

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №\_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2026 р.

**ЕКСПРЕСІЯ ІЗОФОРМ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ СКАФОЛДНІ  
ПРОТЕЇНИ РОДИНИ TKS В КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія та біохімія  
Поліщука Валентина Сергійовича

Науковий керівник від кафедри  
д-р біол. наук, ст. наук. співроб.  
Дворщенко К.О.

Робота виконана у відділі функціональної геноміки Інститут молекулярної біології та генетики НАН України під керівництвом в. о. завідувача відділу, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Кропивка Сергія Вікторовича

Оцінка захисту роботи

\_\_\_\_\_

**Київ – 2026 р.**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ADAM	– a disintegrin and metalloproteinase (дезінтегрин та металопротеїназа);
Arp2/3	– actin related protein 2/3 complex (комплекс актин-спорідненого білка 2/3);
CTTN	– cortactin (кортактин);
ECM	– extracellular matrix (позаклітинний матрикс);
EGF	– epidermal growth factor (епідермальний фактор росту);
FTHS	Frank–ter Haar syndrome (Синдром Франка-тер-Хаара);
MMP	– matrix metalloproteinase (матриксна металопротеїдаза);
N-WASP	– neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (нейронний білок синдрому Віскотта-Олдрича);
PX	– phospho homology (фосф гомологія);
SH3	– src homology 3 (src гомологія 3);
SRC	– sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (гомолог вірусного онкогену саркоми (Шмідта-Руппіна А-2));
TKS5	– tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains (субстрат тирозинкінази з 5 SH3 доменами);
WASP (WAVE)	– wiskott-aldrich syndrome protein (білок синдрому Віскотта-Олдрича).

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	5
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Молекулярна характеристика протеїнів TKS4 та TKS5 та їх ізоформ.....	7
1.1. Інвадоподії та структура, фосфорилування, конформаційна регуляція TKS4 та TKS5.....	7
1.2. Інтерактом білків TKS4 і TKS5 та клітинні процеси, в яких вони приймають участь.....	11
1.3. Патології, пов'язані з дефектами TKS4 та TKS5.....	18
1.4. Альтернативний сплайсинг транскриптів <i>SH3PXD2A</i> та <i>SH3PXD2B</i> ....	22
1.5. Функціональні ролі ізоформ та родини TKS у клітинній поведінці раку.....	24
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень.....	27
2.1. Матеріали та реактиви.....	27
2.2. Культури клітин та біологічний матеріал.....	27
2.3. Культивування клітин ссавців та приготування лізатів.....	28
2.4. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній.....	28
2.5. Очистка препаратів тотальної РНК від геномної ДНК.....	29
2.6. Синтез кДНК на препараті тотальної РНК.....	29
2.7. Кількісна ПЛР в реальному часі з використанням Taq-Man зондів.....	30
2.8. Обчислення результатів кількісної ПЛР в реальному часі.....	32
2.9. Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методикою Леммлі.....	32
2.10. Вестерн-блот аналіз.....	33
2.11. Статистичні методи.....	34
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати досліджень та обговорення.....	35

	4
3.1. Експресія загального пулу ізоформ <i>TKS5</i> та ізоформи <i>TKS5L</i> у панелі клітин людини за даними RT-qPCR.....	35
3.2. Експресія загального пулу ізоформ <i>TKS4</i> та ізоформ <i>TKS4L</i> , <i>TKS4b</i> та <i>TKS4c</i> у панелі клітин за даними RT-qPCR.....	40
3.3. Вестерн-блот аналіз ізоформ <i>TKS4L</i> , <i>TKS4b</i> , <i>TKS4c</i> в клітинах людини різного походження.....	50
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>54</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>55</b>

## ВСТУП

Білки родини tyrosine kinase substrate (TKS), а саме TKS4 та TKS5, є молекулярними скафолд-організаторами, які через наявність phospho homology (PX)-домену, численних SH3-домена та тирозинових сайтів координують мембранну локалізацію і рекрутинг протеаз у місцях утворення подосом і інвадоподій, що забезпечує локальну деградацію позаклітинного матриксу та сприяє клітинній міграції й інвазії, а отже становлять механістичний вузол при прогресуванні злоякісних пухлин [1].

