

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА**

ГОРАК ІРИНА РОМАНІВНА



УДК 577.112+576.32/36+576.322+616-006.6

**РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85 У КОНТРОЛІ МІГРАЦІЇ Й
ІНВАЗІЇ ПУХЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO* ТА *IN VIVO***

03.00.04 - біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Дробот Людмила Борисівна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач відділу сигнальних механізмів клітини

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук, професор
Риндич Алла Володимирівна,
завідувач відділу функціональної геноміки Інституту
молекулярної біології та генетики НАН України

доктор біологічних наук, професор
Гарманчук Людмила Василівна,
старший науковий співробітник кафедри біомедицини
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка.

Захист дисертації відбудеться “24” червня 2019 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано “__” травня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рак грудної залози характеризується найвищим показником смертності серед жінок у всьому світі через метастазування як основну причину невдачі лікування. На регуляторному рівні, розвиток агресивного фенотипу пухлин тісно взаємопов'язаний з перетворенням неінвазивних пухлинних клітин у стовбурово-подібні (Cancer Stem Cells, CSCs), зростанням терапевтичної стійкості та метастатичного потенціалу. Водночас, наявні терапевтичні стратегії лікування раку грудної залози, що включають комбінацію підходів, таких як хірургічні, хімотерапевтичні, радіотерапевтичні, «таргетну» терапію, значною мірою націлені на первинну пухлину, але є неефективними проти метастазів пухлини, викликаних CSCs. Досягнення останніх років у галузі молекулярної клітинної біології переконливо продемонстрували, що оборотний процес епітелійно-мезенхімного переходу (EMT), включаючи версію EMT, мезенхімно-амебоїдний перехід (MAT), є рушійною силою метастазування пухлинних клітин. Здатність пухлинних клітин епітелійного походження до взаємного перепрограмування/транс-диференціювання в ході EMT-MAT/AMT-MET, що не потребує додаткових генетичних змін, в даний час отримало загальну назву епітелійно-мезенхімної пластичності (ЕМП) (Friedl, 2004; Tsai and Yang, 2013; Campos-Sanchez and Cobaleda, 2015; Ye and Weinberg, 2015; Bhatia et al., 2017; Liao and Yang, 2017; O'Brien-Ball and Biddle 2017). Одними з основних ознак EMT є втрата E-кадгерину, який розглядається як маркер епітелійного диференціювання в дослідженнях EMT, та індукована експресія мезенхімного маркера віментину. Низка плеiotропних транскрипційних факторів, включаючи Snail, Twist, Slug і ZEB1/2, регулюють розвиток EMT у карциномних клітинах через пряме пригнічення експресії гена E-кадгерину, що було продемонстровано в інвазивних фронтах карцином (Valastyan and Weinberg, 2011). Набуття мезенхімно-амебоїдного міграційного фенотипу є передумовою для успішного розповсюдження пухлинних клітин, часто пов'язаного зі зниженням проліферації. Клітини, що екстравазували в органи-мішені, встановлюють тканиноспецифічне мікрооточення, необхідне для запуску процесів проліферації й ангиогенезу та формування вторинних вогнищ пухлинного росту, метастазів. Для ефективного росту метастатичних локусів необхідне зворотне відновлення до епітелійного фенотипу (MET) (Tsai et al., 2012).

Молекулярні стратегії, які оркеструють ЕМП, включають в себе залежні від контексту динамічні зміни складу позаклітинного середовища, наступне модулювання рецептор-залежних сигнальних мереж, які, у свою чергу, забезпечують точне регулювання епігенетичних подій, зміни у профілях експресії генів і мікроРНК, трансляційні і посттрансляційні модифікації, морфологію і поведінку клітин (Friedl and Wolf, 2003; Thiery and Sleeman, 2006; Takebe et al., 2011; Spano et al., 2012; Skoiverova et al., 2018).

Одними із основних компонентів сигнальних мереж клітин є адаптерні/риштувальні протеїни. Адаптерні/риштувальні протеїни характеризуються наявністю численних протеїно-/ліпідозв'язувальних доменів і мотивів, центрів для індукованої посттрансляційної модифікації і відсутністю каталітичних доменів. Враховуючи важливу роль адаптерних протеїнів у проведенні клітинних сигналів, цілком імовірно, що їх дисфункція може бути залучена до канцерогенезу.

Результати наших попередніх досліджень продемонстрували підвищення експресії SH3-вмісного адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85K) в аденокарциномах грудної залози, особливо в зонах інвазивного росту (Басараба і ін., 2009; Samoilenko et al., 2012). Встановлено, що стабільна надекспресія повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у слабо інвазивних аденокарциномних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 призводить до їх малігнізації, потенційно асоційованої з ЕМТ (Samoilenko et al., 2012).

Сказане визначає необхідність глибокого і всебічного вивчення Ruk/CIN85-опосередкованих молекулярних механізмів репрограмування пухлинних клітин, що забезпечують їх підвищену здатність до міграції, інвазії й наступного метастазування. Проведення досліджень у цьому напрямку дозволить не тільки з'ясувати роль адаптерних протеїнів у контролі ЕМП та ідентифікувати нові мішені для терапевтичного втручання, але й отримати нові моделі ліній клітин, придатні для пошуку й розробки протипухлинних препаратів та моніторингу ефективності їх дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. У роботі використані результати досліджень, отримані в рамках бюджетних тем "Механізми участі адаптерного/риштувального білка Ruk/CIN85 у регулюванні біологічних відповідей нормальних і трансформованих клітин" (№ держреєстрації 0110U002698, 2010-2014 рр.), «Сигнальні мережі, залежні від адаптерного протеїну Ruk/CIN85, у контролі проліферативного потенціалу, міграції й метастазування пухлинних клітин» (№ держреєстрації 0112U002624, 2015-2019 рр.). Робота виконувалась також у рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» за проектом «Клітини, ізольовані з постійних ліній пухлинних клітин у вигляді сфероїдів, що експресують деякі маркери стовбурових клітин, - як моделі для вивчення механізмів канцерогенезу та пошуку і розробки протипухлинних препаратів нового покоління» (№ держреєстрації 0110U005968, 2010-2014 рр.), в рамках спільного проекту «с-Myb and Ruk/CIN85 modulate the signaling in breast cancer thereby affecting metastasis», підтриманого Національною Науковою Фундацією Швейцарії (Проект SCOPES № IZ73Z0_152361, 2014-2017 рр.), та гранту ДФФД Ф83 для молодих вчених (№ держреєстрації 0118U005080, 2018 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*. Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати сублінії аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією/зниженою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
2. Охарактеризувати асоційовані з ЕМТ особливості поведінки клітин 4T1 (проліферативний потенціал, адгезивність, здатність до міграції й інвазії *in vitro*) залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях.
3. Проаналізувати рівні експресії генів, залучених до контролю ЕМТ в клітинах 4T1, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

методами кількісної RT-PCR, імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу.

4. Дослідити біохімічні та морфологічні маркери МАТ/МЕТ (активності металопротеїнази і лізилоксидази, продукування ангіостатинів та особливості організації актинового цитоскелету) в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85.

5. Встановити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі розвитку ознак, властивих раковим стовбуровим клітинам (експресію маркерів CSCs, формування мамосфер, ріст у напіврідкому агарі, хіміорезистентність).

6. Оцінити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у метастазуванні *in vitro* та *in vivo* (трансендотеліальна міграція, проникність капілярів легенів до барвника Evans Blue, ефективність колонізації легенів, метастазування в легені на моделі експериментального метастазування).

Об'єкт дослідження. Молекулярні механізми контролю міграції, інвазії й метастазування аденокарциномних клітин грудної залози.

Предмет дослідження. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку фенотипових і молекулярних ознак епітелійно-мезенхімної пластичності.

Методи дослідження: біохімічні, методи роботи з культурами клітин, культивування сфероїдів, ріст клітин у напіврідкому агарі, МТТ тест, дослідження міграційного потенціалу з використанням «подряпини» у клітинному моношарі, тести на інвазивність та трансендотеліальну міграцію з використанням модифікованої камери Бойдена, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, кількісна RT-PCR, конфокальна імунофлуоресцентна мікроскопія, тест на проникність капілярів легенів з фарбою Evans Blue, тест на ефективність колонізації легенів, тваринна модель для експериментального метастазування, морфологічний аналіз гістологічних зрізів.

Наукова новизна роботи. Вперше показано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є одним із ключових регуляторів епітелійно-мезенхімної пластичності у аденокарциномних клітинах грудної залози, забезпечуючи зворотне динамічне модулювання фенотипових і молекулярних ознак, асоційованих з ЕМП, залежно від рівня його експресії. Зокрема, встановлено, що надекспресія Ruk/CIN85 у аденокарциномних клітинах грудної залози миші лінії 4T1 призводить до пригнічення їх проліферативної активності, зниження адгезивності, посилення росту, незалежного від прикріплення до субстрату, підвищеної рухливості, інвазивності та хіміорезистентності, розвитку ознак CSCs та змін у ЕМТ-залежній транскрипційній програмі *in vitro*, а також посилення екстравазування пухлинних клітин та росту метастазів *in vivo*. Водночас, down-регулювання Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 супроводжується втратою пластичності завдяки індукції диференціювання і формування стабільного епітелійного фенотипу. Отримані дані про здатність Ruk/CIN85 спричиняти системні ефекти на транскрипційному рівні є цілком новими. Вперше продемонстровано, що в клітинах 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 спостерігаються узгоджені зміни в рівні експресії низки генів, необхідних для формування змішаного мезенхімно-амебоїдного фенотипу. Встановлено найважливіші зміни, необхідні для підтримки амебоїдного типу інвазивності: зниження експресії (і активності) MMP-2, MMP-9 та катепсину D,

інтегрину $\beta 1$, а також підвищення рівня експресії й активності лізилоксидази, формування примембранного актинового кільця та вип'ячувань плазматичної мембрани («блебів»), що забезпечує потенціал для ефективної міграції й інвазії клітин за умов пригніченого навколоклітинного протеолізу й клітинної адгезії. Вперше показано, що підвищені рівні експресії й активності MMP-2 і MMP-9 в клітинах 4T1 зі зниженою експресією Ruk/CIN85 корелюють з підвищеним продукуванням ангіостатинів та пригніченим інвазивним потенціалом

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про роль адаптерних протеїнів у канцерогенезі, зокрема роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку фенотипових і молекулярних ознак, асоційованих з епітелійно-мезенхімною пластичністю. Результати транскрипційного профілювання генів в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 вказують на те, що даний адаптерний протеїн може слугувати прогностичним маркером пухлинного процесу і потенційною мішенню для розробки фармакологічних препаратів, скерованих на інгібування пластичності аденокарциномних клітин. Створені клітинні технології (стабільні сублінії з надекспресією Ruk/CIN85), здатні забезпечити підтримання активності CSCs *in vitro* протягом тривалого часу, можна рекомендувати для впровадження у практику біотехнологічних компаній для оцінювання ефективності новітніх протипухлинних препаратів та широкомасштабного скринування малих молекул і бібліотек siRNA на предмет вибіркового знищення CSCs та клітин з гібридним мезенхімно-амебоїдним фенотипом. Разом, результати проведених досліджень дозволяють вважати адаптерний протеїн Ruk/CIN85 як залежний від концентрації важливий регулятор ЕМП при раку грудної залози, що відкриває нові можливості для терапевтичного втручання. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в загальному курсі «Молекулярна біологія клітини» та спецкурсі «Сигнальні механізми клітин» для студентів університетів зі спеціальностей «біохімія», «молекулярна біологія», «біотехнологія».

