП-9. Отримані дані вказують на асоціацію протеїнів TKS4b та CR16 із металопротеїназами, що беруть участь у формуванні інвадоподій та розповсюдженні інвазивних ракових клітин. Молекулярні механізми та роль протеїнів TKS4b та CR16 в інвазивних процесах клітини вимагають подальших

досліджень.

2.16 Аналіз впливу нокауту гена TKS4 на клатрин-опосередкований ендоцитоз у клітинах лінії MCF7

Клатрин-опосередкований ендоцитоз є важливим клітинним процесом, який регулює міграцію та метастазування ракових клітин. Він забезпечує інтерналізацію мембранних рецепторів ростових факторів та молекул адгезії, регулюючи сигнальні каскади клітини і модулюючи контакти між клітинами та позаклітинним матриксом [35].

Для виявлення участі протеїнів TKS4 і його ізоформи TKS4b в клатрин-опосередкованому ендоцитозі, було використано клітинні лінії MCF7 з нокаутом гена *TKS4*. За допомогою флуоресцентної мікроскопії в цих клітинах було проаналізовано поглинання флуоресцентно-міченого трансферину і його рецептора, інтерналізація якого відбувається клатрин-опосередкованим шляхом [22].

У клітинах із нокаутом гена *TKS4* інтерналізований трансферин розподілявся по усій цитоплазмі, що також спостерігалось у контрольних клітинах MCF7 без нокауту гена *TKS4* (рисунок 2.26).

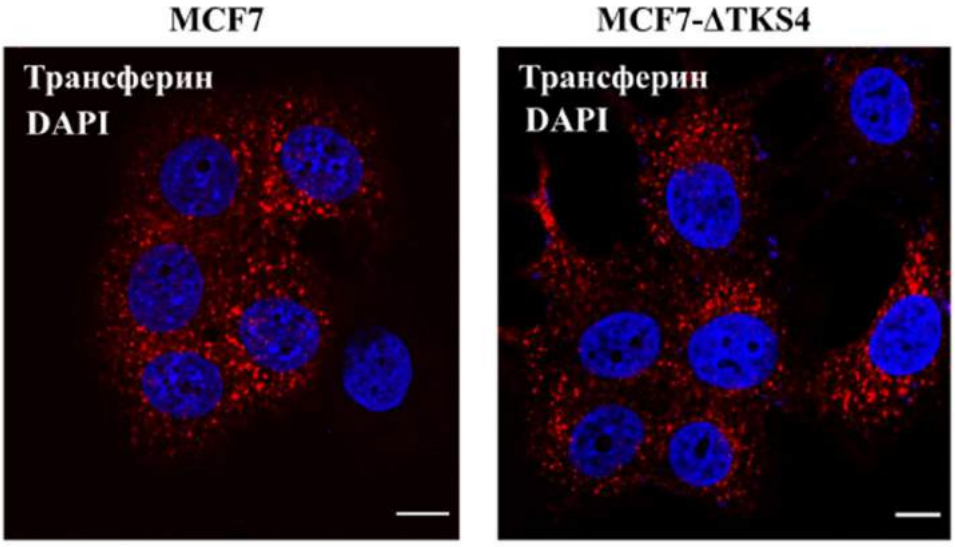

Рисунок 2.26 – Флуоресцентний аналіз розподілу інтерналізованого трансферину у клітинах MCF7 дикого типу та MCF7 з нокаутом гена *TKS4*

(MCF7ΔTKS4). Зазначені клітини інкубували із трансферином, кон'югованим із флуоресцентною міткою Alexa Fluor-633. Масштабний відрізок – 10 мкм

На наступному етапі було проаналізовано інтерналізацію трансферину за умов відновлення експресії TKS4 або його ізоформи TKS4b. Для цього в клітинах лінії MCF7 із нокаутом гена *TKS4* було проведено транзієнтну трансфекцію із використанням генно-інженерних конструкцій, що кодують GFP та GFP-злиті TKS4 і TKS4b (рисунок 2.27). В ході аналізу не було виявлено різниці між розподілом інтерналізованого трансферину у цитоплазмі клітин, що експресували зазначені рекомбінантні протеїни.

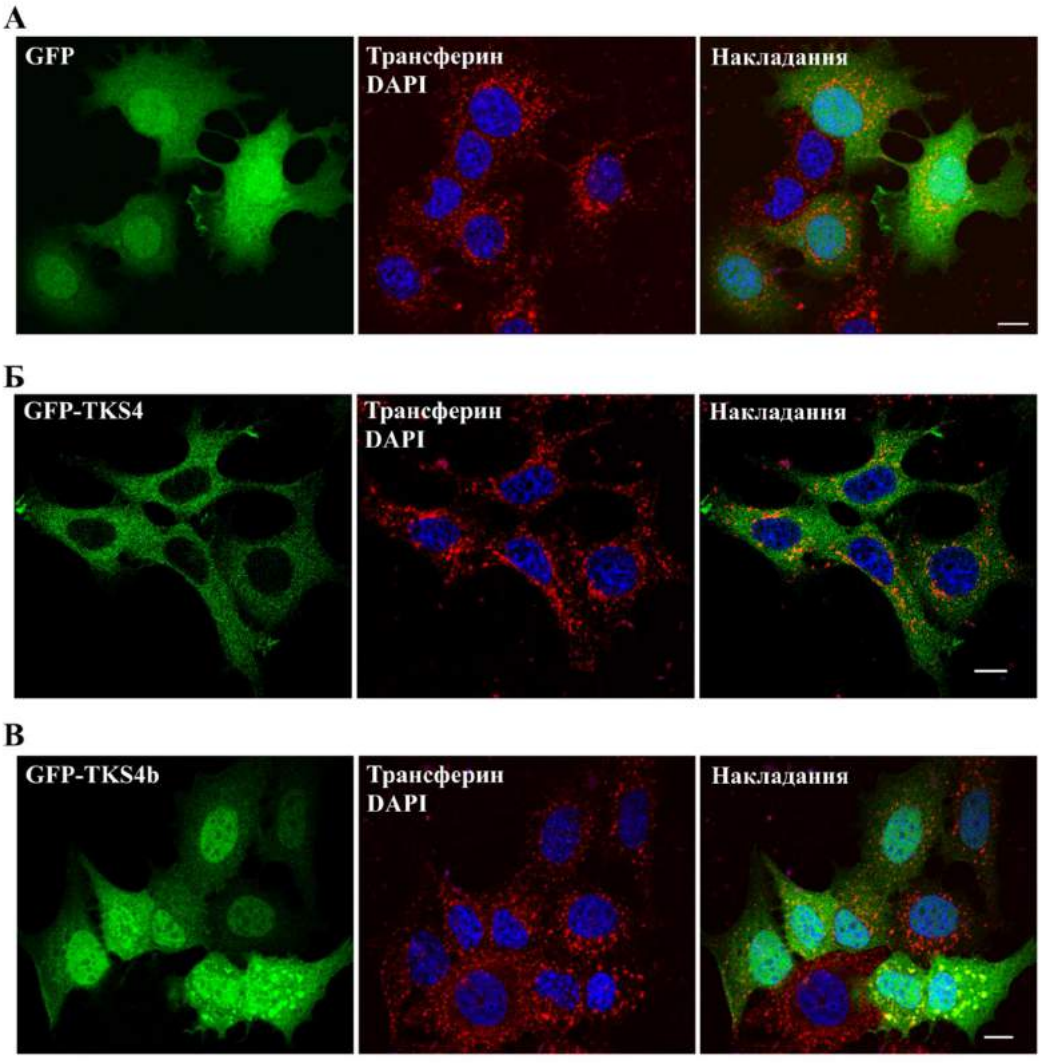

Рисунок 2.27 – Флуоресцентний аналіз розподілу інтерналізованого трансферину у клітинах лінії MCF7 з нокаутом гена *TKS4*, трансфікованих конструкціями, що експресували GFP (А), GFP-TKS4 (Б) або GFP-TKS4b (В).

Зазначені клітини інкубували із трансферином, кон'югованим із флуоресцентною міткою Alexa Fluor-633. Масштабний відрізок – 10 мкм

Далі було проведено порівняння інтенсивності флуоресцентних сигналів інтерналізованого трансферину у трансфікованих клітинах. В результаті статистичного аналізу отриманих даних не було виявлено достовірної відмінності між середніми показниками інтенсивності сигналів трансферину у клітинах, що експресували TKS4-GFP, TKS4b-GFP та GFP (рисунок 2.28).

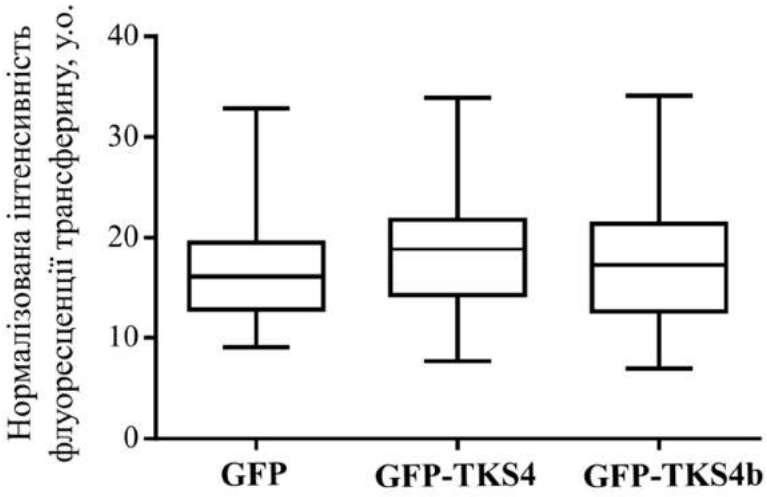

Рисунок 2.28 – Порівняльний аналіз інтенсивності флуоресценції інтерналізованого трансферину у клітинах лінії MCF7 з нокаутом гена *TKS4*, трансфікованих конструкціями, що експресували GFP, GFP-TKS4 або GFP-TKS4b. Проаналізовано 50 клітин у двох незалежних експериментах. Статистичний аналіз – One-Way ANOVA.