В дослідженнях мутації гену *SH3PXD2B* (протеїн: TKS4) призводили до хвороби Frank–ter Haar syndrome (FTHS), врати ролі в сигнальних шляхах; втрата TKS4 призводила до проблем з метаболізмом та жировою тканиною. Для *SH3PXD2A* (протеїн: TKS5) немає подібних даних [2].

Відомо про роль TKS у рекрутуванні MT1-MMP і інших протеаз в розвитку раку, що робить дослідження регуляції їхніх ізоформ релевантним для пошуку біомаркерів інвазивності та потенційних терапевтичних мішеней, а також кращого розуміння канцерогенезу [1].

Генетичний локус *SH3PXD2B* і *SH3PXD2A* продукує кілька альтернативних транскриптів і білкових ізоформ, варіанти мають різний молекулярний склад і потенційно різні функції, проте їхній конкретний внесок у ініціацію та підтримку інвазивних структур залишається недостатньо вивченим [3-6].

Технічна складність полягає в тому, що стандартні генетичні підходи “на рівні гена” та звичайні антитіла часто не дозволяють розрізнити ізоформні внески, оскільки короткі ізоформи конвергують у спільні смуги на вестерн-блоті і загальні knock-out експерименти зачіпають усі транскрипти одночасно; це вимагає ізоформно-специфічних методів аналізу на рівні мРНК і білка.

Новизна роботи полягає у комплексному ізоформно-орієнтованому підході який поєднує кількісну RT-qPCR з використанням

ізоформ-специфічних праймерів і зондів та вестерн-блотинг з поліклональним антитілом, здатним детектувати як довгі так і короткі форми, що дає можливість кількісно зіставити профілі мРНК і білка для кожної ізоформи.

Практичне значення полягає у створенні діаграм клітинно-типових співвідношень TKS-ізоформ, установленні ступеня кореляції між транскриптом і білковим пулом, оцінці ролі посттранскрипційної регуляції у формуванні функціонального білкового профілю та виокремленні кандидатів на ізоформні біомаркери інвазивності або цільові молекулярні мішені для подальших функціональних і терапевтичних досліджень.

Метою роботи було визначити й порівняти експресію ізоформ генів *TKS* (*TKS5L*, *TKS4L*, *TKS4b*, *TKS4c* та загальні *TKS5* і *TKS4*) у клітинах людини методом RT-qPCR і вестерн-блоту, а також оцінити кореляцію між рівнями мРНК і відповідних білків.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити експресію генів *TKS5L* та загального пулу ізоформ *TKS5* в клітинах людини різного походження методом кількісної ПЛР.
2. Оцінити експресію генів *TKS4L*, *TKS4b*, *TKS4c* та загального пулу ізоформ *TKS4* в клітинах людини різного походження методом кількісної ПЛР.
3. Визначити експресію *TKS4L*, *TKS4b*, *TKS4c* методом вестерн блот аналізу.