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковим керівником, розроблено програму проведення досліджень, вибрано методи розв'язання поставлених завдань та самостійно, або в деяких випадках спільно з іншими працівниками, виконано представлені у роботі експерименти. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводились спільно зі співробітниками відділів сигнальних механізмів клітини та хімії і біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, лабораторії морфології ендокринної системи Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України, Інституту фізіології Цюрихського університету (м. Цюрих, Швейцарія) та відділу експериментальної біології Університету Масарика (м. Брно, Чеська республіка). Дослідження метастатичного потенціалу *in vivo* клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 на моделі експериментального метастазування та ефективності екстравазування за допомогою тестів на проникність капілярів легенів до барвника Evans Blue і формування резистентних до 6-тіогуаніну колоній проведено спільно з к.б.н., н.с. Шитіковим Д.

В. і к.б.н., н.с. Петуховим Д. М.; дослідження впливу надекспресії Ruk/CIN85 на динаміку міграції й інвазії клітин 4T1 з використанням приладу xCELLigence RTCA DP Instrument та дослідження ефективності трансендотеліальної міграції клітин 4T1 з надекспресією та пригніченою експресією Ruk/CIN85 - спільно з PhD Кнопфовой Л. (Університет Масарика, Брно, Чеська республіка) та PhD Борсігом Л. (Цюрихський університет, Цюрих, Швейцарія); дослідження ролі Ruk/CIN85 у контролі здатності клітин 4T1 формувати сфероїди та визначення активності матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 методом желатинової зимографії - спільно з к.б.н., н.с. Пасічник Г.В.; одержання субліній клітин 4T1 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 - спільно з пров. інж. Геращенком Д. С., к.б.н., н.с. Пасічник Г. В., к.б.н., н.с. Петуховим Д. М.; морфологічний аналіз зразків легенів з метою дослідження впливу Ruk/CIN85 на метастазування клітин лінії 4T1 – спільно з д.б.н. Воскобойник Л. Г. (Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України); Вестерн-блот аналіз продукування ангіостатинів клітинами 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 – спільно з к.б.н., с.н.с. Тихомировим А. О.; визначення активності альдегіддегідрогенази і лізілоксидази – спільно з к.б.н., н.с. Латишко Н. В. і пров. інж. Гудковою О. О. Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертації були представлені на міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” у 2015 і 2015 рр. (Львів, Україна), Конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» у 2014-2018 рр. (Київ, Україна), 4 Українському Конгресі клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014 р.), 11 Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014 р.), 39 та 41 Конгресі FEBS (Париж, Франція, 2014 р., Кушадасі, Туреччина, 2016 р.), конференції для молодих вчених (Київ, Україна, 2015 р.), міжнародній конференції «Досягнення в клітинній біології та біотехнології» (Львів, Україна, 2015 р.), Міжнародній науковій конференції молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, Україна, 2015 р.), міжнародній науковій конференції «Інтегровані клініко-патогенетичні підходи до діагностики та терапії раку» (Київ, Україна, 2016 р.), 10 та 11 Парнасівській конференціях (Вроцлав, Польща, 2016 р., Київ, Україна, 2018 р.), VASTRAIN/ 3 Шведсько-Українській конференції з онкологічних захворювань (Стокгольм, Швеція, 2017 р.), лекційному курсі FEBS по онкометаболізму (Фігуейра да Фоз, Португалія, 2017 р.), міні-симпозіумі «Нові тенденції в дослідженні раку та протипухлинних вакцин» (Київ, Україна, 2017 р.), 14 конференції «Горизонти в молекулярній біології» (Геттінген, Німеччина, 2017 р.), міжнародній конференції "Нормальні та ракові стовбурові клітини: відкриття, діагностика та терапія" (Київ, Україна, 2017 р.), симпозіумі «Фундаментальні принципи біотерапії раку» (Київ, Україна, 2018 р.), конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, Україна, 2018 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 30 робіт, які включають 5 статей у фахових виданнях, патент на корисну модель та тези 24 доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, конгресах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: анотація, вступ, аналітичний огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та

обговорення досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновки, додатки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 176 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 30 рисунками та 3 таблицями. Список використаної літератури охоплює 317 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури висвітлено сучасний стан проблеми організації і функціонування сигнальних мереж клітин за нормальних фізіологічних умов та при канцерогенезі. Приведено дані стосовно участі адаптерних протеїнів у канцерогенезі, контролі інвазивності та метастазування пухлинних клітин та застосування адаптерів як мішеней для протипухлинної терапії. Особлива увага приділена аналізу ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у реалізації клітинних відповідей в нормальних і пухлинних клітинах. Детально охарактеризовано сучасні уявлення про епітелійно-мезенхімну пластичність, яка лежить в основі інвазії й метастазування пухлинних клітин.

Матеріали та методи досліджень

У дисертаційній роботі для Вестерн-блот аналізу та конфокальної флуоресцентної мікроскопії використано такі антитіла і реагенти: поліклональне антитіло до SH3A домену Ruk (Mayevska et al., 2006), поліклональне антитіло проти K1-3 фрагмента плазміногену щура (Guzyk et al., 2016), моноклональні антитіла проти віментину («Sigma», США), Е-кадгерину («Cell Signaling», США), Ki67 («Santa Cruz Biotechnology, Inc.», США), β -актину («Sigma», США), анти-мишачі та анти-кролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Promega», США) та з флуорохромом AlexaFluor488, AlexaFluor594 («Invitrogen», США), кон'югований з FITC фалоїдин («Sigma», США), розчини для ECL детекції («Amersham», Велика Британія).

Для ізолювання РНК, зворотної транскрипції і кількісної ПЛР використовували наступні праймери і реагенти: набір для ізолювання тотальної РНК innuPREP RNA mini Kit («Analytik Jena AG», Німеччина), оліго-дТ(18) праймер, праймери до мРНК генів миші Sh3kbp1, Vim, Cdh1, Twist1, Snai1, Zeb1, Zeb2, Lcn2, Myb, Klf17, Tjp1, Icam1, Tgfb1, Fn1, Itgb1, Cfl1, Il1a, Tnfa, Il6, Ccl2, Cxcl5, Mmp2, Mmp9, Mmp13, Mmp14, Ctsnd, Plau, Plaur, Serpine1, Cd44, Cd24, Pou5f, Klf4, Sox2, Muc, Nanog, Id1, Lox, Loxl2, Gapdh («BioLabTech Ltd», Україна), створені на основі бази NCBI Gene за допомогою програмного забезпечення Oligo 7, набори для синтезу кДНК RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit та кількісної ПЛР Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix («Thermo Scientific», США).

Для отримання субліній клітин 4T1, які стабільно надекспресують повнорозмірну форму Ruk/CIN85, зазначені клітини трансфікували вектором pRc/CMV2-Ruk₁ за допомогою кальцій-фосфатної преципітації. Відбір клонів проводили за присутності селективного антибіотика генетицинусульфату G418 (1 мг/мл). Селекцію стабільних трансфектантів і їх субклонування здійснювали протягом 3-ох місяців. Для отримання субліній клітин 4T1 з пригніченим рівнем

експресії Ruk/CIN85, їх інфікували Ruk/CIN85-специфічним shRNA-лентивірусом (R22) (Самойленко та ін., 2013). Селекцію клітин проводили за присутності пуроміцину в концентрації 10 мкг/мл протягом 3 тижнів з наступним субклонуванням. Для отримання відповідних контрольних субліній, клітини 4Т1 трансфікували вектором без вставки або інфікували неспорідненим лентивірусом. Клітини вирощували в середовищі RPMI 1640 («Gibco», США) за присутності 10% ембріональної сироватки теляти (FBS) («HyClone», США), 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину («Gibco», США) у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C.

Тотальну РНК ізолювали з 10⁶ клітин. Якість одержаної РНК оцінювали за ступенем деградації смуг рибосомних РНК після електрофоретичного розділення в агарозному гелі, а також за поглинанням при 260/230 нм і 260/280 нм. Синтез кДНК та ампліфікацію досліджуваних зразків здійснювали відповідно до рекомендацій виробника. Рівень експресії досліджуваних генів обраховували за методом $\Delta\Delta C_t$ (Livak et al., 2001), використовуючи *Gardh* як референтний ген.

Клітинні протеїни розділяли електрофорезом у ПААГ за присутності SDS у буферній системі Леммлі (Laemmli, 1970). Імуноблот-аналіз протеїнів здійснювали після їх електропереносу з ПААГ на нітроцелюлозну або полівінілдіфторидну мембрану (Towbin, 1979). Імунорективні смуги протеїнів на блотах виявляли за допомогою набору для підсиленої хемілюмінесценції (ECL). Концентрацію протеїну в лізатах клітин визначали за методом Петерсона (Peterson, 1977).

Проліферативну активність клітин лінії 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85 оцінювали шляхом прямого підрахунку після фарбування трипановим синім, за здатністю відновлювати МТТ-реактив (Stockert et al., 2012), та за вмістом ядерного антигена проліферації Ki67. Адгезивність оцінювали за кількістю клітин, які прикріпились до матриксу (Матригелю, фібронектину чи колагену I типу) протягом 30 хв. культивування. Рухливість досліджуваних субліній клітин досліджували за допомогою тесту на заростання подряпини (Liang et al., 2007), а інвазивність – за допомогою модифікованої камери Бойдена (Justus et al., 2014). Для оцінки динаміки міграції та інвазії використовували прилад xCELLigence RTCA DP Instrument (Кнорфовá et al., 2012). Селекцію високоінвазивних субпопуляцій клітин 4Т1 дикого типу здійснювали за допомогою модифікованої камери Бойдена, вкритої Матригелем. Клітини, що мігрували на нижню поверхню мембрани, дисоціювали за допомогою 2 мМ ЕДТА та культивували за стандартних умов.

Трансформувальний потенціал оцінювали за колонієутворювальною здатністю у напіврідкому агарі. Резистентність до доксорубіцину оцінювали за результатами МТТ-тесту та за результатами підрахунку колоній в напіврідкому агарі. Мамосфери отримували шляхом культивування клітин MCF-7 у суміші середовища DMEM, що не містило індикатор, та середовища F-12 («Cellgro», США) у співвідношенні 1:1 за присутності 5 мкг/мл інсуліну, 0.5 мкг/мл гідрокортизону, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл FGF2 («Sigma», США), 0.5 од/мл гепарину, додатку B27 («Invitrogen», США), 1% бичачого сироваткового альбуміну та стандартних антибіотиків.