Отримані дані вказують на те, що TKS4 та його ізоформа TKS4b не впливають на клатрин-опосередкований ендоцитоз та інтерналізацію рецепторів, асоційованих зі мембраною, у клітинах лінії MCF7.

2.17 Виявлення співлокалізації між TKS4b, трансферином та маркерами ендосом

Не зважаючи на відсутність впливу протеїнів TKS4 і TKS4b на інтерналізацію трансферину і трансферинового рецептора клітинами MCF7, було виявлено, що рекомбінантний протеїн TKS4b-GFP співлокалізувався із інтерналізованим трансферином, міченим флуоресцентною міткою (рисунок 2.29). Значної співлокалізації між повнорозмірним TKS4 та трансферином виявлено не було.

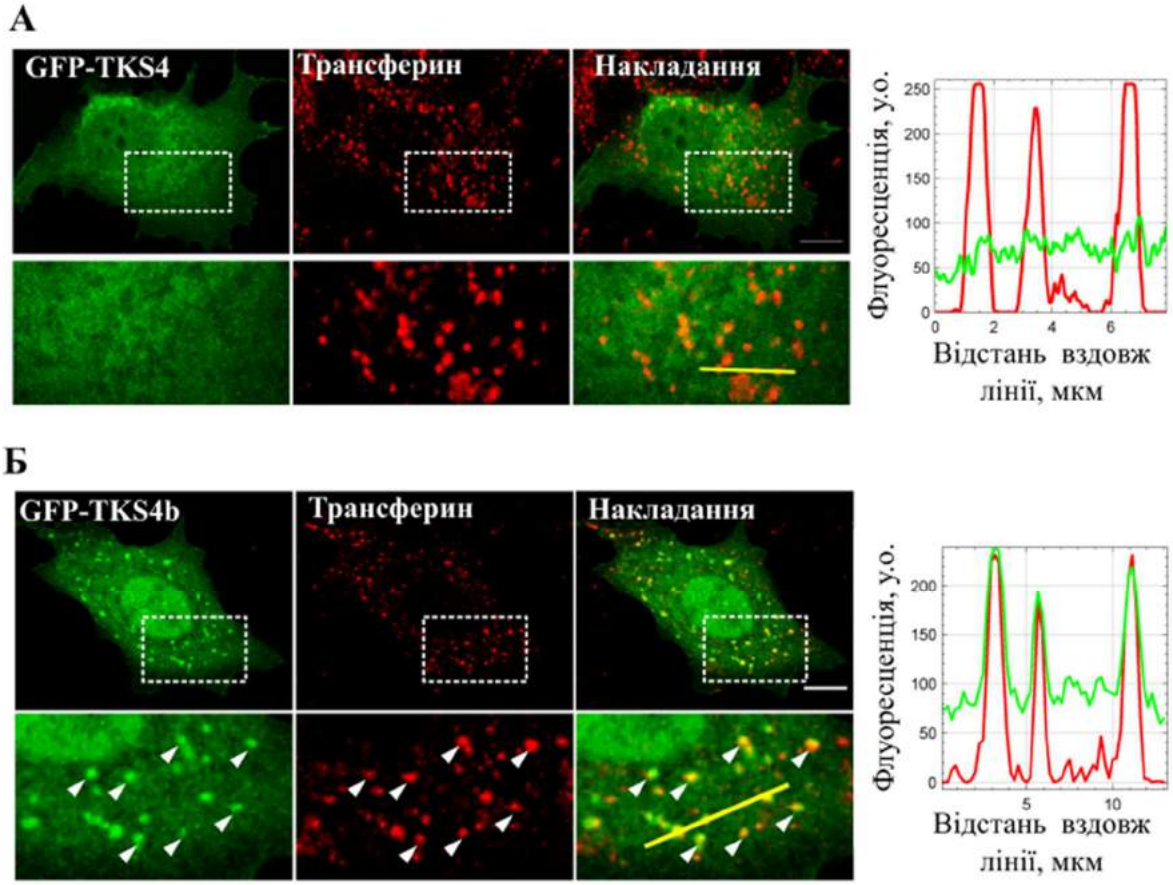

Рисунок 2.29 – Флуоресцентний аналіз співлокалізації інтерналізованого трансферину із TKS4 та TKS4b. Клітини лінії MCF7 із нокаутом гена TKS4 було трансфіковано GFP-TKS4 (А) і GFP-TKS4b (Б) та інкубовано із трансферином, кон’югованим із флуоресцентною міткою Alexa Fluor-633. Масштабний відрізок – 10 мкм. Графіки відображають рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії.

Відомо, що після інтерналізації трансферин та трансферриновий рецептор підлягають рециркуляції та поверненню на плазматичну мембрану або деградації в лізосомах. Як наслідок, трансферриновий рецептор та трансферин підлягають везикулярному транспорту в ендосомах різного рівня зрілості: ранніх ендосомах, сортувальних ендосомах, ендосомах рециркуляції та пізніх ендосомах [22].

Попередньо показано, що домен PX протеїна TKS4 та його ізоформи TKS4b взаємодіє переважно із фосфоліпідами ФІ(3,4)Ф та ФІ(3)Ф [19], які асоційовані із ендоцитозними везикулами та ранніми ендосомами [36]. Враховуючи виявлену співлокалізацію між TKS4b та трансферином і його можливу асоціацію із фосфоліпідами мембран, ми припустили, що TKS4b може співлокалізуватись із ендосомами та регулювати везикулярний транспорт клітини.

Для перевірки цього припущення у клітинах лінії MCF7 було проаналізовано співлокалізацію рекомбінантного omni-TKS4b, трансферином і маркерами везикул та ендосом відповідного типу, злитих із GFP (клатрин, RAB5, RAB4, RAB11 і TGN38) (рисунок 2.30-31).

Нами було виявлено часткову співлокалізацію omni-TKS4b і трансферину з маркером ранніх ендосом ГТФазою RAB5 (рисунок 2.30 А). Більш значну співлокалізацію було виявлено для omni-TKS4b і ГТФази RAB4 (рисунок 2.30 Б), яка асоційована із ранніми і сортувальними ендосомами та контролює перерозподіл вантажу шляхом швидкої рециркуляції.

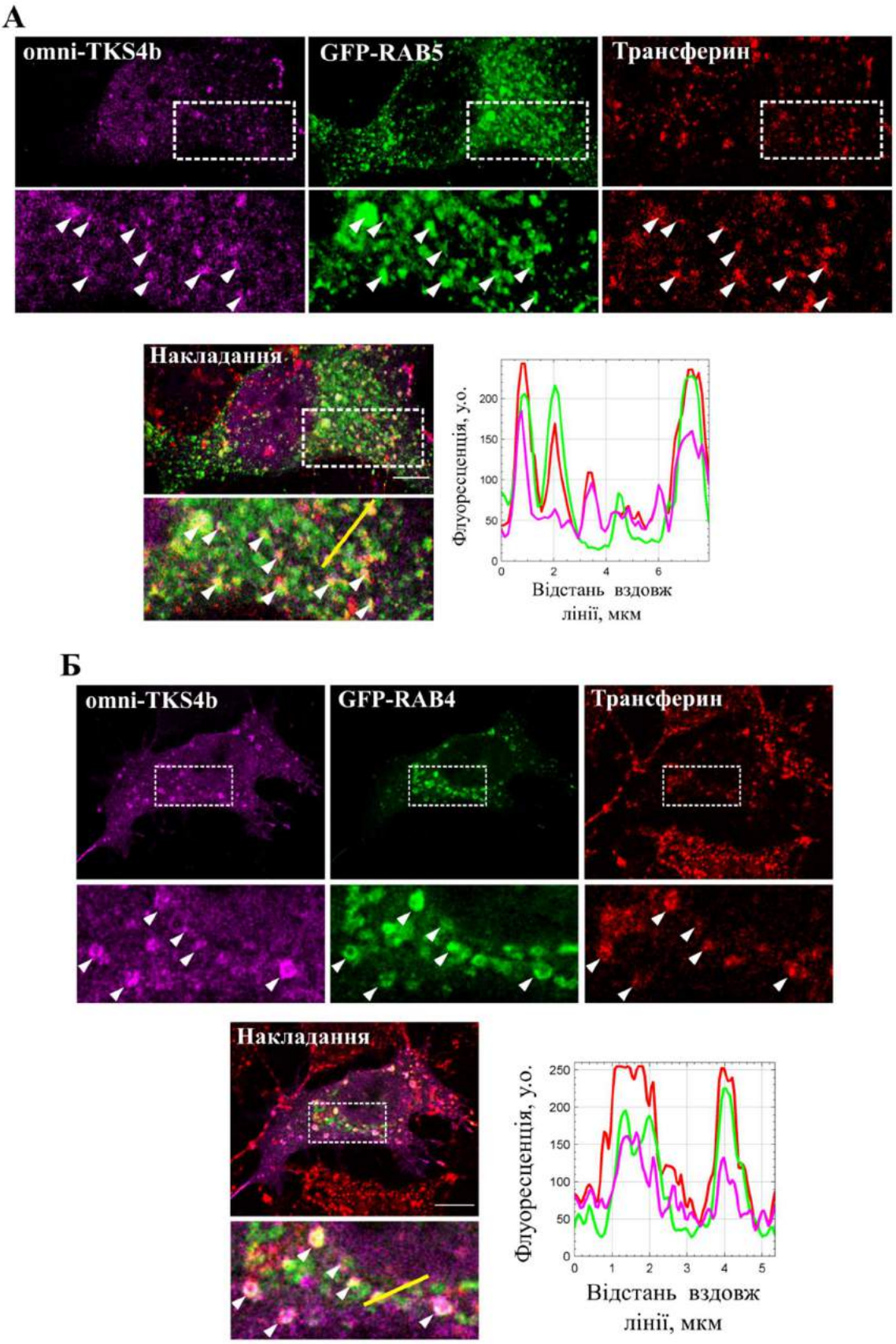

Рисунок 2.30 – Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації TKS4b із ГТФазами RAB5 і RAB4 та інтерналізованим трансферином. Клітини MCF7 було трансфіковано omni-TKS4b і GFP-RAB5 (А) або GFP-RAB4 (Б) та інкубовано із

трансферином, кон'югованим із флуоресцентною міткою Alexa Fluor-633. TKS4b, злитий із тагом omni, детектували відповідними антитілами з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-504. Масштабний відрізок – 10 мкм. Графік відображає рівень флуоресценції вздовж лінії.