# РОЗДІЛ 1

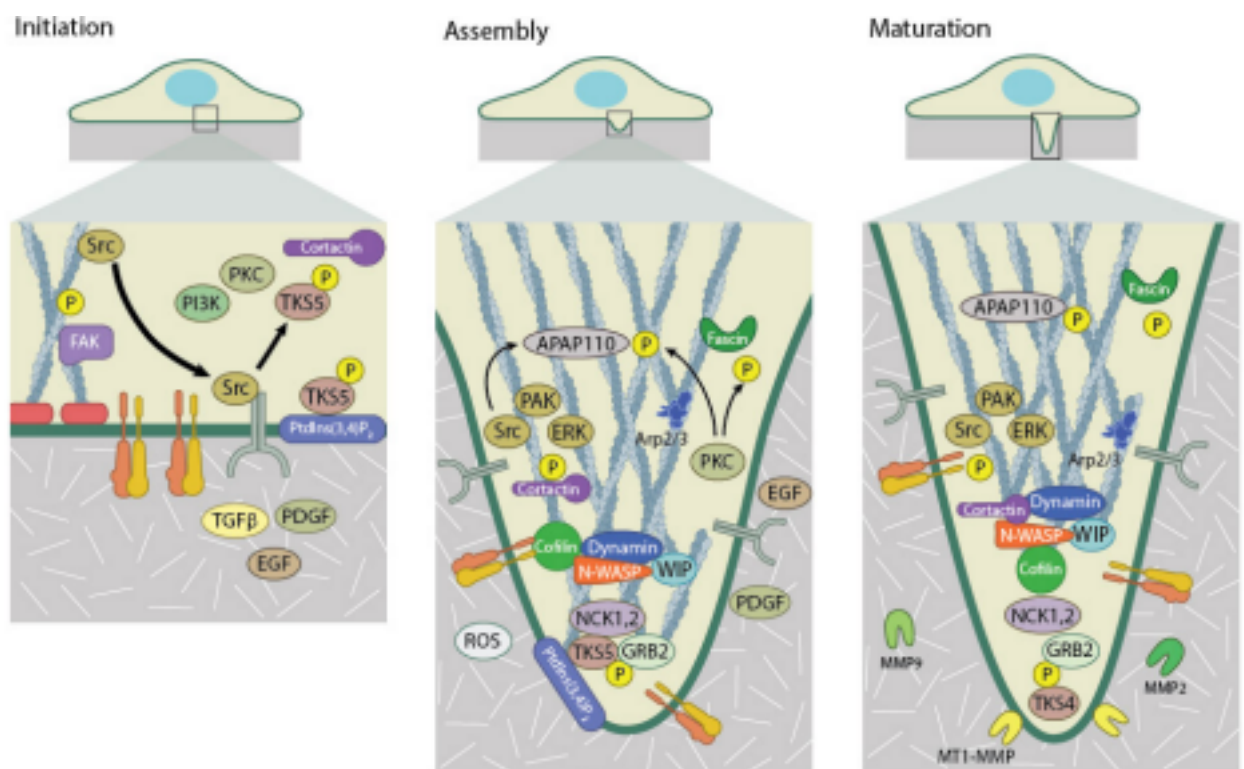
## МОЛЕКУЛЯРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕЇНІВ TKS4 ТА TKS5 ТА ЇХ ІЗОФОРМ

### 1.1. Інвадоподії та структура, фосфорилювання, конформаційна регуляція TKS4 та TKS5

TKS4 і TKS5 (гени: *SH3PXD2B* *SH3PXD2A* відповідно) є цитозольними білками-молекулярними скафолдами, які, разом з p40phox (ген: *NCF4*), p41phox (ген: *NOXO1*), p47phox (ген: *NCF1*) включені до сім'ї білків організаторів p47 [1, 7], де кожен з представлених протеїнів має подібну доменну архітектуру, ці білки виконують роль в утворенні протрузивних структур подосом та інвадоподій.

Подосоми та інвадоподії – це споріднені, проте морфологічно й функціонально відмінні актин-збагачені протрузивні утворення плазматичної мембрани, які реалізують локалізовану адгезію та протеолітичну деградацію позаклітинного матриксу і працюють як ефектори для фізіологічної міграції та патологічної інвазії: подосоми утворюються в нормальних рухливих клітинах: макрофаги, дендритні клітини, моноцити, остеокласти, і зазвичай мають компактну організацію – центральне актинове ядро оточене адгезивним кільцем [8] і високою динамікою життєвого циклу, що робить їх спеціалізованими на точковому прикріпленні й локальній ремоделюванні матриксу. Інвадоподії частіше зустрічаються в агресивних, інвазивних клітинах, є глибшими, стабільнішими в часі, й багатими на протеази, отже їхня морфологія, і склад прямо пов'язані з можливістю клітини проходити крізь матрикс, й інвазувати тканини. Молекулярно обидві органели використовують спільні складники – Arp2/3-залежну нуклеацію актину, N-WASP, кортактин, Nck та інші адаптори – але відрізняються пропорціями, [9] і просторовою організацією цих компонентів, а також ступенем