Активність матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 оцінювали за допомогою желатинової зимографії. Активність лізилоксидози вимірювали хемілюмінесцентним методом за продукуванням H₂O₂ (Gudkova et al., 2018).

Для усіх експериментів *in vivo* використовували 8-тижневих самок мишей лінії Balb/c. Ефективність екстравазування оцінювали за здатністю до трансендотеліальної міграції (Muller et al., 2008), проникністю капілярів легені до барвника Evans Blue (Radu et al., 2013) та за кількістю колоній, резистентних до 6-тіогуаніну, після дисоціації клітин з легені (Pulaski et al., 2001). Для оцінки ефективності метастазування використовували протокол для експериментального метастазування (Pulaski et al., 2001). Для підрахунку поверхневих метастазів, легеню попередньо фіксували у суміші Буена (Kporfová et al., 2018). Для морфологічного аналізу зразки фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну, парафінізовані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином.

Для статистичного аналізу результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз для незв'язаних вибірок з поправкою Бонфероні для множинних порівнянь. Попарні порівняння здійснювали за допомогою двовибіркового t-тесту Ст'юдента для незалежних вибірок з нерівними дисперсіями. Різницю між групами вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

З метою встановлення сингенної мишачої моделі для з'ясування біологічної ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у канцерогенезі за умов *in vitro* та *in vivo*, були отримані субклони аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 (RukUp-1 і RukUp-2) і зниженою експресією Ruk/CIN85 (RukDown), а також відповідні контрольні сублінії Mock і Scr (рис. 1).

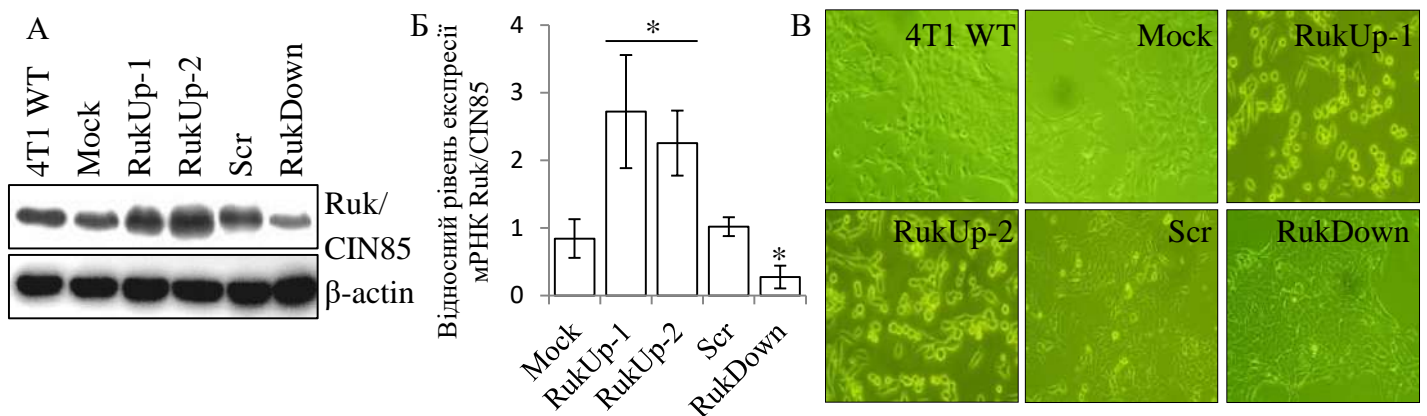


Рис. 1 Вміст та рівень експресії мРНК адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в отриманих сублініях клітин 4T1. А – Вестерн-блот аналіз, β -актин був використаний для нормалізації. Б – Відносний рівень експресії мРНК Ruk/CIN85. Значення експресії мРНК Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 WT було прийнято за 1, значення для решти субліній нормалізовано відносно 4T1 WT. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$. В – Фотографії субліній клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85, зроблені за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus при збільшенні у 100 разів.

Динаміку росту клітин аналізували шляхом прямого підрахунку живих клітин у кожній часовій точці культивування та за допомогою МТТ-тесту. Виявлено, що проліферативний потенціал субліній клітин 4T1 негативно корелював із рівнем експресії Ruk/CIN85 (рис. 2, А, Б). Ці результати були підтверджені кількісним

аналізом імунобарвлення проліферативного антигена Ki67 у досліджуваних субклініях клітин 4T1 (рис. 2, В).

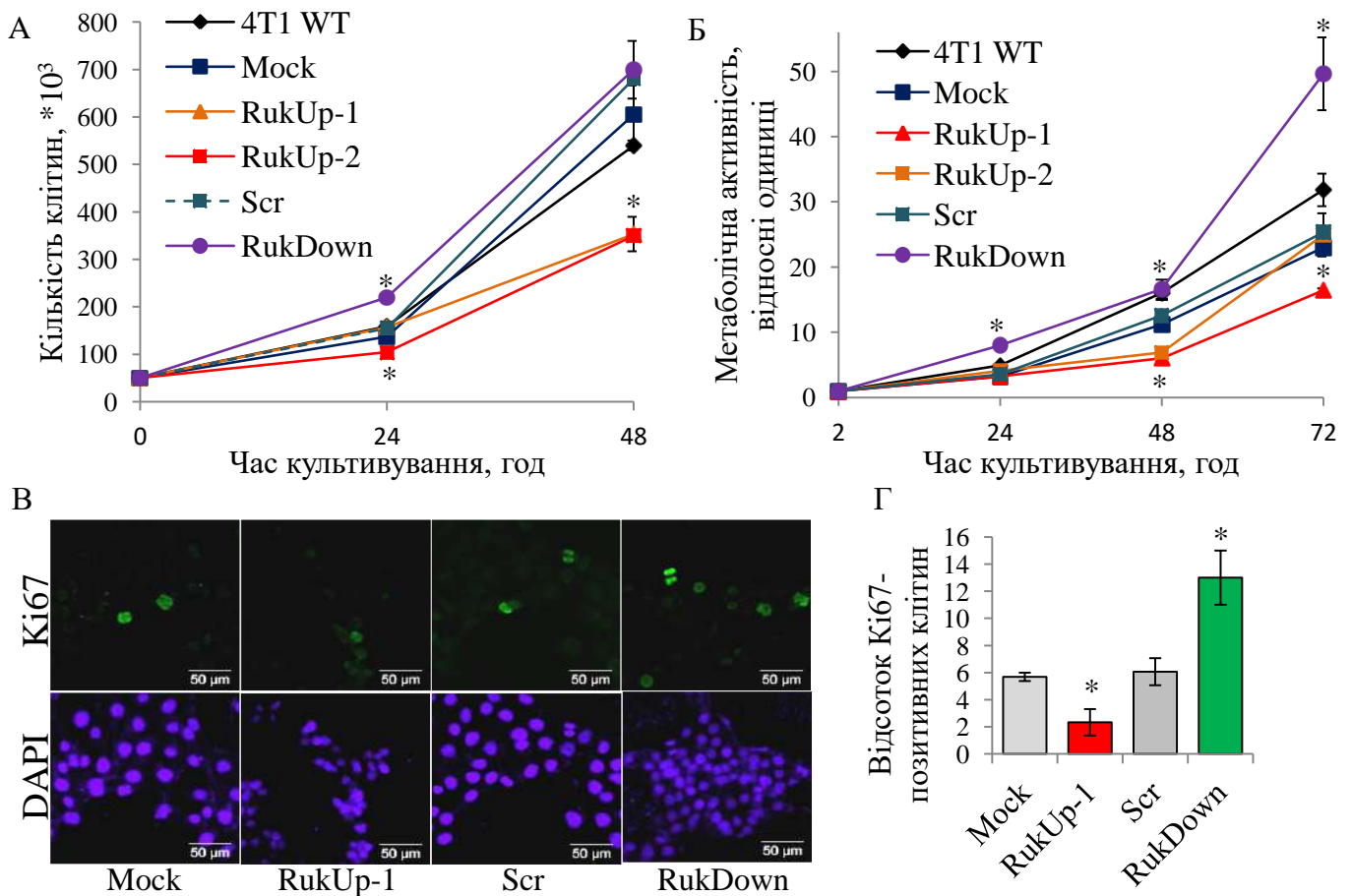


Рис. 2 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює проліферативну активність клітин 4T1. А – криві росту клітин субклонів 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85, побудовані на основі прямого підрахунку кількості живих клітин. Б – Результати МТТ-тесту. В – флуоресцентне імунобарвлення проліферативного антигену Ki67 у клітинах субклонів 4T1. Г – відсоток Ki67-позитивних клітин у досліджуваних субклініях. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n = 4$.

За результатами аналізу адгезії до молекул позаклітинного матриксу (ECM) було продемонстровано, що підвищений вміст Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 призводить до статистично значимого зниження адгезивності до фібронектину і колагену 1 типу, тоді як змін у ефективності адгезії до Матригелю не спостерігалось. Одночасно було виявлено потенціювання адгезивного потенціалу для клітин RukDown при використанні всіх досліджуваних молекул ECM (рис. 3, А). Рухливість клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 оцінювали за швидкістю заростання «подряпини» у клітинному моношарі *in vitro*. Виявлено, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються зростанням коефіцієнта міграції майже вдвічі, порівняно з контролем (рис. 3, Б). Цікаво, що клітини RukUp-1 заповнювали «подряпину» у дисперсний спосіб, тоді як клітини Mock мали тенденцію заповнювати її неперервним фронтом, що корелює з морфологічними особливостями цих субклонів. Протилежні результати були отримані для клітин RukDown, що продемонстрували майже повне пригнічення їх моторики.

Інвазивність клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 *in vitro* досліджували з використанням модифікованої камери Бойдена з мембраною, вкритою шаром Матригелю, колагену 1 типу чи фібронектину. Встановлено, що надекспресія Ruk/CIN85 супроводжувалась значною активацією (у 3-5 разів) інвазивності клітин 4T1 через усі типи досліджуваних матриксів. У той же час, інвазивна здатність клітин RukDown була значно нижчою порівняно з контрольними клітинами Scr (рис. 3, В). Цікаво відзначити, що інвазивність субліній клітин 4T1 через різні молекули ЕСМ обернено корелює з їх адгезивними властивостями (див. рис. 3, А).