Було виявлено також часткову співлокалізацію між TKS4b та протеїном TGN38, який є маркером транс-поверхні апарату Голджі (рисунок 2.31). Не було виявлено співлокалізації між TKS4b та ГТФазаою RAB11 і клатрином (дані не представлені).

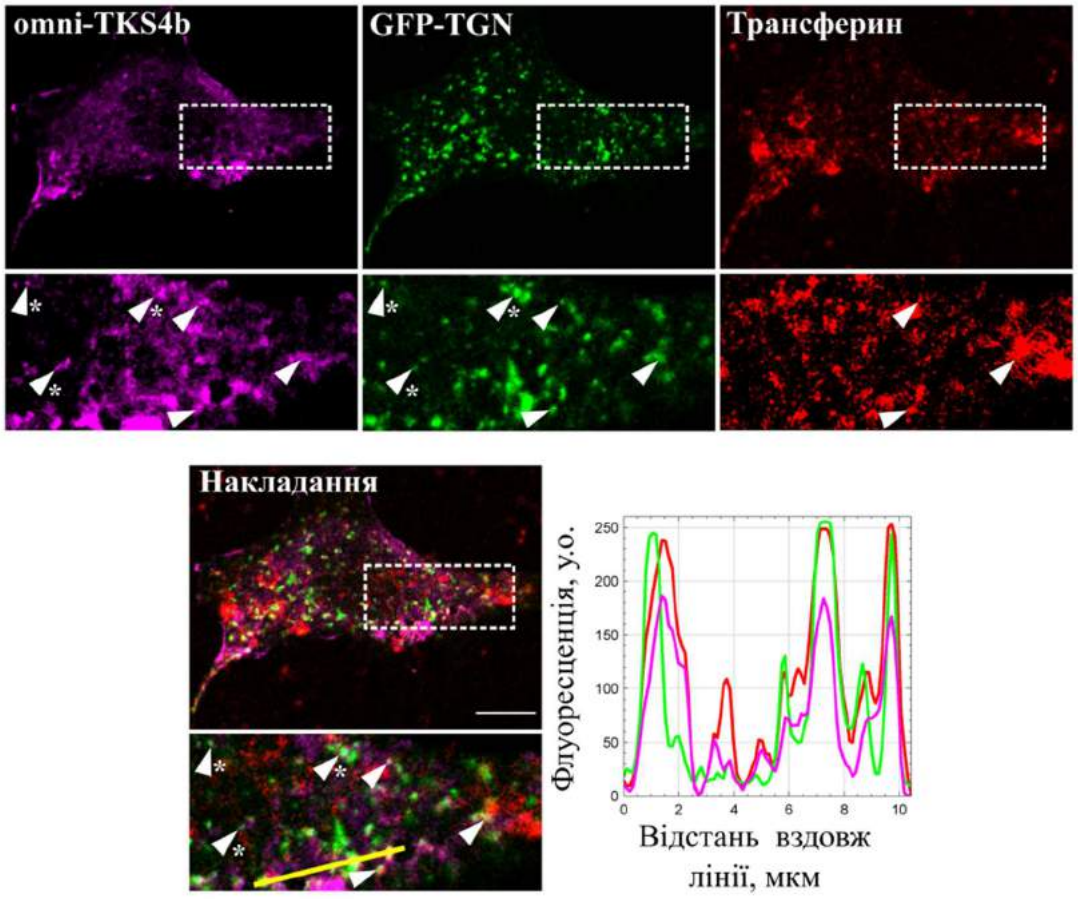

Рисунок 2.31 – Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації TKS4b із протеїном TGN38 та інтерналізованим трансферином. Клітини MCF7 було трансфіковано omni-TKS4b і GFP-TGN38 та інкубовано із трансферином, кон'югованим із флуоресцентною міткою Alexa Fluor-633. TKS4b, злитий із тагом omni, детектували відповідними антитілами з подальшою візуалізацією

вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-504. Масштабний відрізок – 10 мкм. Графік відображає рівень флуоресценції вздовж лінії

Для підтвердження виявленої асоціації між TKS4b та ендосомами було перевірено співлокалізацію GFP-міченого TKS4b із ендогенними маркерами ендосом, та іншими протеїнами, асоційованими із везикулярним транспортом, а саме: RAB5, EEA1, RAB11, RAB21, RAB31 та GOLGA1. З цією метою було проведено імунофлуоресцентний аналіз локалізації зазначених протеїнів у клітинах лінії MCF7 з використанням відповідних специфічних антитіл.

Було виявлено, що TKS4b співлокалізувався із маркерами ранніх ендосом протеїнами ГТФазою RAB5 (рисунок 2.32 А) та її ефектором протеїном EEA1 (рисунок 2.32 Б), тоді як співлокалізації з іншими проаналізованими протеїнами, асоційованими із ендосомами, виявлено не було (дані не представлені).

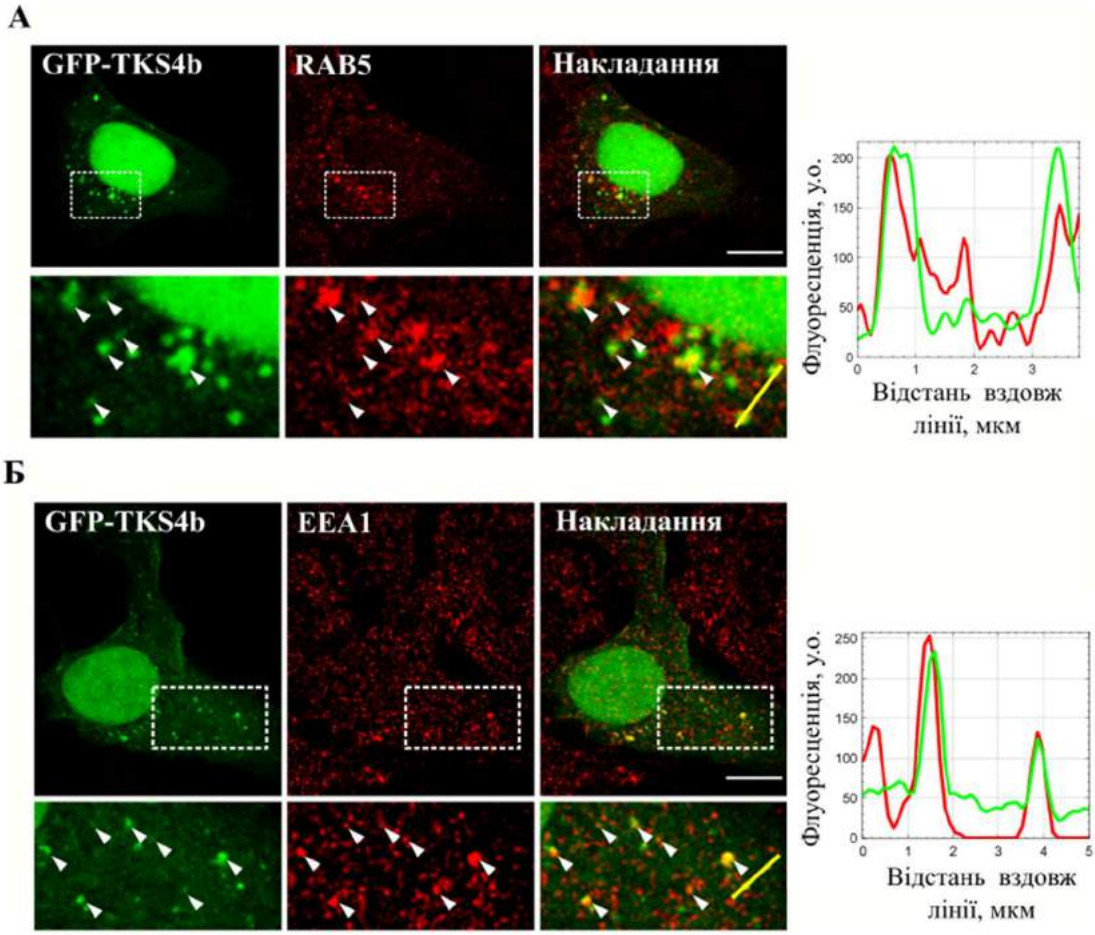

Рисунок 2.32 – Імунофлуоресцентний аналіз співлокалізації TKS4b із маркерами ранніх ендосом RAB5 (А) та EEA1 (Б). Клітини MCF7 було

трансфіковано GFP-TKS4b. Протеїни RAB5 та EEA1 детектували відповідними антитілами з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-594. Масштабний відрізок – 10 мкм. Графіки відображають рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії

Отже, встановлено, що в клітинах лінії раку грудної залози MCF7 протеїн TKS4b може співлокалізуватись із інтерналізованим трансферином та ГТФазою RAB5, її ефектором протеїном EEA1 і ГТФазою RAB4, які регулюють дозрівання ранніх ендосом та подальше сортування інтерналізованих рецепторів, а також із маркером транс-поверхні апарату Голджі протеїном TGN38. Отримані дані вказують на асоціацію TKS4b із ранніми і сортувальними ендосомами та участю цього протеїна у везикулярному транспорті ракових клітин. Молекулярні механізми та роль TKS4b у дозріванні ендосом вимагають подальших досліджень, які буду проводитись надалі.

2.18 Створення колекції тотальної РНК з пухлин грудної залози людини різних стадій злоякісності

З Національного Інституту Раку були отримані зразки пухлин грудної залози людини чотирьох типів: люмінального А, люмінального Б, тричі негативного та HER2-збагаченого, а також навколопухлинних тканин.