рекрутингу протеолітичних комплексів, що визначає їхню протеолітичну здатність, і роль у патології; регуляція переходу від ініціації до дозрівання цих структур включає Src/EGFR-залежні кіназні шляхи [10], схематичну ілюстрацію дозрівання інвадоподій представлено на рисунку 1.1, посттрансляційні модифікації, і конформаційні зміни скафолд-протеїнів, що відкривають їхні мембранозв'язуючі домени й дозволяють кооперативний рекрутинг як актинових ефektorів, так і протеаз. У контексті онкології ключовим є те, що зсув балансу в бік більш стабільних і численних інвадоподій та підвищена локальна протеолітична активність корелюють із підвищеною інвазивністю та метастатичним потенціалом клітин, тож молекулярні компоненти цих структур розглядаються як перспективні біомаркери і терапевтичні мішені.

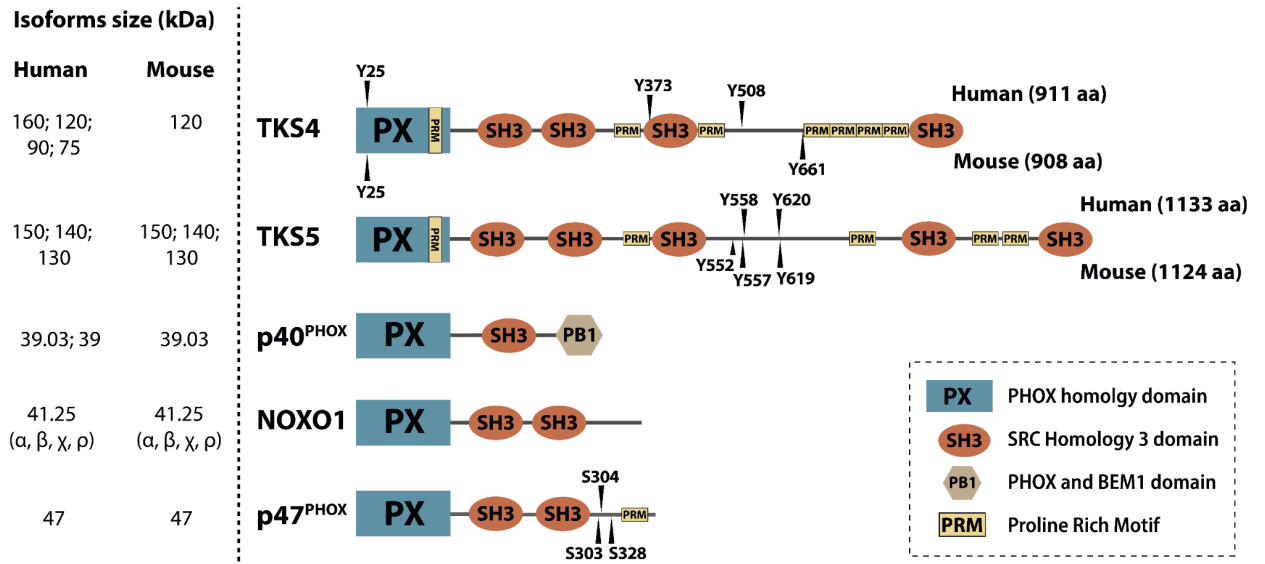


**Рис. 1.1.** Схематичне зображення утворення інвадоподії [11]

Обидва типи структур мають спільне ядро молекулярних компонентів, включно з Arp2/3-залежною нуклеацією актину, N-WASP, кортактином і Nck,

але відрізняються просторовою організацією цих елементів та ступенем залучення протеаз [12, 13]; їхнє дозрівання регулюється Src/EGFR-залежними сигнальними шляхами та посттрансляційними модифікаціями скафолд-білків, які відкривають мембранозв'язуючі й партнер-зв'язувальні інтерфейси. У цьому контексті TKS4 і TKS5 є організаторами цих структур: вони забезпечують мембранну локалізацію, збір сигнальних комплексів і координацію актинового та протеолітичного модулів.