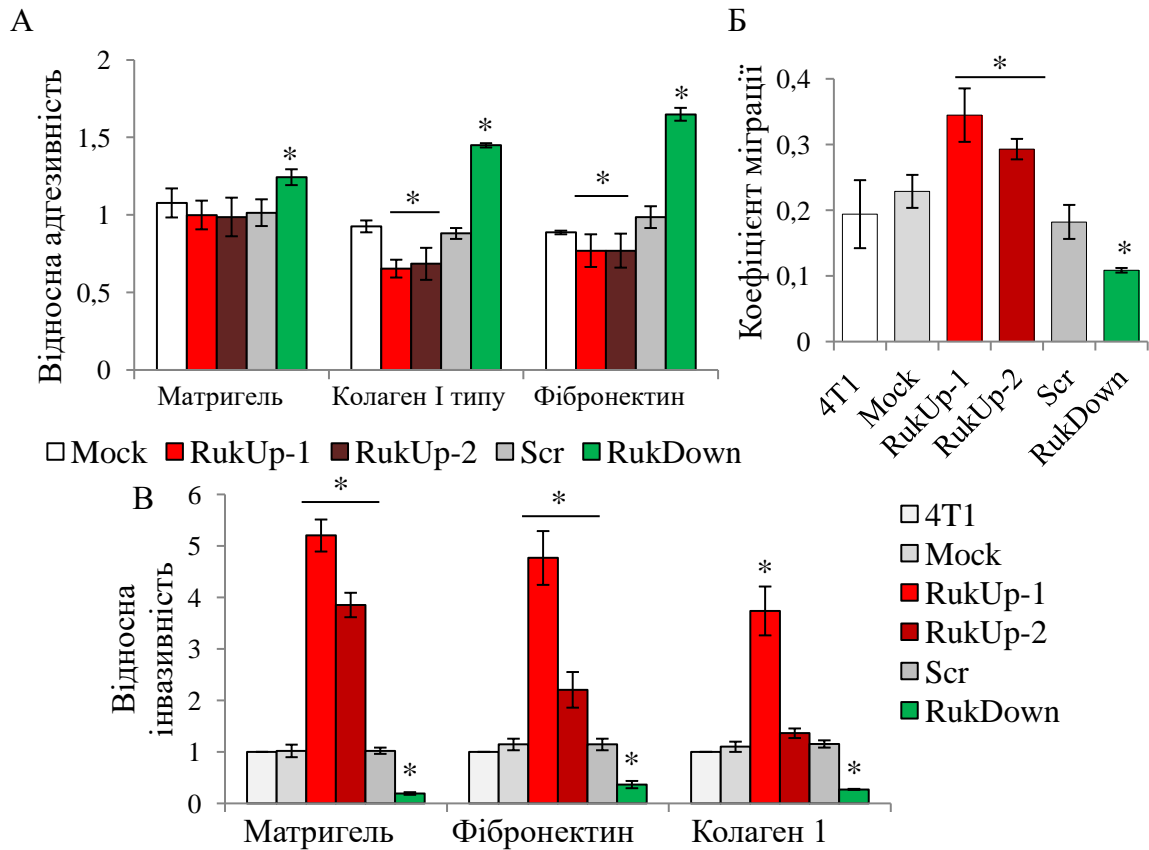


Рис. 3 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює адгезивність (А), рухливість (Б) та інвазивний потенціал (В) клітин 4T1 у концентраційно-залежний спосіб. А - адгезивність клітин субліній 4T1 до Матригелю, колагену 1 типу та фібронектину. Б – значення коефіцієнта міграції для клітин субліній 4T1. В – значення інвазивності через Матригель, фібронектин та колаген 1 типу для клітин 4T1 досліджуваних субліній. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$.

Для перевірки можливості залучення Ruk/CIN85 до контролю ЕМТ, рівні експресії епітелійних і мезенхімних маркерів у субклонах 4T1 досліджували за допомогою Вестерн-блот і qRT-PCR аналізу, а також конфокальною мікроскопією. Як епітелійний маркер Е-кадгерин, так і мезенхімний маркер віментин, детектуються в контрольних клітинах 4T1 (Mock і Scr) у співвідношеннях, що відповідають їх гібридному епітелійно-мезенхімному фенотипу. Потужне індукування віментину спостерігалось в клітинах RukUp-1, тоді як інтенсивність імунореактивної смуги, що відповідала Е-кадгерину, зростала більш ніж у 5 разів у клітинах RukDown порівняно з відповідним контролем. Одночасно, в клітинах 4T1

RukUp-1/RukDown спостерігалися взаємні реципрокні зміни вмісту Е-кадгерину/віментину (рис. 4, А, Б). За допомогою імуофлуоресцентного аналізу було встановлено, що Е-кадгерин локалізується в ділянках міжклітинних контактів у клітинах RukDown з вираженим епітеліальним фенотипом, що відображено посиленням барвлення мембрани. Висока інтенсивність барвлення на віментин була характерною для клітин RukUp-1 зі змішаним амебоїдно-мезенхімальним фенотипом, особливо в ділянках подовження клітин (рис 4, В). Крім того, невеликі за розміром поліморфні ядра клітин RukUp-1 були ще одним доказом їх амебоїдної природи (Pankova et al., 2010; Wolf and Friedl, 2011). Як первинні, так і вторинні пухлини грудної залози людини, та постійні лінії клітин раку грудної залози представлені гетерогенними клітинними популяціями з огляду на особливості їх інвазивного та метастатичного потенціалу й здатності ініціювати розвиток пухлин (Meyer et al., 2009; Uchino et al., 2010). Було послідовно відібрано субпопуляції клітин 4T1 WT, які проінвазували через Матригель у модифікованій камері Бойдена (названі M1 і M2), і показано, що клітини цих субпопуляцій характеризуються підвищеною експресією Ruk/CIN85 і віментину та зниженою експресією Е-кадгерину (рис. 4, Г, Д) порівняно з вихідними клітинами.

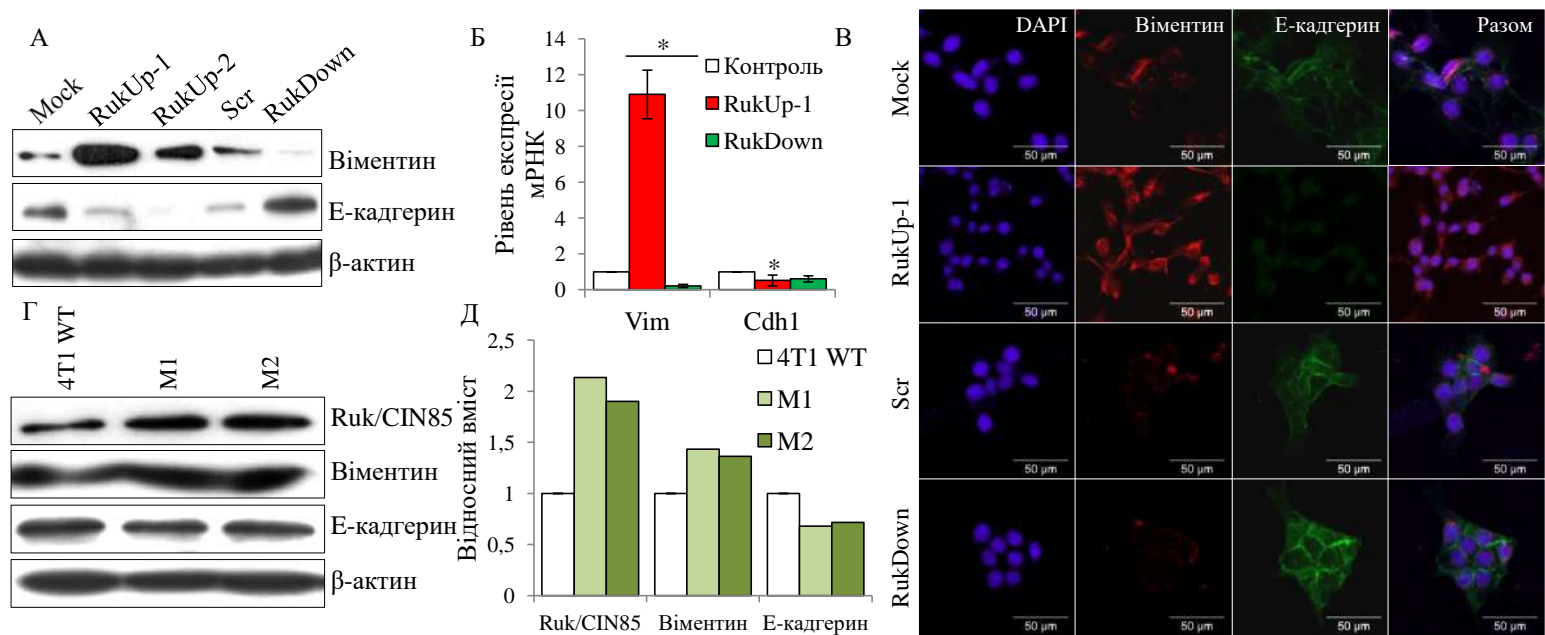


Рис. 4 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює вміст і експресію маркерів EMT (Е-кадгерину та віментину) у клітинах 4T1 залежно від рівня його експресії. А - вміст, Б - рівні експресії мРНК та В - імуофлуоресцентне барвлення віментину та Е-кадгерину. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$. Г, Д – Відбір високоінвазивних субпопуляцій клітин 4T1 WT. Г – Вестерн-блот аналіз вмісту маркерів EMT. Д – відносний вміст маркерів EMT.

Зважаючи на зв'язок між рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 та вмістом основних маркерів EMT віментину та Е-кадгерину, на наступному етапі було проаналізовано рівні експресії мРНК низки генів, залучених до регулювання EMT. Було продемонстровано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зростають рівні експресії Zeb1/2, Snail, Twist1, тоді як пригнічення Ruk/CIN85 веде до зниження рівнів експресії цих транскрипційних факторів (ТФ).

Аналіз експресії *Klf17* та *Mub* виявив негативну залежність між вмістом *Ruk/CIN85* у клітинах 4T1 і рівнями експресії цих ТФ (рис. 5, А). Аналіз рівнів експресії генів, які контролюють адгезію клітини, показав, що рівень експресії *Ruk/CIN85* у сублініях клітин 4T1 негативно корелює з рівнями експресії *Tjp1*, *Icam1*, *Fn1*, *Itgb1*, *Cf11* (рис. 5, Б). Цікаво зазначити, що ці дані узгоджуються з одержаними результатами про негативну кореляцію між адгезивністю клітин лінії 4T1 і рівнем експресії в них *Ruk/CIN85* (див. рис. 3, А). Пухлино-асоційоване запалення є необхідним чинником метастазування (Suarez-Carmona et al., 2017). Було встановлено, що при надекспресії *Ruk/CIN85* достовірно зростали рівні експресії прозапальних цитокінів *Il1a* та *Il6*, хемокіна *Cxcl5*, і ліпокаліну *Lcn2*, та знижувались рівні експресії *Tnf* та *Ccl2*. Пригнічення експресії *Ruk/CIN85* супроводжувалось протилежними ефектами (рис. 5, В). ЕМТ індукує в карциномних клітинах експресію протеїназ, скерованих на розщеплення компонентів позаклітинного матриксу, що полегшує інвазію пухлинних клітин. Було проаналізовано рівні експресії мРНК ензимів, залучених до перичелюлярного протеолізу, у клітинах 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну *Ruk/CIN85* (рис. 5, Г) і показано, що високоінвазивна сублінія 4T1 *RukUp-1* характеризувалась зниженням експресії низки ензимів, що беруть участь у деградації позаклітинного матриксу, а саме металопротеїназ *Mmp2*, *Mmp9* та мембрано-асоційованої *Mmp14*, а також катепсину *D Ctsd*, тоді як пригнічення *Ruk/CIN85* призводило до зростання рівня експресії генів вказаних протеїназ. Таким чином, надекспресія *Ruk/CIN85* веде до пригнічення перичелюлярного протеолізу, що може свідчити про амебоїдний, а не мезенхімний тип міграції цих клітин. Аналіз рівнів експресії компонентів урокіназної системи показав, що при надекспресії *Ruk/CIN85* зростав рівень експресії урокінази *Plau* та її інгібітора *PAI-1/Serpine1*, та знижувався рівень експресії рецептора урокінази *Plaur*, тоді як клітини 4T1 зі зниженою експресією *Ruk/CIN85* мали протилежні характеристики (рис. 5, Г).