Поділ пухлин грудної залози на молекулярні типи базується на експресії рецепторів естрогену, прогестерону та епідермального фактору росту HER2/neu, а також низки інших маркерних генів. Проте, ці типи не є гомогенними за природою і складаються з підтипів, кожен з яких має свій паттерн експресії маркерних генів. Так, пухлини тричі негативного типу є найбільш різнорідною групою, що включає 8 різних підтипів з різними прогнозами. На основі аналізу експресії генів-маркерів та патогістологічних характеристик пухлини прогнозують її агресивність та ймовірність виникнення метастазів, після чого приймається рішення щодо застосування певних терапевтичних стратегій. Більш детальна інформація щодо молекулярної класифікації пухлин грудної залози людини представлена в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Класифікація пухлин раку грудної залози людини [21]

Тип	Підтип	Додаткові генетичні маркери		Прогноз
Люмінальний А ER^+PR^+HER2/neu^- ≈40-60%*		Низький Ki-67	$CK8/18^+$, $FOXA1^+$, ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1, $CK5/6^-$, $EGFR^-$	Сприятливий
Люмінальний В $ER^+PR^+HER2/neu^{+/-}$ ≈6-20%*	**Люмінальний В HER2$^-$** ER^+PR^+HER2/neu^- ≈15-20%*	Високий Ki-67	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B, $CK5/6^-$, $EGFR^-$, $TP53^-$	Проміжний
	Люмінальний В HER2$^+$ ER^+PR^+HER2/neu^+ ≈6%*			Негативний / Проміжний
HER2-збагачений ER^-PR^- $HER2/neu^+$ ≈10-20%*			$CK5/6^+$ $GRB7^+$, ERBB2, $EGFR^{+/-}$ $TP53^-$	Негативний
Тричі негативний ER^-PR^- $HER2/neu^-$ ≈5-25%*	**Аденоїдно-кістозна карцинома** ≈1%*	MYB-NFIB (злиття генів)	$EGFR^+$, $CK5/6^+$, $CK14^+$, $CK17^+$ $HER1^+$, Cyclin E^+, $CDKN2A^+$, KRT5, CDH3,	Сприятливий
	Медулярна карцинома ≈2%*			Сприятливий
	BRCA1-асоційований	$ID4^+$		Негативний

	Базальний ≈10-25%*	BRCA1^{-}, TP53^{-}, CDKN2A^{+}, RB1, FGFR2, маркери стовбурових клітин$^{+}$, CK5/6^{+}, EGFR^{+}	ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2, ITGB4	Негативний
	Низькоклаудиновий ≈7-14%*	GATA3 регулятори$^{-}$, гени клітинної адгезії, CDH1^{-}, клаудин$^{-}$, CK5/6$^{+/-}$, EGFR$^{+/-}$CD44^{+}, SNAI3^{+}		Негативний
	Метапластична карцинома ≈1%*	GATA3 регулятори$^{-}$, гени клітинної адгезії, PIK3CA^{-}, AKT^{-} або KRAS^{-}, EMT^{+}, маркери стовбурових клітин$^{+}$		Проміжний
	Апокринна карцинома			Проміжний
	Інтерферон-збагачений ≈10%*	STAT1^{+}, SP110^{+}, інтерферон-регулювальні гени$^{+}$		Проміжний

* - відсотоки прадставлені відповідно до [37-45].

Нами було виділено тотальну РНК з 67 зразків пухлин та навколопухлинних тканин раку грудної залози людини, з яких 14 з навколопухлинних тканин; 12 – з пухлин тричі негативного типу; 13 – з пухлин люмінального А типу; 11 – з пухлин люмінального Б типу та 17 – з пухлин HER2-збагаченого типу. Зразки для дослідження відбирали таким чином, щоб вони представляли не лише пухлини різних молекулярних типів, але і різних стадій і ступеню метастазування.

В таблиці 2.2 представлена клінічна інформація щодо отриманих нами зразків.

Таблиця 2.2 Клінічна інформація щодо зразків, використаних в роботі

Гістологічний тип зразків	Кількість зразків
Інвазивна карцинома	53
Навколопухлинні тканини	14
Стадія	
I	11
II	33
III	7
IV	2
TNM класифікація (**t**umor, **n**odus та **m**etastasis)	
T1	14
T2	36
T3	1
T4	2
N0	37
N1	10
N2	6
M0	52
M1	1
Рецепторний статус	
$ER^{+}PR^{+}HER2/neu^{-}$	13
$ER^{-}PR^{-}HER2/neu^{-}$	12
$ER^{+}PR^{+}HER2/neu^{+}$	11
$ER^{-}PR^{-}HER2/neu^{+}$	17

На рисунку 2.33 представлені електрофореграмми деяких із зразків тотальної РНК пухлин та навколопухлинних тканин раку грудної залози, які були отримані для оцінки якості і цілісності РНК.

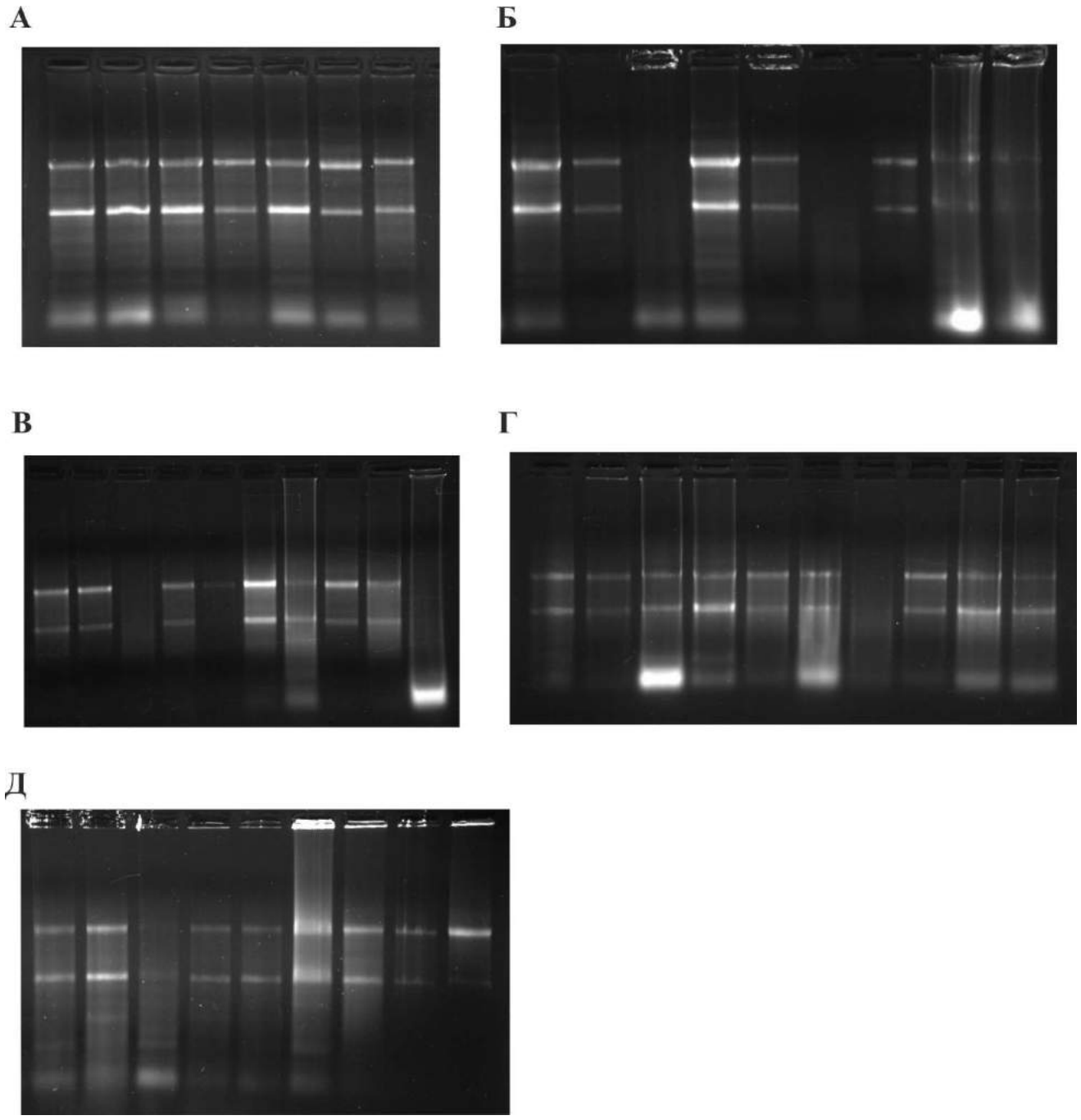

Рисунок 2.33 – Електрофореграмми тотальної РНК пухлин раку грудної залози людини. А – тотальна РНК з пухлини раку грудної залози людини люмінального А типу; Б – люмінального Б типу; В – тричінегативного типу; HER2-збагаченого типу; Д – навколопухлинних тканин

У зв’язку з тим, що для грудної залози характерна велика кількість жирової тканини, а також із різними об’ємами отриманого клінічного матеріалу не з усіх зразків було виділено тотальну РНК належної якості і достатньої кількості (пусті доріжки на електрофореграмах). Такі зразки не були включені в дослідження.

2.20 Підбір праймерів та проб для ЗТ-ПЛР

Для аналізу експресії генів на отриманих зразках тотальної РНК були підібрані набори олігонуклеотидів до мРНК генів, які кодують верпорліни *WIP* та *CR16*, а також до *TKS4* та його ізоформи *TKS4b.*

Оскільки проєкт передбачав дослідження рівнів експресії таргетних генів як в пухлинних тканинах порівняно із умовно-нормальними, так і між різними типами пухлинних тканин, в якості референсних генів необхідно було обрати такі, експресія яких була б відносно стабільною в здорових і трансформованих тканинах принаймні грудної залози людини. Тому нами було проведено пошук таких референсних генів та серед виявлених було обрано *TBP* та *PUM1*, для яких показано відносно стабільний рівень експресії в різних видах пухлин та нормальних тканинах, в тому числі і пухлинах грудної залози людини [46-48].

Праймери та проби були підібрані відповідно вимог до олігонуклеотидів для проведення ЗТ-ПЛР.

Параметри зонда:

- GC-склад: 20-80%.
- Температура плавління: 68-70^{O}C.
- Мінімум однакових нуклеотидів підряд (особливо G: не більше 4-х підряд).
- Обирати той ланцюг ДНК, на якому в пробі буде частіше зустрічатися C, ніж G.
- На 5'-кінці не має бути G.