TKS4 і TKS5 протеїни містять N-кінцевий PX домен, який зв'язує специфічні фосфатидилінозитолі в мембрані. PX-домен TKS4 досліджений менш детально, однак показано, що він здатний зв'язувати фосфоінозитиди, зокрема PtdIns3P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> [14] та PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> [15]. TKS5 може приєднуватися до: PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> [16]. TKS4 та TKS5 також мають численні пролінові мотиви та Src-гомолігічні SH3-домени: відповідно чотири у TKS4 та п'ять у TKS5, також тирозинові сайти фософрילювання для TKS4: Tyr25, Tyr50, Tyr373; TKS5: Tyr558, Tyr620. PX-домен забезпечує мембранну локалізацію через зв'язок з фосфатидилінозитолами, тоді як SH3-домени є модулями для білково-білкових взаємодій, що розпізнають пролінові мотиви партнерів. Завдяки такій будові TKS4 та TKS5 слугують платформою для рекрутування багатьох сигнальних білків до клітинної мембрани [1]. Схематичну ілюстрацію, що демонструє доменну будову білків організаторів p47, представлено на рисунку 1.2.



**Рис. 1.2.** Члени родини білків-організаторів p47 [1]

Фосфорилування тирозину є механізмом активації TKS-протеїнів тому, що в спокійному стані молекула перебуває в автоінгібованій конформації, коли її N-кінцевий PX-домен функціонально маскований внутрішньомолекулярними контактами з власними SH3-доменами, які зв'язуються з пролін-збагаченими мотивами в С-термінальній частині протеїну [1]. така конформаційна маска перешкоджає ефективному зв'язуванню PX-домена з мембранними фосфоліпідами і тримає TKS у цитоплазматичній локалізації, тоді як зовнішній стимул, зокрема зв'язування епідермального фактора росту з рецептором EGFR, призводить до швидкої активації Src-родинних тирозинкіназ і прямого фосфорилування визначених тирозинових залишків у TKS4 і TKS5 [17]. Це фосфорилування знижує внутрішню афінність SH3-доменної взаємодії з пролін-збагаченими мотивами, індукує розгортання молекули, відкриває PX-домен для зв'язування з фосфоінозитолами мембрани, зокрема PI(3,4)P<sub>2</sub>, і таким чином забезпечує стійку мембранну анкеризацію TKS, що є необхідною умовою для рекрутингу адапторів типу Nck, мобілізації N-WASP/Arp2/3-залежної актинової полімеризації та координації локальної доставки і активації протеаз типу MT1-MMP й ADAM, які виконують протеолітичний розпад

позаклітинного матриксу завдяки інвадоподіям і подосомам [16, 18]. Експериментальні дані показують, що видалення або мутація ключових тирозинів у TKS призводить до втрати їхньої здатності рекрутувати ці ефектори та формувати функціональні інвазійні структури [17], а блокада Src знижує стимульоване EGF-залежне фосфорилування і мембранну транслокацію TKS, що свідчить про причинно-наслідковий ланцюг від стимулу через EGFR до активації Src і подальшої відкритої модифікації TKS [14, 19, 20]. TKS протеїни наявні як в звичайних клітинах організму так і онкогенних, загалом основним результатом їх роботи є утворення подосом та інвадоподій, для здорових та ракових клітин відповідно. TKS4 залучений до низки процесів, таких як регуляція епітально-мезенхімального переходу, модуляція актину, фосфорегуляція, скафолдне функціонування [21]. TKS4 залучений до формування пухлин та розвитку різних типів раку людини, e.g. меланома [22], гастрокарцинома [23], та гепатоклітинна карцинома [24].