Активність металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 оцінювали методом желатинової зимографії (рис. 6, А) і встановили, що активність цих ензимів, як і їх експресія, негативно корелювала з рівнем експресії *Ruk/CIN85* у клітинах 4T1. Ці дані засвідчили, що клітини *RukUp-1* переважно не залучають активності MMP-2 і MMP-9 для деградації ЕСМ. Округла морфологія і деформація ядер, а також знижена адгезивність і потенційно пригнічений перичелюлярний протеоліз, характерні для клітин *RukUp-1*, можуть бути пов'язані з розвитком фенотипу, подібного до амебоїдного (Pankova et al., 2010; Wolf and Friedl, 2011; Fagan-Solis et al., 2013; Taddei et al., 2014; Orgas et al., 2014; Liu et al., 2015, 2016; Lehmann et al., 2017). Щоб підтвердити наше припущення, актиновий цитоскелет клітин *RukUp-1* забарвлювали TRITC-фаллоїдином, після чого за допомогою конфокальної флуоресцентної мікроскопії було показано, що ці клітини зазнали округлення, а також набули ознак амебоїдного типу міграції - формування кортикального F-актинового кільця та мембранних вип'ячувань (блебів) (рис. 6, Б). Водночас, в клітинах сублінії *RukUp-1* зростала як експресія, так і активність лізилоксидази (рис. 6 В, Г) – ензиму, який бере участь у формуванні поперечних зшивок в молекулах колагену і еластину, що полегшує рух пухлинних клітин між волокнами позаклітинного матриксу (Kirschmann et al., 2002).

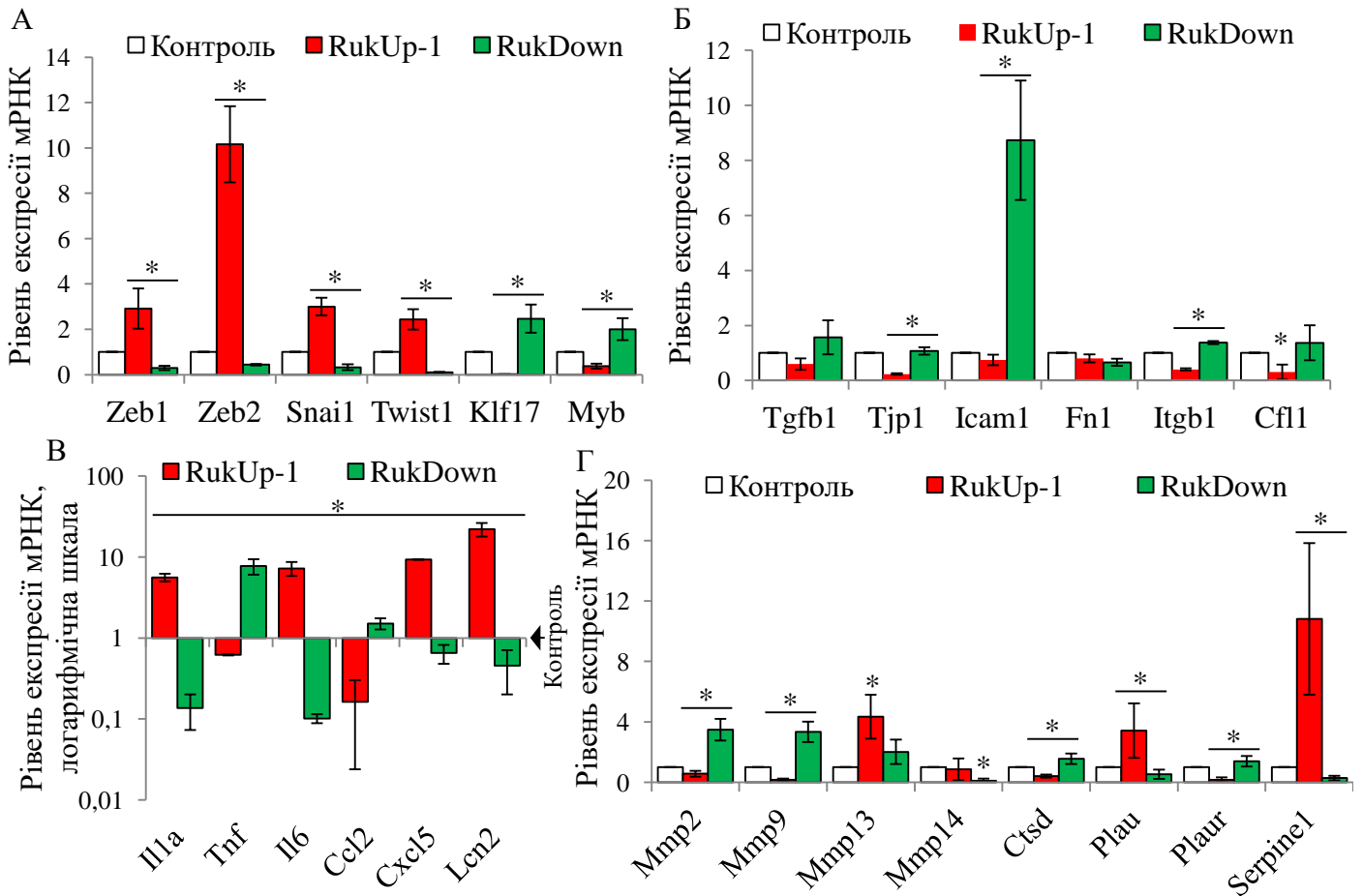


Рис. 5 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресією генів, асоційованих з EMT (qRT-PCR аналіз). А – транскрипційні фактори, залучені до контролю EMT. Б - молекули адгезії. В – гени, залучені до контролю запалення й імунної відповіді. Г – деградація ECM. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$.

В літературі нагромаджуються дані, що свідчать про роль MMP-2/MMP-9 у процесі протеолізу плазміногену з утворенням ангіостатинів (крингл-вмісних фрагментів плазміногену), які можуть функціонувати як інгібітори ангіогенезу, міграції та росту пухлин *in vitro* та *in vivo* (O'Reilly et al., 1999; Stack et al., 1999; Scorilas et al., 2001; Mauceri et al., 2002; Pellikainen et al., 2004; Gonzalez-Gronow et al., 2005; Chung et al., 2006; Nestler et al., 2006; Martin and Matrisian; 2007). Вестерн-блот аналізом нами було виявлено фрагмент з молекулярною масою 50 кДа в кондиційованому середовищі клітин, причому його вміст був найбільшим у сублінії RukDown і майже не детектувався в сублінії RukUp-1. При цьому, вміст плазміногену в лізатах клітин змінювався обернено до кількості ангіостатинів (рис. 7, А). Додавання ангіостатинів K1-3 і K5 (Sottrup-Jensen et al., 1978; Kapustianenko et al., 2014) достовірно пригнічувало інвазивність високоінвазивних клітин RukUp-1, тоді як застосування інгібітора металопротеїназ GM6001 відновлювало інвазивність клітин RukDown. Показано також зниження коефіцієнта інвазії при дії інгібітора серинових протеїназ рNFGB (рис. 7, Б, В). Таким чином, серинові протеїнази, як важливі компоненти ремоделювання ECM і регулятори динамічних змін в адгезивності, можуть відігравати взаємно доповнюючу роль(і), разом з

металопротеїназами, у забезпеченні функціонального стану регуляторної мережі, необхідної для пригнічення міграційного та інвазивного потенціалу клітин 4T1.

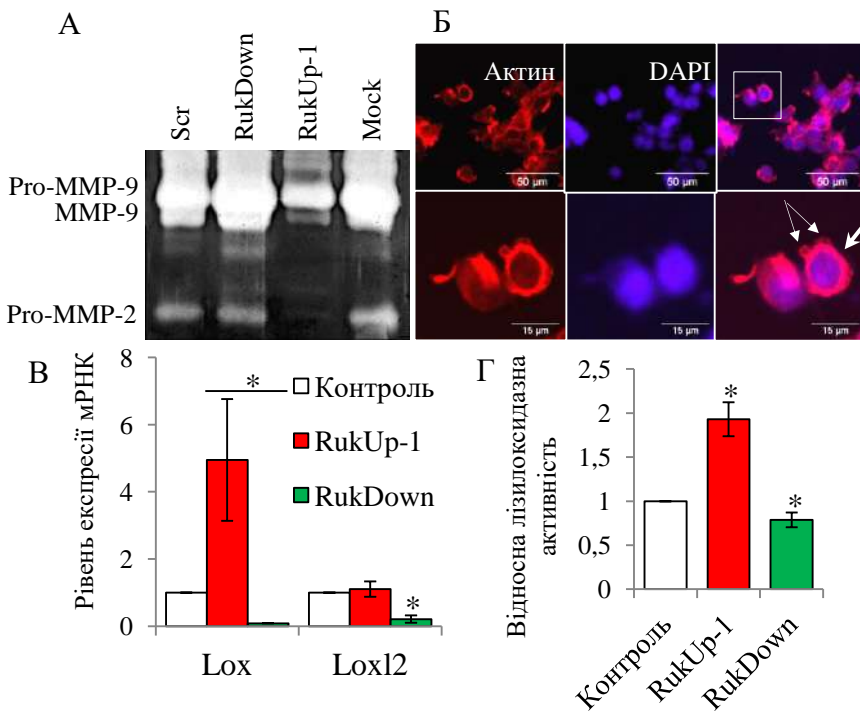
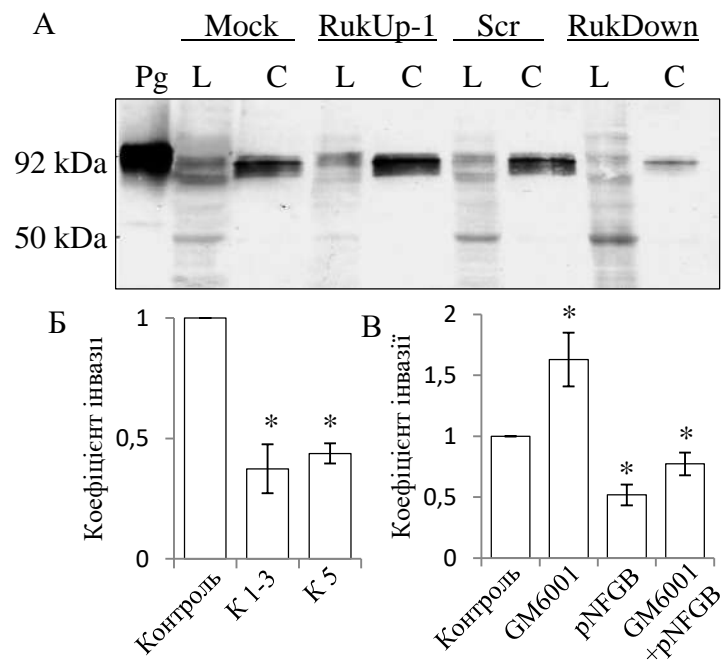