Параметри праймерів:

- Розмір ПЛР-продукта 50-200 п.н.
- Температура плавлення: 58-60^{O}C.
- Довжина праймера: 20-30 п.н.
- GC-склад: 20-80%.
- Вторинна структура: по мінімуму.
- Димери: небажані.
- Мінімум G/C на 3'-кінці праймерів (не більше трьох з п’яти останніх нуклеотидів).

- Бажано щоб форвард та реверс були в різних екзонах.
- В залежності від завдань експеримента перевірити, щоб праймери були підібрані до всіх (більшості) ізоформ РНК гену чи до конкретної ізоформи, яка досліджується.

Послідовності отриманих праймерів та зондів представлені в пункті 1.6.

В якості фарбників для детекції продуктів ПЛР в реальному часі були обрані FAM, Hex та ROX, які є класичними фарбниками з гарними флуоресцентними показниками та сумісністю. В якості гасників використовувалися BHQ1 в парі з FAM та Hex, та гасник BHQ2 в парі з ROX.

Оскільки кожний з цих фарбників призначений для детекції у власному флуоресцентному каналі, використовували кілька пар праймерів в одній реакції (мультиплекс-ПЛР). Для перевірки отриманих праймерів було проведено ПЛР на кДНК клітин аденокарциноми грудної залози людини ліній MCF7 та MDA-MB-231. Як видно з рисунку 2.34 А, В, набір олігонуклеотидів до мРНК гена *TBP* має достатню для роботи ефективність, флюорисцентні криві мають правильну S-подібну форму, на відміну від кривих, отриманих при використанні набору олігонуклеотидів до мРНК гена *PUM1* (рисунок 2.34 Б, В), які не мали потрібної форми, що може свідчити про їх низьку ефективність.

Ефективність праймерів визначали методом калібрувальної кривої. Для цього готували серійні розведення кДНК із титром 1:10, 1:100, 1:1000. 1:10000, після чого проводили ПЛР за оптимальних умов. Усі реакції проводили у двох технічних повторах. Після цього рахували середнє значення Ct для кожного розведення. Далі будували калібрувальну криву: на вісі абсцис відкладали логарифм ступеню розведення, на вісі ординат – середнє значення Ct. Після цього обраховували нахил кривої. Далі обчислювали ефективність ПЛР за формулою $E = (10^{\frac{1}{S}}-1)*100$, де E – ефективність ПЛР, S – нахил кривої.

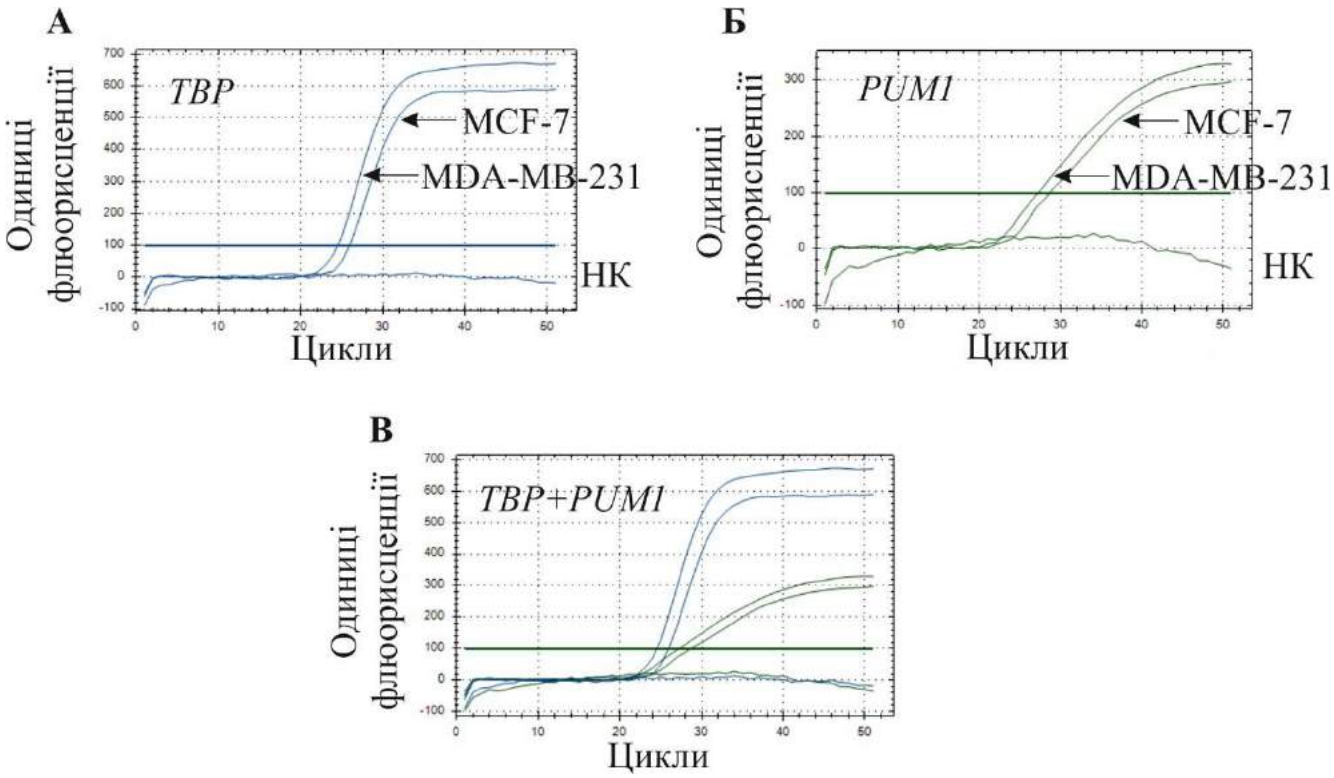

Рисунок 2.34 – Перевірка праймерів на кДНК MCF7 та MDA-MB-231 наборів олігонуклеотидів до мРНК “генів домашнього господарства” *TBP* та *PUM1*. А – набір олігонуклеотидів до *TBP*; Б – набір олігонуклеотидів до *PUM1*; В – одночасне використання наборів олігонуклеотидів до *TBP* та *PUM1*; НК – негативний контроль

В результаті нами були визначене значення ефективності праймерів для *TBP* – 105,35%, та для *PUM1* – 65,48%. Оскільки ефективність праймерів до *PUM1* була незадовільна, в роботі використовували лише праймери для *TBP.*

Аналогічно перевіряли інші набори олігонуклеотидів. Так, праймери для *TKS4* та *TKS4b* використовували як окремо, так і для мультиплекс-ПЛР без значної втрати їх ефективності (рисунок 2.35).

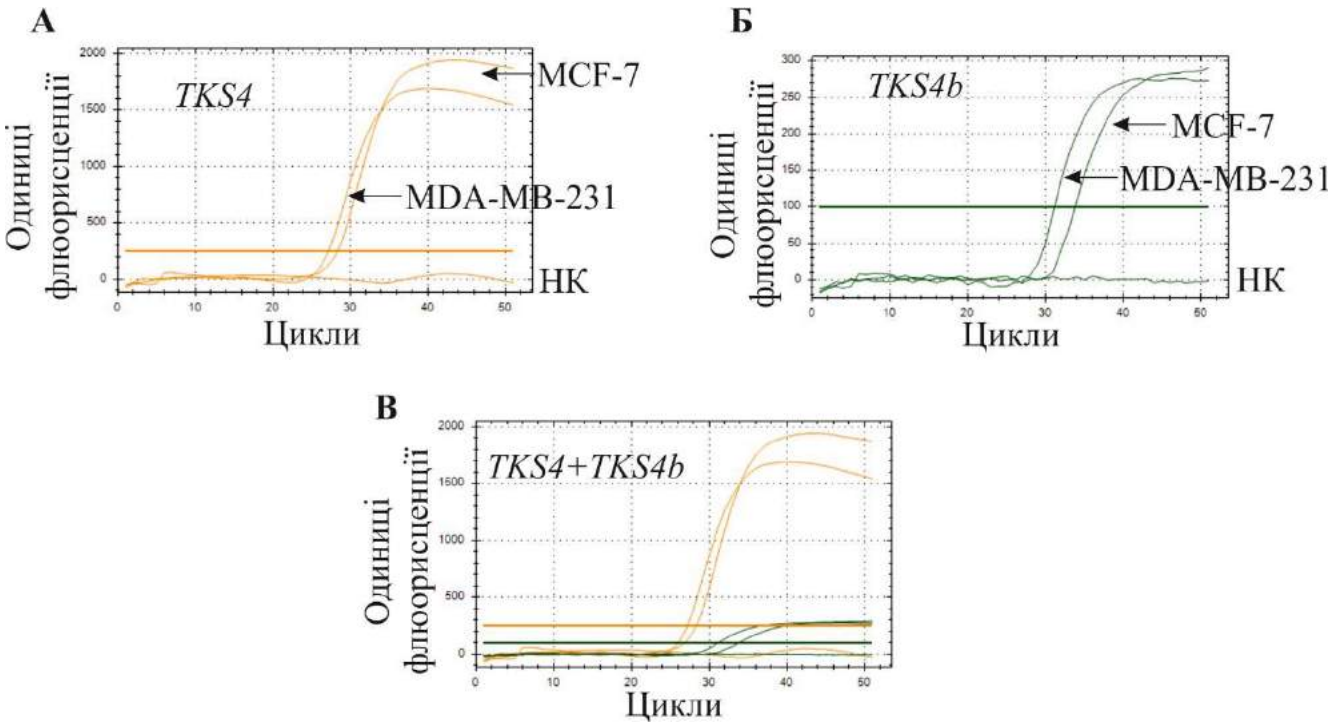

Рисунок 2.35 – Перевірка праймерів на до *TKS4* та *TKS4b* на кДНК MCF7 та MDA-MB-231. А – набір олігонуклеотидів до *TKS4*; Б – набір олігонуклеотидів до *TKS4b*; В – одночасне використання наборів олігонуклеотидів до *TKS4* та *TKS4b*; НК – негативний контроль

Праймери до верпролінів *WIP* та *CR16* (рисунок 2.36) використовували лише окремо через зниження їх ефективності при сумісному використанні.