Отже, TKS4 і TKS5 є критичними p47-подібними скафолд-білками, чия доменна організація та Src-залежне фосфорилування забезпечують перехід від автоінгібованого цитозольного стану до активної мембранної локалізації. У цьому стані вони організують мультибілкові комплекси, що інтегрують актинову полімеризацію та протеолітичну активність, визначаючи формування і функціональну зрілість подосом та інвадоподій, а також пов'язану з ними інвазивну поведінку клітин.

## **1.2. Інтерактом білків TKS4 і TKS5 та клітинні процеси, в яких вони приймають участь**

Оскільки TKS4 та TKS5 є скафолдними протеїнами, то вони мають широкий ряд протеїнів партнерів, які при зв'язуванні з TKS протеїнами індують спектр процесів. Для Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) завдяки TKS4 відбувається активація власного алостеричного

процесу, що в результаті призводить до ініціації нових актинових відростків під час клітинного руху [25, 26]. Однак роль N-WASP не є однозначною, викликає серію дискусій, щодо його ролі в канцерогенезі, частина досліджень підтверджують його супресійну дію на канцерогенез на початкових етапах; інша частина досліджень інформує про те, що на пізніх етапах канцерогенезу N-WASP має значну проінвазивну дію [27, 28]. Ще одним відомим білком партнером є Cortactin (CTTN), який є також скафолдним білком і колокалізується з TKS4, його роль полягає в сприянні рекрутування білків до сайтів полімеризації актину, до таких протеїнів належать Arp 2/3 complex, F-actin, SRC, і власне N-WASP [15]. Роль CTTN була підтверджена *in vitro* так *in vivo* як промотера в контексті проліферації і посиленні MAPK сигнального шляху зниженням в колоректальних клітинах EGF рецепторів [29]. Також відомо, що третій SH3 домен TKS4, здатен зв'язуватися з білками, які залучені до ендо-екзоцитозу, як: DNM2, OPHN1 – також відомо про слабку взаємодію цих білків з четвертим SH3 доменом TKS4 [25]. Раніше було показано взаємодію з пролін-збагаченим доменом SYNJ1 [30]. Ruk/CIN85 скафолдні протеїни для яких також була показана взаємодія з TKS4, при тому для ізоформ з наступною вагою: 75, 90 та 160 kDa [31]. Nox1 ще один важливий білок партнер TKS4, завдяки фосфорилюванню Y110 білка Nox1, та фосфорилюванню Tyr508 TKS4 відбувається їх взаємодія, в результаті, якої спостерігається вивільнення активних форм кисню (АФК) [32].

CD2-associated protein (CD2AP) є ще одним протеїном партнером TKS4, це було доведено за допомогою клітин раку товстої кишки. CD2AP, актиностабілізуючий скафолдний білок, відіграє вирішальну роль у динамічному складанні та ремоделюванні цитоскелету шляхом безпосереднього зв'язування з нитчастим актином, CTTN, TKS4 або CAPZA1 [33-35]. Growth factor receptor binding protein 2 (GRB2), давно описаний партнер зв'язування TKS4, відіграє роль у сигнальних шляхах раку. Як адаптерний білок, GRB2 бере участь у регуляції клітинного циклу, актиновій

рухливості клітин та сигналізації рецепторної тирозинкінази [36, 37]. Дослідження показали, що TKS4 та TKS5 також взаємодіють з білками сімейства: a disintegrin and metalloproteinase (ADAM). Показано, що TKS4 взаємодіє з MT1-MMP у ендосомах та сприяє його ADAM-опосередкованому розщепленню, що призводить до утворення каталітично активного ектодомену ферменту. Через цю взаємодію TKS4 виступає адапторним білком, який організовує зближення MT1-MMP з ADAM15 та сприяє протеолітичній активності [38].