Рис. 6 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює прояв ознак, асоційованих з амебоїдним типом міграції й інвазії. А – желатинова зимографія матричних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 у кондиціонованому середовищі клітин 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Б – Флуоресцентне барвлення актинового цитоскелету клітин сублінії RukUp-1 TRITC-фалоїдином. Ядра забарвлювали DAPI. Білими стрілками вказано актинове кільце та вип'ячування мембрани. В – рівні експресії мРНК лізилоксидаз Lox і Lox12. Г – лізилоксидазна активність в кондиціонованому середовищі клітин сублінії 4T1. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$.

Рис. 7 Матричні металопротеїнази пригнічують інвазивність клітин 4T1 шляхом продукції ангіостатинів. А - вміст ангіостатинів у лізатах (L) та кондиціонованому середовищі (C) клітин сублінії 4T1. Як позитивний контроль використовували препарат плазміногену (Pg). Б – вплив ангіостатинів K1-3 і K5 на інвазивність клітин високоінвазивної сублінії 4T1 RukUp-1. В – вплив інгібітора металопротеїназ GM6001 і інгібітора серинових протеїназ rNFGVB на інвазивність низькоінвазивних клітин 4T1 RukDown. * - $p < 0,05$ відносно нестимульованого контролю, $n=3$.



Прояв ознак ракових стовбурових клітин (CSCs) тісно пов'язаний з EMT та метастазуванням (Gupta et al., 2009; Wu et al., 2011; Zhou et al., 2017; Mani et al., 2008). Методом кількісної ПЛР було встановлено, що Ruk/CIN85 модулює експресію поверхневих маркерів CSCs CD44 і CD24 та генів репрограмування, зокрема Klf17, Pou5f/Oct4, Nanog (рис. 8, А, Б). Виявлено, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 формують достовірно більшу кількість сфероїдів (мамосфер) при культивуванні на низькоадгезивному пластику, у порівнянні з

контролем, причому ця властивість зберігалась протягом пасажування, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 призводило до зниження їх здатності формувати сфероїди. Сфероїди, утворені клітинами сублінії RukUp-1, мали неправильну форму і нерівні краї, що корелювало зі зниженням міжклітинної адгезії і підвищенням міграційного потенціалу (Рис. 8, В, Г).

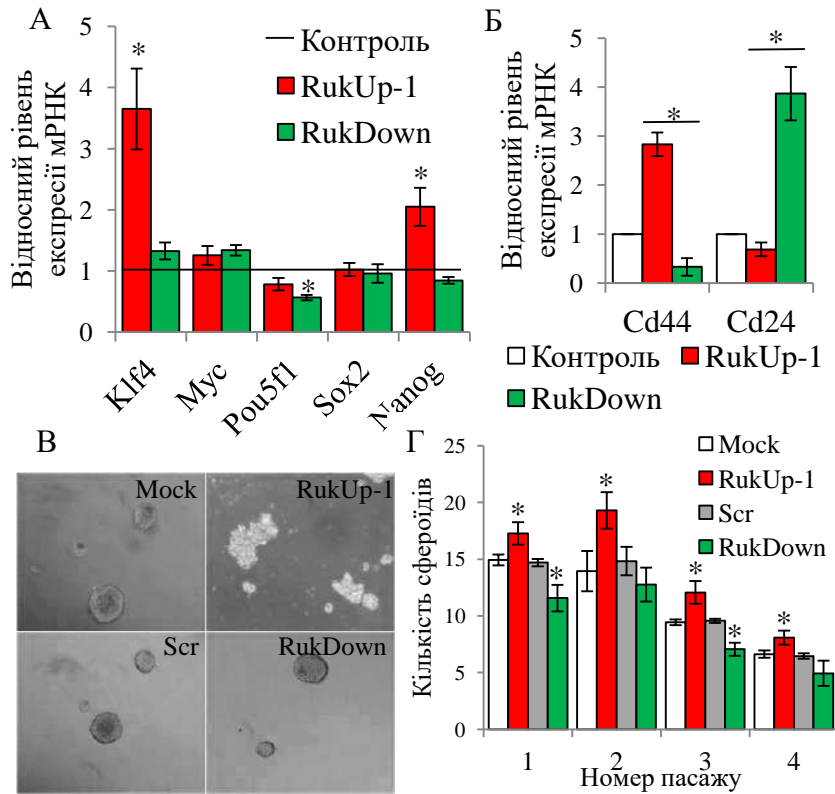


Рис. 8 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює прояв ознак, притаманних CSCs, залежно від рівня його експресії. А, Б – qRT-PCR аналіз експресії генів, залучених до репрограмування CSCs (А) та поверхневих маркерів (Б). * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=4$. В - Репрезентативні фотографії сфероїдів при культивуванні на низькоадгезивному пластику. Г – кількість сфероїдів на 1-4 пасажах при серійному пасажуванні. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем на тому ж пасажі, $n=3$.

Ще однією ознакою CSCs є їх хіміорезистентність (Schatton et al., 2011). Стійкість клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 до дії доксорубіцину оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Показано, що IC_{50} доксорубіцину достовірно зростало у клітин сублінії RukUp-1, і знижувалось – у клітин RukDown (рис. 9, А). Формування колоній у напіврідкому агарі широко використовується як тест на злякисну трансформацію пухлинних клітин, асоційовану з розвитком ознак CSCs (Bogowicz et al., 1998). Було продемонстровано, що клітини RukUp-1 формували достовірно більшу кількість колоній як за контрольних умов, так і за присутності 0,01-0,1 μM доксорубіцину, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжувалось зниженням здатності формувати колонії в напіврідкому агарі (рис. 9, Б).

Альдегіддегідрогенази (АЛДГ) – родина НАД(Ф)⁺-залежних ензимів, залучених до детоксикації широкого спектру альдегідів шляхом їх перетворення на слабкі карбонові кислоти. Підвищений рівень активності АЛДГ не тільки асоційований з посиленням хіміорезистентності, але й може використовуватися як маркер CSCs в багатьох типах пухлинних клітин, в тому числі й пухлинних клітинах грудної залози (Alison et al., 2010). Активність АЛДГ оцінювали хемілюмінісцентним методом за продукуванням H_2O_2 (Gudkova et al., 2018) і виявили достовірне (у 1,5 рази)

зростання активності цього ензиму в клітинах RukUp-1, і зниження – в RukDown (рис. 9, В).

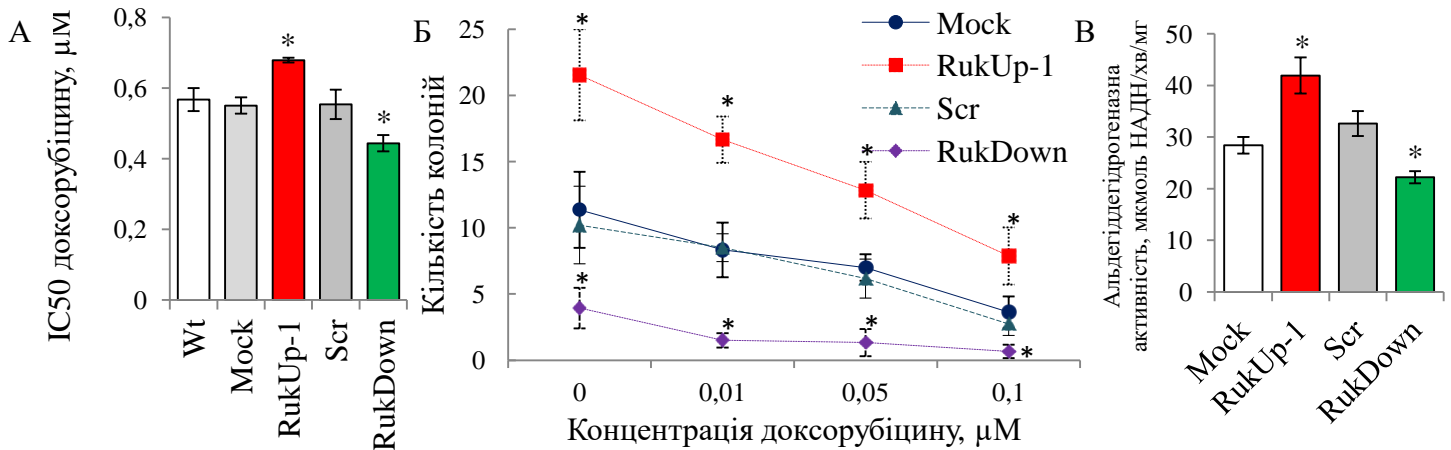


Рис. 9 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює хіміорезистентність клітин субліній 4Т1 залежно від рівня його експресії. А - значення IC₅₀ доксорубіцину для клітин 4Т1 різним вмістом Ruk/CIN85, n=4. Б – кількість колоній в напіврідкому агарі, сформованих клітинами 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85 за присутності доксорубіцину у концентраціях 0,01 – 0,1 µM, n=3. В - Активність альдегіддегідрогенази в лізатах клітин 4Т1, * - p<0,05 у порівнянні з відповідним контролем, n=4.

Процес екстравазування (виходу пухлинних клітин з кровотоку та їх проникнення в тканину органа-мішені) є ключовим етапом у метастазуванні, що завершується «хоумінгом» і колонізацією органа-мішені. Тест на міграцію пухлинних клітин через шар первинних ендотеліоцитів легені у модифікованій камері Бойдена (трансендотеліальна міграція, ТЕМ) виявив, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 характеризувались достовірним зростанням коефіцієнта ТЕМ (у 15 разів), а пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4Т1 призводило до зниження коефіцієнта ТЕМ (рис. 10, А). На моделі *in vivo* показано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4Т1 достовірно зростала проникність капілярів легені і здатність колонізувати легені у порівнянні з контролем Mock (рис. 10, Б, В). У свою чергу, клітини, що екстравазували в органи-мішені, встановлюють тканиноспецифічне мікрооточення, необхідне для запуску процесів проліферації й ангіогенезу та формування вторинних вогнищ пухлинного росту, метастазів.