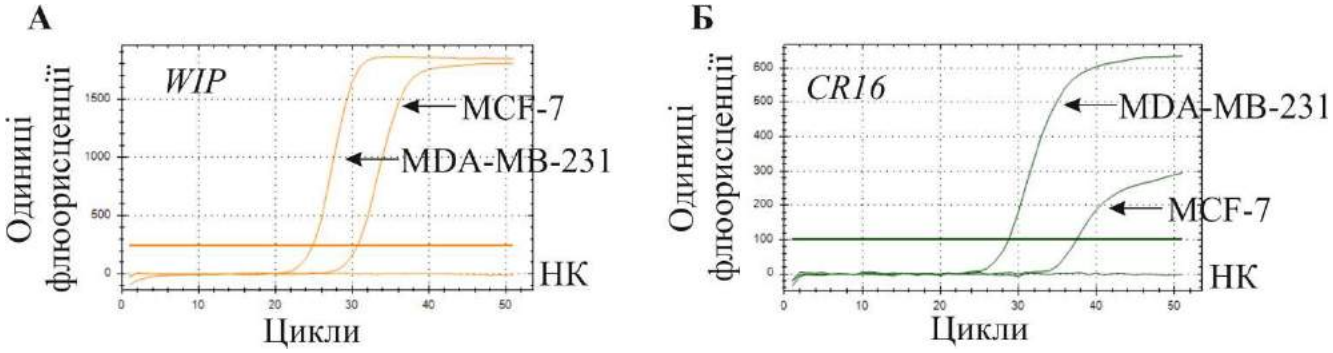

Рисунок 2.36 – Перевірка праймерів до верпролінів *WIP* та *CR16* на кДНК MCF7 та MDA-MB-231. А – набір олігонуклеотидів до *WIP*; Б – набір олігонуклеотидів до *CR16*; НК – негативний контроль

В ході роботи було визначено наступні ефективності праймерів до досліджуваних генів: *TKS4* – 83,35%, *TKS4b* – 127,39%, *WIP* – 98,21%, *CR16* – 100,71%, які далі використовували для обчислення відносного рівня експресії.

Отже, в результаті проведеної роботи були отримані праймери та зонди для дослідження рівнів експресії таргетних генів, а також визначено їх ефективність для подальших обчислень.

2.21 Аналіз експресії ізоформ мРНК гена *TKS4* та *TKS4b* в різних типах пухлин та навколопухлинних тканинах

Для аналізу експресії *TKS4* та *TKS4b* методом ПЛР в реальному часі було взято 14 зразків тотальної РНК з навколопухлинних тканин; 12 – з пухлин тричінегативного типу; 13 – з пухлин люмінального А типу; 11 – пухлин люмінального Б типу та 17 – пухлин HER2-збагаченого типу, які були виділені та описані вище.

Отримані результати вказують на те, що відносний рівень експресії *TKS4* достовірно збільшується приблизно в 3,5 рази у пухлинах грудної залози HER2-збагаченого типу в порівнянні з навколопухлинними тканинами (рисунок 2.37 А). Проте, достовірної різниці між рівнями його експресії серед інших типів пухлин виявлено не було.

Статистично достовірних відмінностей у зміні експресії транскриптів мРНК ізоформи *TKS4b* у досліджених типах пухлин грудної залози людини та навколопухлинних тканин також виявлено не було (рисунок 2.37 Б), проте, досить цікаво, що сумарна експресія *TKS4* змінюється в значно меншому діапазоні, ніж експресія *TKS4b.* Як видно з рисунку 2.37 Б, найбільший діапазон значень експресії *TKS4b* спостерігається в зразках HER2-збагаченого типу. Беручи до уваги той факт, що сумарна експресія *TKS4* достовірно збільшується саме в цьому типі зразків, можна припустити, що зміни експресії його ізоформ пов’язані з сигнальною трансдукцією через HER2, а не з гормональними сигналами, що потенційно може уточнювати деякі етіологічні аспекти.

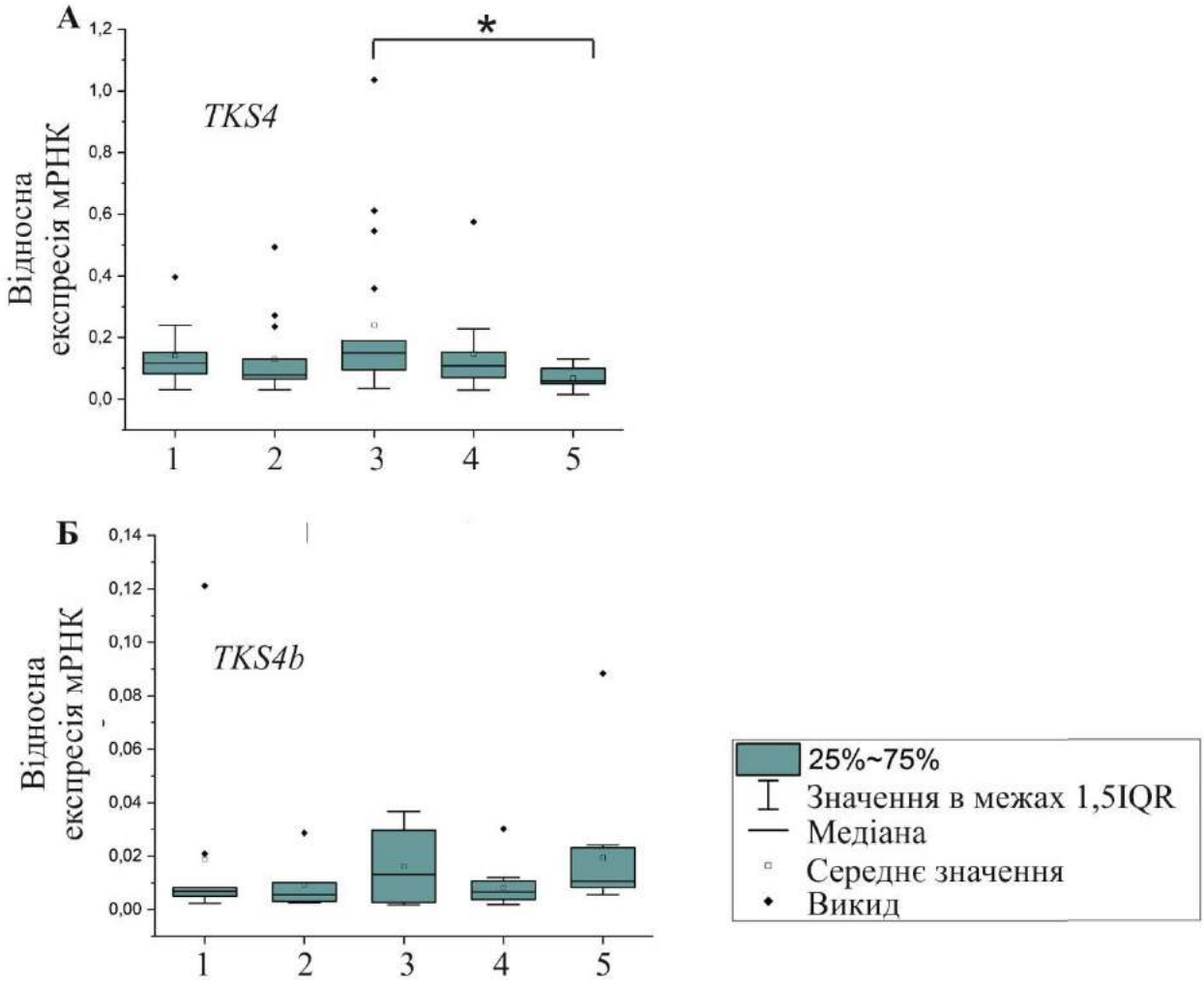

Рисунок 2.37 – Відносний рівень експресії *TKS4* (А) та *TKS4b* (Б) в зразках пухлин грудної залози людини. 1 – люмінальний А тип; 2 – тричі негативний тип; 3 – HER2-збагачений тип; 4 – люмінальний Б тип; 5 – навколопухлинні тканини. ∗ - $p<0.05$

Далі ми вирішили порівняти середні значення сумарних рівенів експресії *TKS4* (рисунок 2.38, сині стовпчики) та ізоформи *TKS4b* (рисунок 2.38, червоні стовпчики) і виявили, що *TKS4b* складає лише невелику частку від загальної кількості транскриптів, причому в навколопухлинних тканинах ця частка найбільша, тоді як в пухлинах всіх типів значно зменшується, досягаючи мінімального значення в пухлинах HER2-збагаченого типу (рисунок 2.38).