TKS5 функціонує як молекулярний адаптор, який забезпечує просторову координацію між протеазою MT1-MMP (MMP14) та рядом ADAM-шеддаз, і робить це через комбінацію специфічних доменних і субклітинних механізмів: N-кінцевий PX-домен TKS5 розпізнає фосфоліпідні сигнали ендосом і в поєднанні з цитозольною хвостовою ділянкою MT1-MMP забезпечує взаємодію за ендосомальною мембраною, тоді як множинні C-термінальні SH3-домени TKS5 взаємодіють із пролін-збагаченими послідовностями ADAM-білків, що дозволяє TKS5 виступати мостом між двома класами протеаз. Ця роль мосту підтверджена корельованою локалізацією TKS5 і MT1-MMP на ендосомах та інвадоподіях і функціональними експериментами, які показують, що наявність MT1-MMP є необхідною для ендосомального рекрутування TKS5, а втрата TKS5 або TKS4 знижує ADAM-опосередковану активність і матриксну деградацію.

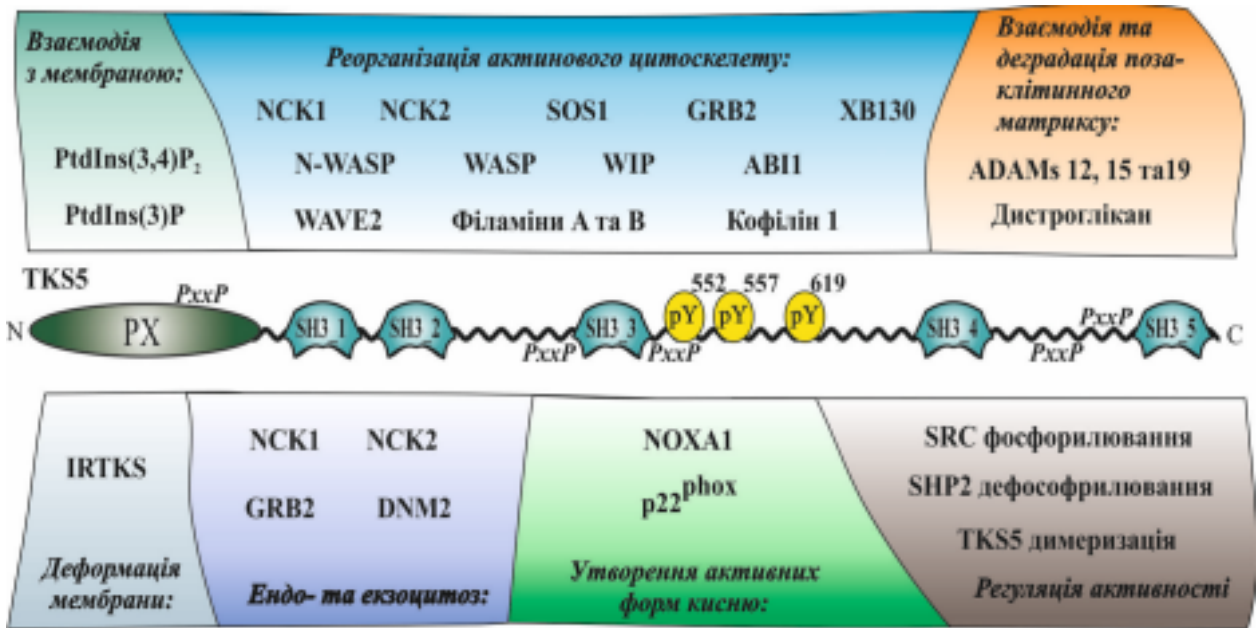
Окремі представники родини ADAM – зокрема ADAM12 і ADAM15 – були виявлені в комплексах з TKS5 у коїмунопреципітаціях і колокалізуються в місцях подосом та інвадоподій, що свідчить про прямі або опосередковані фізичні взаємодії. Функціонально це означає, що TKS5 сприяє зближенню субстратів MT1-MMP і ADAM-шеддаз в обмеженому ендосомальному-везикулярному просторі, де низьке рН і локальна компартменталізація сприяють ADAM-опосередкованому процесу або шеддингу каталітичного домену MT1-MMP, з утворенням розчинної форми, яка може бути секретована або асоційована з екзосомами й переносити

інвазивну здатність між клітинами [16].