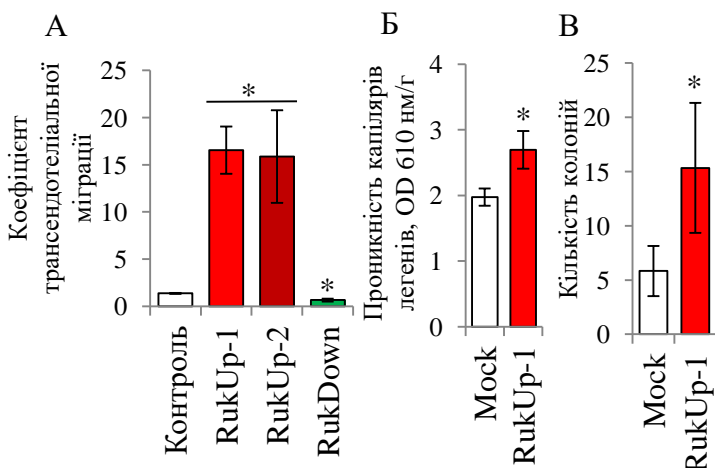
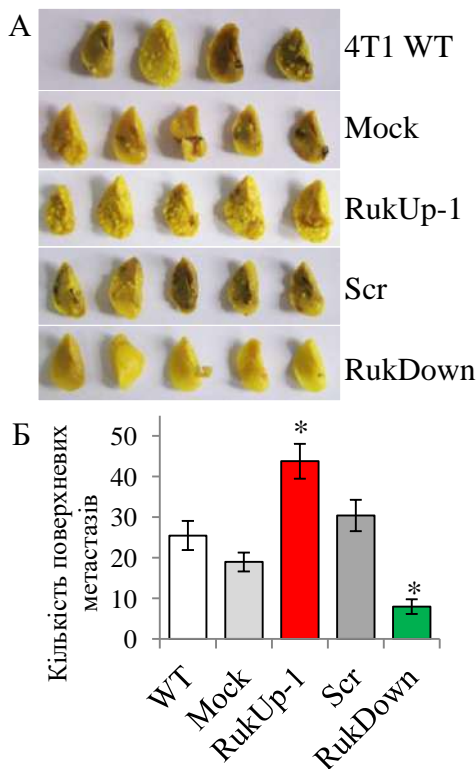


Рис. 10 Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4Т1 супроводжується посиленням екстравазування. А – Коефіцієнт трансендотеліальної міграції клітин з різним вмістом Ruk/CIN85. Б – проникність капілярів легені до барвника Evans Blue. В – ступінь колонізації легені. * - p<0,05 у порівнянні з відповідним контролем, n=3.

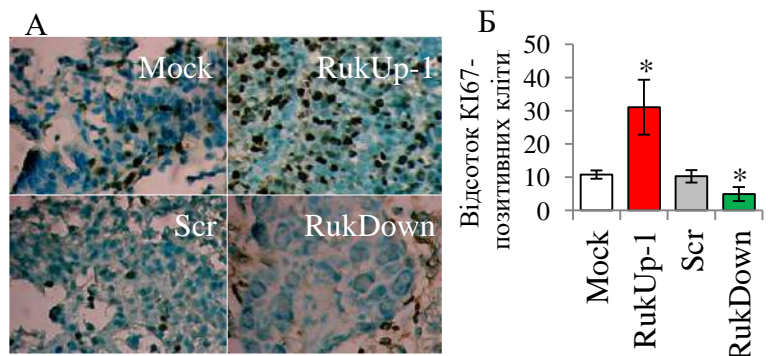
Для оцінки ефективності метастазування клітин 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на моделі експериментального метастазування, пухлинні клітини досліджуваних субліній вводили у хвостову вену ($5 \cdot 10^5$ клітин) 8-тижневим самкам мишей лінії Balb/c, і через 2 тижні після цього оцінювали кількість поверхневих метастазів у легенях тварин і морфологічні зміни у структурі легені. Було встановлено, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 утворювали достовірно більшу кількість метастазів у легенях порівняно з контролем, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжувалось практично повною втратою здатності до метастазування (рис. 11, А, Б). Морфологічний аналіз зразків легені продемонстрував присутність солідних метастазів, а також ознак інвазії у просвіт судин, у контрольних зразках (групи Mock і Scr). Легеня тварин з групи RukUp-1 була практично повністю заміщена пухлинними клітинами, часто спостерігали інвазію в кровеносні судини. У тварин групи RukDown легеня переважно зберігала нормальну структуру, рідко виявлялись поодинокі мікрометастази. Для з'ясування регуляторних взаємовідносин між рівнем експресії



Ruk/CIN85 та проліферативною активністю пухлинних клітин в легеневих метастазах, ми проаналізували вміст проліферативного маркера Ki67 у зразках легені за допомогою імуногістохімії (рис. 12). Виявлено високий відсоток Ki-67-позитивних клітин в легеневих метастазах у групі RukUp-1 і, навпаки, низький - у групі RukDown, що є свідченням мезенхімно-епітеліального переходу в пухлинних клітинах метастазів, асоційованого з індукцією проліферації.

Рис. 11 Вплив адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на метастазування в легеню на моделі експериментального метастазування. А – зображення правої легені тварин досліджуваних груп, фіксованих розчином Буена. Б – кількість поверхневих метастазів. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=5$.

Рис. 12 Вміст ядерного фактора проліферації Ki-67 у клітинах легеневих метастазів. А – репрезентативні зображення препаратів, Б – відсоток Ki67-позитивних клітин. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=5$.



ВИСНОВКИ

Проведено комплекс експериментальних робіт, які засвідчили участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі епітелійно-мезенхімної пластичності пухлинних клітин на моделях *in vitro* та *in vivo*. Результати проведених досліджень дозволили зробити висновок, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 в аденокарциномних клітинах грудної залози миші лінії 4T1 призводить до розвитку високоагресивного гібридного мезенхімно-амебоїдного фенотипу, тоді як пригнічення експресії цього адаптерного протеїну – до фіксування клітин 4T1 у гомогенному епітелійному стані і блокування епітелійно-мезенхімної пластичності.

1. Одержано сублінії аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та зниженою експресією повнорозмірної форми адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Виявлено залежність морфології клітин 4T1 від рівня експресії Ruk/CIN85 – округлення клітин з надекспресією та посилення епітелійного фенотипу клітин з пригніченою експресією Ruk/CIN85.

2. Встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 супроводжується зниженням їх проліферативного потенціалу та адгезивності, а також посиленням рухливості й інвазивності. У клітинах лінії 4T1 з пригніченим рівнем експресії Ruk/CIN85 виявлено протилежно спрямовані зміни у проліферації, адгезивності, рухливості та інвазивності.

3. Вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію низки генів, залучених до контролю процесів міграції та інвазії, в тому числі віментину, E-кадгерину, транскрипційних факторів Twist1, Snai1, Zeb1/2, металопротеїназ MMP-2, MMP-9, і в такий спосіб стимулює епітелійно-мезенхімний/амебоїдний перехід у клітинах 4T1 з надекспресією цього адаптера. Водночас, профілювання експресії генів показало, що клітини 4T1 з пригніченою експресією Ruk/CIN85 набувають ознак епітелійних клітин.

4. Вперше показано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується зниженням активності металопротеїназ MMP-2 і MMP-9, тоді як у сублінії клітин 4T1 з down-регулюванням цього адаптера активність цих ензимів, навпаки, зростає. Вперше виявлено, що активація металопротеїназ супроводжується пригніченням інвазивності клітин 4T1 RukDown, ймовірно, за рахунок продукування ангіостатинів. Продемонстровано, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються і іншими ознаками амебоїдного типу міграції: округла форма клітин, наявність кортикального актинового кільця та вип'ячувань мембрани, підвищена активність і експресія лізилоксидази.

5. Вперше встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням експресії генів, залучених до процесів репрограмування та підтримання недиференційованого стану, а також посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин, таких як здатність до росту в неприкріпленому стані, самовідтворення, експресія специфічних поверхневих маркерів, підвищена резистентність до доксорубіцину. Водночас пригнічення

експресії Ruk/CIN85 зумовлює як втрату молекулярних маркерів CSCs, так і пригнічення сфероїдоутворення.

6. Продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням їх здатності до екстравазування й метастазування у легеню, тоді як down-регулювання Ruk/CIN85, навпаки, веде до практично повного пригнічення цього процесу. Встановлено, що в легеневих метастазах Ruk/CIN85 індукує мезенхімно-епітелієвий перехід, асоційований з посиленням проліферативної активності пухлинних клітин.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **I. Horak**, L. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (3): 94-100 (*Особистий внесок здобувача – дослідження чутливості клітин до дії доксорубіцину методом МТТ-тесту, обрахунок IC₅₀, дослідження чутливості колоній в напіврідкому агарі до дії доксорубіцину, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

2. **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs) features in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2018; 12: 101-109 (*Особистий внесок здобувача – підбір праймерів, оцінка експресії генів Ruk/CIN85, Cd24, Cd44, Klf4, Muc, Pou5f, Sox2, Nanog методом ПЛР в реальному часі, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

3. **I. Horak**, L. Drobot, L. Borsig, L. Knopfova. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells is followed by increased migration rate and invasion potential. *Biopolymers and Cell.* 2018; 34 (4): 284-291 (*Особистий внесок здобувача – оцінка міграції й інвазії через Матригель в реальному часі, статистична обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

4. A. V. Bazalii, **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, S. V. Komisarenko, L. B. Drobot. Transcriptional regulation of NOX genes expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 119-125 (*Особистий внесок здобувача – підбір праймерів, оцінка експресії Ruk/CIN85 методом ПЛР в реальному часі*).

5. G.V. Pasichnyk, O. O. Povorozniuk, **I.R. Horak**, D. S. Gerashchenko, O.V. Ponomarenko, A.A. Samoilenko, N.V. Byts, L.B. Drobot. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2013; 12: 149-156 (*Особистий внесок здобувача – культивування клітин, пробопідготовка зразків, дослідження ефективності виключення родаміну 123*).

6. Заявка на корисну модель № u201806310. МПК (2018.01): C12Q 1/6886, C12N 5/10, C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/16. Застосування стабільних субліній пухлинних клітин як моделі для тестування протипухлинних препаратів, скерованих

на знищення ракових стовбурових клітин / Дробот Л.Б., Комісаренко С.В., Пасічник Г.В., **Горак І.Р.**, Геращенко Д.С., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України – заявл. 06.06.2018 р.; Висновок про відповідність від 05.10.2018 р. № 25674/ЗУ/18 (*Особистий внесок здобувача – одержання сублінії клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN8, оцінка експресії Ruk/CIN8 у сублініях клітин MCF-7, 4T1, A549, визначення експресії CD44 і CD24 в клітинах 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85, дослідження хіміорезистентності, інвазивності і метастазування на моделі in vivo клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN8*).