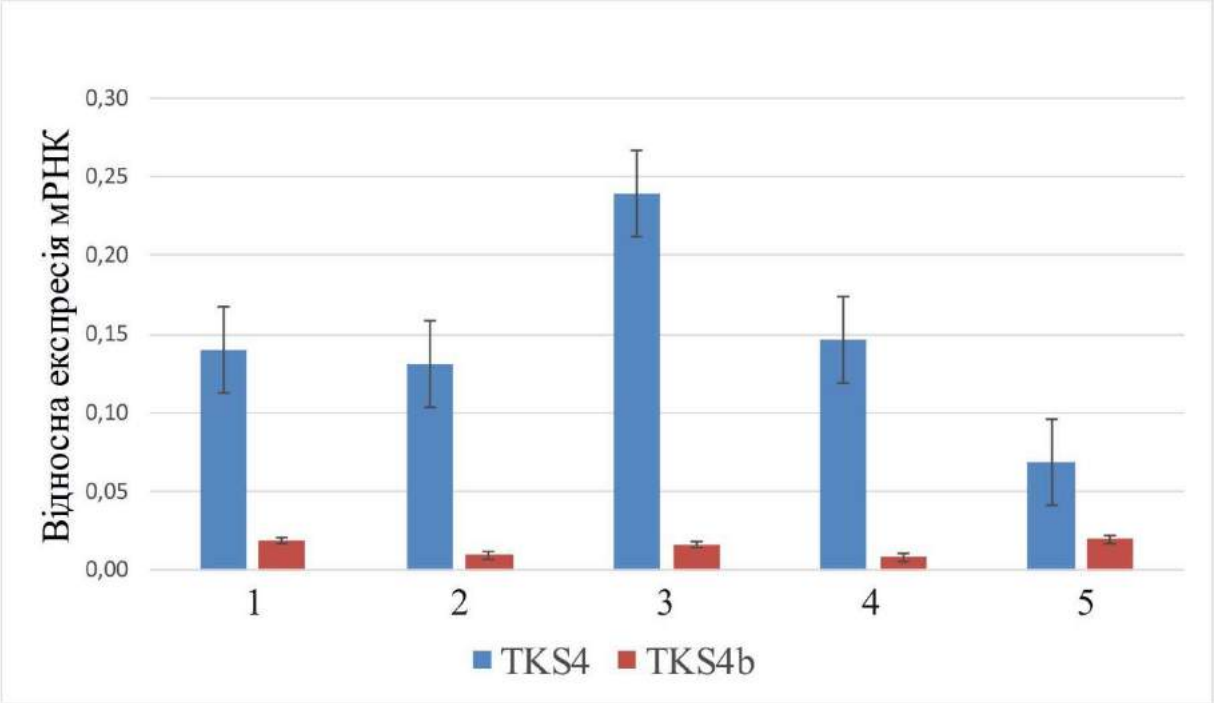

Рисунок 2.38 – Порівняння відносних рівнів експресії *TKS4* та ізоформи *TKS4b* в зразках пухлин грудної залози людини. 1 – люмінальний А тип; 2 – тричінегативний тип; 3 – HER2-збагачений тип; 4 – люмінальний Б тип; 5 – навколопухлинні тканини

Пухлини грудної залози людини HER2-збагаченого типу відносяться до інвазивних пухлин з несприятливим прогнозом. Як описано вище, TKS4 бере участь в утворенні інвазивних структур ракових клітин – інвадоподій, і підвищення експресії його транскриптів в пухлинах HER2-збагаченого типу може бути пов’язане саме з цим. Оскільки в даному дослідженні аналізували сумарний рівень експресії TKS4 та лише однієї його ізоформи TKS4b, можна припустити, що існує ще одна або кілька ізоформ TKS4, які суттєво змінюють свою експресію як порівняно з навколопухлинними тканинами, так і порівняно з іншими типами пухлин грудної залози. Якщо в подальших дослідженнях вдасться визначити таку ізоформу/ізоформи то її/їх можна буде потенційно використовувати в якості маркера злоякісності раку грудної залози людини HER2-збагаченого типу.

2.22 Аналіз експресії верпролінів *WIP* та *CR16* в пухлинах та навколопухлинних тканинах раку грудної залози

Аналіз верпролінів *WIP* та *CR16* проводили так само, як описано в попередньому пункті для ізоформ *TKS4* та *TKS4b*. В результаті досліджень з'ясовано, що статистично достовірних відмінностей в експресії *CR16* у досліджених типах пухлин грудної залози та навколопухлинних тканин людини не було виявлено (рисунок 2.39 А). Натомість, аналіз експресії *WIP* продемонстрував достовірне її збільшення у пухлинах грудної залози HER2-збагаченого типу порівняно з навколопухлинними тканинами (рисунок 2.39 Б).

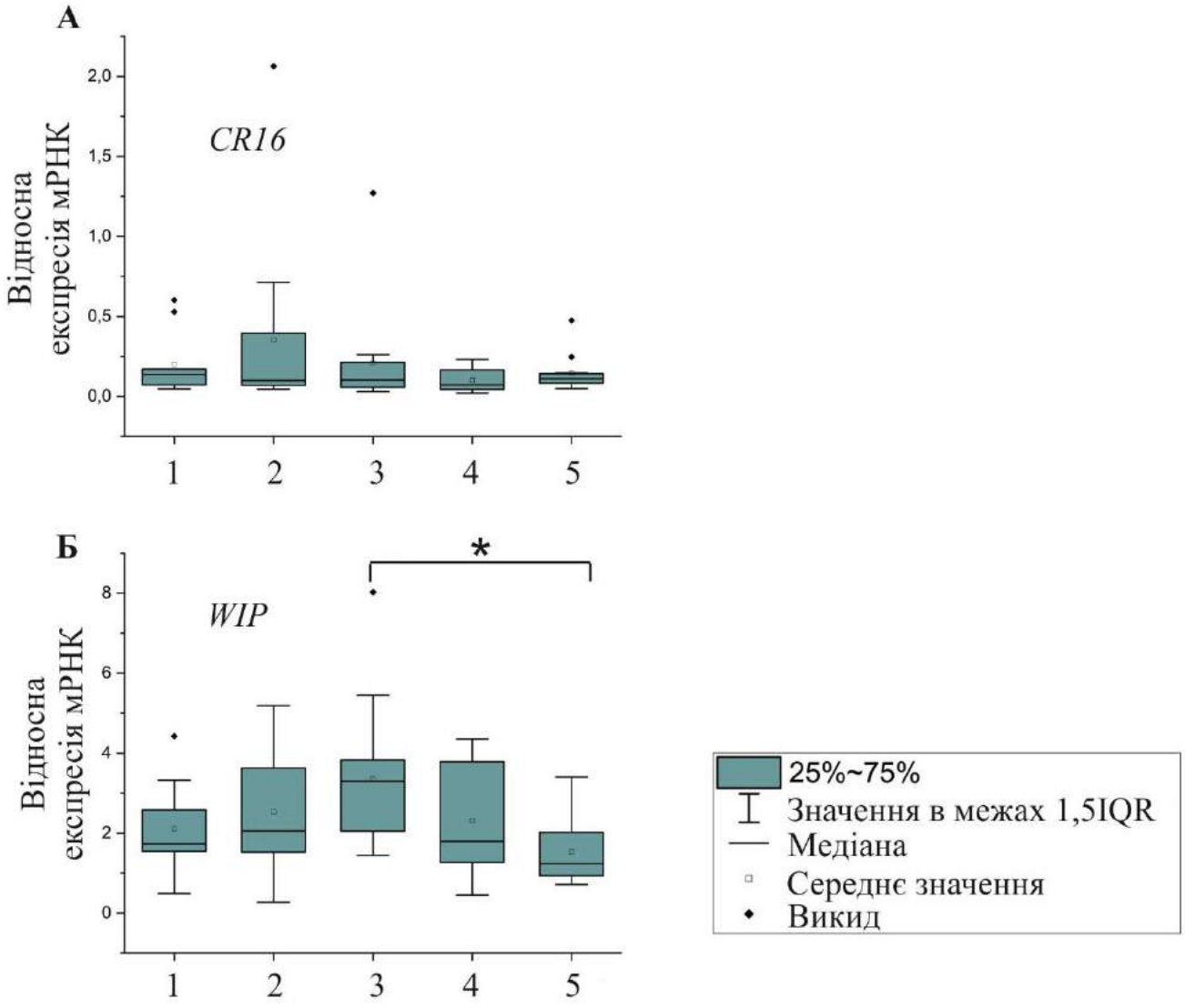

Рисунок 2.39 – Відносний рівень експресії *CR16* (А) та *WIP* (Б) в зразках пухлин грудної залози людини. 1 – люмінальний А тип; 2 – тричінегативний тип; 3

– HER2-збагачений тип; 4 – люмінальний Б тип; 5 – навколопухлинні тканини. ∗ - $p<0.05$

WIP, як і TKS4, відіграє критичну роль у формуванні інвазивних структур. Відомо, що в клітанах HER2-збагаченого типу раку молочної залози відбувається ампліфікація HER2 рецептору епідермального фактору росту при мінімальній експрсесії або відсутності рецепторів до прогестерону та естрогену. Зважаючи на те, що рівень експресії *WIP* та *TKS4* достовірно змінювався лише в цьому типі зразків (відносно умовно-нормальних зразків) можна припустити, що їх експресія стимулюється через HER2-залежні сигнальні шляхи.

Слід також зазначити, що для жодного з досліджуванеихї генів не було виявлено достовірних змін експресії серед різних типів пухлин. В деяких випадках при порівнянні різних груп пухлин ми отримували пограничні значення p. Зважаючи на це, ми вважаємо доречним в майбутніх дослідженнях збільшити вибірку таких зразків для уточнення результатів.

ВИСНОВКИ

Під час виконання проєкту виявлені нові функціональні зв'язки та посстрансляційні модифікації скафолдних протеїнів TKS4 та його ізоформи TKS4b, а також регуляторів актинових філментів WIP та CR16, що асоційовані з розвитком злоякісних пухлин. Охарактеризовано роль TKS4b та CR16 в деяких клітинних процесах. Показана підвищена експресія генів *WIP* та *TKS4* в пухлинах раку грудної залози людини HER2-збагаченого типу, завдяки чому їх можна запропонувати в якості діагностичних маркерів пухлин грудної залози людини.

1. Ідентифіковано нові протеїнові партнери WIP: протеїни ендоцитозу AMPH1 і BIN1 та сигнальні протеїни CRK, PLCγ1, GRB2, SRC.

2. Виявлено, що CR16 може *in vitro* формувати комплекси із протеїном ендоцитозу AMPH1, сигнальними протеїнами CRK, PLCγ1, NCK1, NCK2, GRB2 і SRC та актин-зв'язувальним протеїном CTTN.

3. Показано, що сигнальні протеїни NCK1, NCK2, SRC, CRK, PLCγ1 і GRB2 та ендоцитозні протеїни AMPH1 та BIN1 можуть взаємодіяти із адаптером TKS4 *in vitro*, тоді як GRB2 та TKS4 можуть формувати комплекс у клітинах MDA-MB-231.

4. Виявлено, що ізоформа TKS4b не взаємодіє із протеїнами ендоцитозу ITSN1, ITSN2, AMPH і BIN1 та сигнальними протеїнами SRC, CRK, GRB2 і PLCγ1, що може свідчити про йоо специфічні функції, відмінні від основної ізоформи TKS4.