7. **Горак І.**, Пасічник Г., Поворознюк О., Самойленко А., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується активацією сигнальних шляхів, залежних від РІЗ-кінази та транскрипційного фактора NF-κB, у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 29.

8. Поворознюк О., Пасічник Г., **Горак І.**, Биць Н., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 супроводжується посиленням прояву властивостей ракових стовбурових клітин // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 36.

9. Pasichnyk G., Povorozniuk O., **Horak I.**, Gerashchenko D., Samoilenko A., Drobot L. Overexpression of adaptor protein Ruk1/CIN85 in MCF-7 cells is accompanied by increased resistance to doxorubicin // International Symposium on Cell Biology jointly with 4-th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, 17-20 September 2014. – Uzhhorod, 2014. – P. 73.

10. Pasichnyk G., Povorozniuk O., **Horak I.**, Geraschenko G., Petukhov D., Samoilenko A., Byts N., McCubrey J., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression results in the development of stemness characteristics of MCF-7 breast adenocarcinoma cells // FEBS J. – 2014. – Vol. 281, Suppl. 1. – P. 432.

11. **Horak I.**, Petukhov D., Pasichnyk G., Gerashchenko D., Shabas N., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Ruk/CIN85 overexpression in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells is accompanied by altered migration and invasion // Materials of the Conference for Young Scientists 2015 – p. 161 (Kyiv, Ukraine, September 21-25, 2015).

12. **Horak Iryna**, Pasichnyk Ganna, Gerashchenko Denys, Petukhov Dmytro, Shabas Nadia, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression leads to increased adhesion, migration and invasion of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Materials of the International conference “Advances in cell biology and biotechnology” – 2015 – p. 81 (Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015).

13. **Horak I.**, Pasichnyk G., Gerashchenko D., Petukhov D., Shabas N., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Functional properties of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells depend on adaptor protein Ruk/CIN85 expression level // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, №4. – P. Матеріали конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня, 2015).

14. Стародубцева А., Пасічник Г., **Горак І.**, Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози

людини лінії MCF-7 асоційована з підвищенням їх резистентності до доксорубіцину // XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених. Шевченківська весна: Біологія-2015, Київ, 1-3 квітня 2015. – Київ, 2015. – С. 88.

15. **Horak I. R.** Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Матеріали конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016» - с. 14 (Київ, Україна, 26-27 травня 2016)

16. **Horak I.**, Shytikov D., Petukhov D., Pasichnyk G., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 promotes lung mttastasis of 4T1 murine breast adenocarcinoma cells // Materials of the International Scientific Conference “Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer” (Kyiv, Ukraine, June 13-15, 2016)

17. **Horak I.**, Pasichnyk G., Shabas N., Gerashchenko D., Petukhov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects breast cancer cell motility and invasion in vitro // Materials of X Parnas Conference. Young Scientists Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” – p. 47 (Wroclaw, Poland, July 10-12 2016).

18. **Horak Iryna**, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Pasichnyk Ganna, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT, migration and invasiveness of mice breast adenocarcinoma 4T1 cells // FEBS J., Vol. 283, Issue Supplement S1, P. 431. Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life (Ephesus/Kuşadası, Turkey, September 3-8, 2016).

19. **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Cellular plasticity as a driving force in cancer progression: the regulatory role of adaptor protein Ruk/CIN85. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (3): 102-103.

20. **Iryna Horak**, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. The adaptor protein Ruk/CIN85 paradoxically enhances EMT of triple negative mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells // Materials of International VACTRAIN/ 3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, January 16-17, 2017.

21. **Iryna Horak**, Dmytro Shytikov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces genomic reprogramming in breast cancer cells and thereby increases their malignancy // Joint Meeting of the 25-th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2-nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, June 6-9, 2017. - Ukr. Biochim. J. – 2017. – Vol. 89. – No 3. – P. 81.

22. **Horak I.**, Shytikov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a critical switch of EMT/MET programs in 4T1 cells // Materials of FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, Figueira da Foz, Portugal, June 18-24, 2017, - P.68.

23. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 increases breast cancer cells malignancy via promoting EMT// Materials of Minisimposium with international participation “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines”, Kyiv, Ukraine, May 11, 2017.

24. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Nadia Shabas, Dmytro Shytikov, Dmytro Petukhov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot.

Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates malignancy of breast cancer cells // Materials of 14-th Horizons in Molecular Biology, Goettingen, Germany, September 11-14, 2017, - P. 77.

25. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 enhances the features of CSCs in breast cancer cells // International Scientific Conference “Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy”, Kyiv, Ukraine, October 5-6, 2017. – Experimental Oncology – 2017, Vol. 39, P. 242.

26. **Iryna Horak**, Tetiana Skaterna, Denis Geraschenko, Artem Tykhomyrov, Olga Khudiakova, Liudmyla Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9 associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasive potential. Exp. Oncol. 2018; 40: 162.

27. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Dmytro Shytikov, Tetiana Skaterna, Olga Khudiakova, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a key regulator of epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer cells. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (Special Issue): 17.

28. **I. Horak**, T. Skaterna, O. Khudiakova, D. Gerashchenko, D. Shytikov, D. Petukhov, A. Tykhomyrov, L. Kapustianenko, T. Grynenko, L. Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in tumor cells results in inhibition of their invasiveness and metastatic potential mediated by angiostatin production. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

29. М. Кириченко, **I. Горак**, Л. Дробот. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу у клітинах раку молочної залози миші лінії 4Т1. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

30. М. Кір'якулова, А. Живоложний, **I. Горак**, А. Самойленко, Л. Дробот. Ізолювання та характеристика екзосом, що продукуються пухлинними клітинами з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

АНОТАЦІЯ

Горак І. Р. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню молекулярних механізмів, залежних від адаптерного протеїну Ruk/CIN85, що забезпечують контроль процесів міграції й інвазії пухлинних клітин на моделях *in vitro* та *in vivo*.

Було одержано сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується зниженням їх проліферативного потенціалу та адгезивності й посиленням рухливості та інвазивності *in vitro*, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 спричиняє протилежно скеровані ефекти. Вперше охарактеризовано зміни транскриптому пухлинних клітин з різними рівнями експресії цього адаптера і виявлено, що Ruk/CIN85 модулює експресію низки генів, залучених до процесів міграції та інвазії, в тому числі віментину, Е-кадгерину, транскрипційних факторів Twist1, Snai1, Zeb1/2, матриксних металопротеїназ MMP-2, MMP-9, факторів репрограмування Klf4, Oct4, Nanog.

Вперше показано, що рівень експресії Ruk/CIN85 негативно корелює з активністю матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9. Активація цих металопротеїназ супроводжується пригніченням інвазивності клітин лінії 4T1 з пригніченою експресією Ruk/CIN85, ймовірно, за рахунок продукування ангіостатинів. Виявлено ознаки амебоїдного типу міграції у клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85: пригнічення перицелюлярного протеолізу, округла форма клітин, наявність кортикального актинового кільця та вип'ячувань мембрани, підвищена активність і експресія лізілоксидази.

Встановлено, що клітини лінії 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин, таких як здатність до росту в неприкріпленому стані та самовідтворення, експресія специфічних поверхневих маркерів, підвищена резистентність до доксорубіцину.

Надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням їх здатності до екстравазування та метастазування в легені, тоді як down-регулювання Ruk/CIN85, навпаки, веде до практично повного пригнічення цих процесів. Встановлено, що в легневих метастазах Ruk/CIN85 індукує мезенхімно-епітелійний перехід, асоційований з посиленням проліферативної активності пухлинних клітин.

Одержані результати свідчать про те, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються підвищеною епітелійно-мезенхімною/мезенхімно-амебоїдною пластичністю, яка й лежить в основі посиленої інвазивності й метастазування, тоді як клітини 4T1 з пригніченням Ruk/CIN85 втрачають пластичність і перебувають у гомогенному епітелійному стані.

Ключові слова: Ruk/CIN85, епітелійно-мезенхімний перехід, пластичність, ракові стовбурові клітини, метастазування, інвазія, рак грудної залози.

ABSTRACT

Horak I. R. Role of adaptor protein Ruk/CIN85 in the control of migration and invasion of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. - Manuscript.

Thesis for PhD's degree by specialty 03.00.04 - biochemistry. - Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

This PhD thesis is aimed to investigate molecular mechanisms dependent on adaptor protein Ruk/CIN85 that control migration and invasion of cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

Murine breast adenocarcinoma 4T1 cells sublines with stable overexpression or knockdown of Ruk/CIN85 were generated. It was demonstrated that Ruk/CIN85 overexpression in sublines of 4T1 cells is accompanied by decreased proliferative potential and adhesiveness as well as increased motility and invasiveness *in vitro*, while Ruk/CIN85 downregulation leads to opposite effects. For the first time transcriptome analysis of cancer cells with different Ruk/CIN85 expression levels was performed. It revealed that adaptor protein Ruk/CIN85 modulates the expression of a number of genes involved in cancer cells migration and invasion, including transcription factors Twist1, Snai1, Zeb1/2, matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, reprogramming factors Klf4, Oct4, Nanog.

Ruk/CIN85 expression level in 4T1 cells correlates negatively with MMP-2 and MMP-9 activities. Activation of these enzymes inhibits invasion of Ruk/CIN85-downregulated cells via angiostatin production. The features of amoeboid-like motility in Ruk/CIN85-overexpressing 4T1 cells such as abrogated pericellular proteolysis, rounded cell shape, presence of cortical actin ring and membrane blebs, increased lysyl oxydase expression and activity were found.

Ruk/CIN85 overexpression in 4T1 cells was demonstrated to potentiate cancer stem cells properties, such as anchorage-independent growth, self-renewal, expression of specific surface markers, doxorubicin resistance.

It was found that overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 cells is accompanied by elevated extravasation and lung metastasis, while Ruk/CIN85 knockdown results in considerable quenching of metastatic potential. In the pulmonary metastases Ruk/CIN85 induces mesenchymal-epithelial transition, associated with enhanced proliferative activity of cancer cells.

The data obtained indicate that Ruk/CIN85-overexpressing 4T1 cells are characterized by potentiation of epithelial-mesenchymal/mesenchymal-amoeboid plasticity, underlying increased cancer cells invasion and metastasis. Ruk/CIN85-downregulated cells lack such plasticity and acquire homogenous epithelial-like state.

Key words: Ruk/CIN85, epithelial-mesenchymal transition, plasticity, cancer stem cells, metastasis, invasion, breast cancer.