5. Картовані мотиви зв'язування протеїна WIP з новими його партнерами: амінокислотні залишки 450-500 у структурі WIP важливі для взаємодії з BIN1; амінокислотні залишки 216-450 пролін-збагаченого домену WIP опосередковують взаємодію з AMPH1 і SRCn; численні сайти зв'язування вздовж усієї доменної структури WIP виявлені для протеїнів SRC, PLCγ1, GRB2, CRK.

6. Продемонстровано, що у клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF7 протеїн CR16 асоційований із клатрин- та кавеолін-вмісними везикулами, а також є компонентом RAB4-позитивних везикул.

7. Показано, що в клітинах лінії 293 може відбуватися SRC-залежне фосфорилювання залишків тирозину протеїна CR16. Фосфорилювання CR16 забезпечує його взаємодію з SH2-доменами протеїнів, а саме: адаптерними протеїнами NCK2 та CRK, кіназами ITK, FGR та FYN, а також регуляторною субодиницею кінази Pi3K.

8. Виявлено, що фосфорилювання ізоформи TKS4b може залежати від стимуляції форболовим ефіром, який активує сигнальні шляхи, що індукують формування інвадоподій.

9. Вперше показано, що клітини з надекспресією ізоформи TKS4b або CR16 характеризуються підвищеним рівнем рухливості та збільшеним проліферативним потенціалом клітин.

10. Вперше встановлена переважно ядерна локалізація ізоформи TKS4b в клітинах лінії MCF7 у порівнянні з основною ізоформою TKS4.

11. На інвазивних клітинах лінії MDA-MB-231 продемонстрована локалізація TKS4b в інвадоподіях та співлокалізація з маркерами інвазивних структур – F-актином та кортактином.

12. Виявлено часткову співлокалізацію CR16 з ендогенними металопротеїназами ММП-14 і ММП-9, а також протеїну TKS4b – з ММП-9.

13. Встановлено, що у клітинах лінії аденокарциноми грудної залози людини MCF7 протеїн TKS4 та його ізоформа TKS4b не впливають на клатрин-опосередкований ендоцитоз та інтерналізацію рецепторів, асоційованих з мембраною, зокрема рецептор трансферину.

14. Виявлено, що в клітинах лінії MCF7 протеїн TKS4b співлокалізується із інтерналізованим трансферином та ГТФазою RAB5, її ефектором EEA1, ГТФазою RAB4 та протеїном апарату Гольджі TGN38, що вказує на зв’язок ізоформи TKS4b з везикулярним транспортом та сортуванням мембранних рецепторів у ракових клітинах.

15. Створено колекцію зразків пухлин грудної залози та навколопухлинних тканин

16. Показано, що відносний рівень енкспресії 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.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАНЬ

1. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D.

2. Zubair M., Wang S., Ali N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. Frontiers in pharmacology. 2021; 11. 632079 p.

3. Courtneidge S. A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. Biochemichal Society Transactions. 2012; 40(1). 129-132 p.

4. Murphy D., Courtneidge S. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2011; 12 (7). 413-426 p.

5. Paz H., Pathak N., Yang J. Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis. Oncogene. 2014; 33. 4193-4202 p.

6. Lanyi A., Barath M., Peterfiet Z. *et al.* The Homolog of the Five SH3-Domain Protein (HOFI/SH3PXD2B) Regulates Lamellipodia Formation and Cell Spreading. PLoS ONE. 2011; 6(8). 1-14 p.

7. Flynn D. C. Adaptor proteins. Oncogene. 2011; 20, (44). 6270-6272 p.

8. Weaver A. M. Regulation of Cancer Invasion by Reactive Oxygen Species and Tks Family Scaffold Proteins. Sci. Signal. 2009; 2(88). 1-3 p.

9. Diaz B., Shani G., Pass I. *et al.* Tks5-Dependent, Nox-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species Is Necessary for Invadopodia Formation. Sci. Signal. 2009; 2(88). 1-3 p.

10. Albiges-Rizo C., Destaing O., Fourcade B. *et al.* Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. J. Cell Sci. 2009; 122(17) 3037-3049 p.

11. Birge R.B., Kalodimos C., Inagaki F. *et al.* Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological andpathological signaling. Cell Communication and Signaling. 2009; 7. 13 p.

12. García E., Jones G., Machesky L., Antón I. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. European Journal of Cell Biology. 2012; 91(11-12). 869-877 p.

13. García E., Ragazzini C., Yu X. *et al.* WIP and WICH/WIRE co-ordinately control invadopodium formation and maturation in human breast cancer cell invasion. Sci Rep. 2016; 6. 23590 p.

14. Ke Pan, Xiao-ting Liang, Hua-kun Zhang *et al*. Characterization of Bridging Integrator 1 (BIN1) as a Potential Tumor Suppressor and Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. MOL MED. 2012; 18. 507-518 p.

15. Yamaguchi H., Lorenz M., Kempiak S. *et al.* Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. The Journal of Cell Biology. 2005; 168(3). 441-452 p.

16. Kropyvko S., Gryaznova T., Morderer D., Rynditch A. Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. Biochemichal and Biophysical Research Communications. 2017; 484(4). 813-819 p.

17. Kim, L., Song, L., Haura, E. Src kinases as therapeutic targets for cancer. Nature Reviews Clinical Oncology. 2009; 6. 587-595 p.

18. Kudlik G., Takács T., Radnai L. *et al.* Advances in Understanding TKS4 and TKS5: Molecular Scaffolds Regulating Cellular Processes from Podosome and Invadopodium Formation to Differentiation and Tissue Homeostasis. International journal of molecular sciences. 2020; 21(21). 8117 p.

19. Buschman P. A., Bromann P., Cejudo-Martin *et al.* The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. Mol. Biol. Cell. 2009; 20(5). 1302-1311 p.

20. Gianni D., Taulet N., DerMardirossian C., Bokoch G.M. c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. Mol. Biol. Cell. 2010; 21(23). 4287-4298 p.

21. Kropyvko S., Tsyba L., Novokhatska O. *et al.* Expression of ITSN2 and TKS5 in different subtypes of breast cancer tumors. Biopolym. Cell. 2019; 35 (1): 21-29 p.

22. Mayle K., Le A., Kamei D. The intracellular trafficking pathway of transferrin. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1820(3). 264-281 p.

23. www.ncbi.nlm.nih.gov

24. Kinley A., Weed S., Weaver A. *et al*. Cortactin Interacts with WIP in Regulating Arp2/3 Activation and Membrane Protrusion. Current Biology. 2003; 13(5). 384-393 p.

25. Noy E., Fried S., Matalon O., Barda-Saad M. WIP Remodeling Actin behind the Scenes: How WIP Reshapes Immune and Other Functions. International Journal of Molecular Sciences. 2012; 13(6). 7629-7647 p.

26. Cortesio C., Perrin B., Bennin D., Huttenlocher A. Actin-binding Protein-1 Interacts with WASp-interacting Protein to Regulate Growth Factor-induced Dorsal Ruffle Formation. Molecular Biology of the Cell. 2010; 21(1). 186-197 p.

27. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science. 2015; 347(6220): 1260419.

28. Gryaznova T., Kropyvko S., Burdyniuk M. *et al*. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. Cellular signalling. 2015; 27(7). 1499–1508 p.

29. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013; 8(11). 2281-2308 p.

30. Ho H, Rohatgi R, Ma L, Kirschner M. CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001; 98(20). 11306-11311 p.

31. Frittoli E., Palamidessi A., Marighetti P. *et al.* A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. The Journal of Cell Biology. 2014; 206(2). 307-328 p.

32. Clark E., Whigham A., Yarbrough W., Weaver A. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. Cancer Res. 2007; 67(9). 4227-4235 p.

33. Suetsugu S., Banzai Y., Kato M. *et al.* Male-specific sterility caused by the loss of CR16. Genes to Cells. 2007; 12(6). 721-733 p.

34. Poincloux R., Lizarraga F., Chavrier P. Matrix invasion by tumor cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. Journal of Cell Science. 2009; 122. 3015-3024 p.

35. Mellman I., Yarden Y., Endocytosis and cancer. Cold Spring Harb Perspect, 2013; 5(12). a016949 p.

36. Wallroth A., Haucke V. Phosphoinositide conversion in endocytosis and the endolysosomal system. The Journal of biological chemistry, 2018; 293(5). 1526–1535 p.

37. Tang Y., Wang Y., Kiani M.F., Wang B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 2016; 16(5). 335-343 p.

38. Pourteimoor V., Mohammadi-Yeganeh S., Paryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. Tumour Biol. 2016; 37(11). 14479-14499 p.

39. Leidy J., Khan A., Kandil D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. Arch Pathol Lab Med. 2014; 138(1). 37-43 p.

40. Lam S.W., Jimenez C.R., Boven E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. Cancer Treat Rev. 2014; 40(1). 129-138 p.

41. Eroles P., Bosch A., Pérez-Fidalgo J.A., Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. Cancer Treat Rev. 2012; 38(6). 698-707 p.

42. Dai X., Xiang L., Li T., Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J Cancer. 2016; 7(10). 1281–1294 p.

43. Fusco N., Geyer F.C., De Filippo M.R. *et al.* Genetic events in the progression of adenoid cystic carcinoma of the breast to high-grade triple-negative breast cancer. Mod Pathol. 2016; 29(11). 1292-1305 p.

44. Schmidt M., Thomssen C., Untch M. Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer--Gene Expression Analysis. Oncol Res Treat. 2016; 39(3). 102-110 p.

45. Li D., Lai W., Fan D., Fang Q. Protein biomarkers in breast cancer-derived extracellular vesicles for use in liquid biopsies. Am J Physiol Cell Physiol. 2021; 321(5). C779-C797.

46. Drury S., Anderson H., Dowsett M. Selection of REFERENCE genes for normalization of qRT-PCR data derived from FFPE breast tumors. Diagn Mol Pathol. 2009; 18(2). 103-107 p.

47. Lyng M.B., Laenkholm A.V., Pallisgaard N., Ditzel H.J. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. BMC Cancer. 2008; 8. 20 p.

48. Radonić A., Thulke S., Mackay I.M. *et al*. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313(4). 856-862 p.