Щодо відмінностей між окремими ADAM-протеїнами: біохімічний скринінг SH3-інтерактомів показав, що ADAM12 і ADAM15 мають відносно сильну спорідненість до SH3-доменів партнера та корелюють зі спроможністю входити в комплекси з TKS5, тоді як ADAM19 у цих дослідженнях демонстрував схожий профіль зв'язування до ADAM12, але загалом меншу афінність до TKS5 і специфічніші партнерські взаємодії. Отже, для ADAM12 та 15 є достатньо експериментальних підстав говорити про функціональні комплекси з TKS5, тоді як для ADAM19 існують сигнали про можливість взаємодії, але її сила, контекст залучення та функціональні наслідки потребують додаткових детальних досліджень з використанням коїмунопреципітації, картографування сайтів зв'язування SH3-домена та функціональних нокаун/відновних експериментів [16].

Молекулярні наслідки цієї архітекtonіки є багатограними і важливими для розуміння розвитку раку. TKS5-опосередковане зближення ADAM-шеддаз і MT1-MMP забезпечує просторову і часову контрольну-регуляцію протеолітичної активності. Шеддинг MT1-MMP у ендосомах може створювати мобільні, активні форми протеази, що поширюють деградаційну здатність навіть на віддалені клітини. Оскільки SH3-залежні інтерфейси є короткими пролін-збагаченими мотивами, виникає потенціал для конкурентних або регуляторних взаємодій з іншими SH3-вмісними партнерами, що робить склад TKS5-орієнтованих комплексів динамічним і чутливим до змін сигналіngu [38].

TKS5 також взаємодіє з Rab40b, прикріплюючи везикули, що містять MMP, до інвадоподій [39]. TKS5 ініціює роботу апарату полімеризації актину завдяки рекрутуванню Nck1 та Nck2, що в свою чергу призводить до зниження регуляції N-WASP та Arp2/3 [40]. Загалом TKS5 містить більшу кількість партнерів протеїнів ніж TKS4, тому замість опису кожного окремо, релевантно надати діаграму, яка ілюструє доменну структуру TKS5, а також перелік протеїнів партнерів, що можна спостерігати на рисунку 1.3 [41].



**Рис. 1.3.** Схематичне зображення доменної структури скафолдного білка TKS5 та його білки партнери [41]

Фактичний та потенційний інтерактом білка TKS5 постійно розширюється у міру накопичення протеомних і біохімічних даних, що відображає його роль як мультидоменного скафолдного адаптора у сигнальних та мембранно-транспортних комплексах. Наявність кількох SH3-доменів у С-термінальній частині TKS5 забезпечує здатність зв'язувати пролін-збагачені мотиви різноманітних партнерів, тому цей білок може інтегрувати компоненти актинового цитоскелета, системи ендоцитозу та сигнальних каскадів у місцях формування подосом і інвадоподій. У протеомних скринінгах і дослідженнях білково-білкових взаємодій показано, що TKS5 взаємодіє з рядом адапторних білків ендоцитозу і мембранного ремоделювання, серед яких CIN85, ITSN1, ITSN2, AMPH1 та BIN1 [42]. Зокрема, CIN85 є адаптором сигнальних комплексів рецепторних тирозинкіназ і бере участь у регуляції ендоцитозу та деградації рецепторів [43], тоді як білки родини інтерсектинів (ITSN1 і ITSN2) функціонують як мультидоменні платформи для координації ендоцитозу клатринового [44]. У свою чергу, Amphiphysin 1 і BIN1 належать до BAR-доменних білків, які індукують кривизну мембрани і беруть участь у формуванні ендоцитозних

везикул та мембранних тубул [45]. Наявність таких партнерів у інтерактомі TKS5 свідчить, що цей білок не лише організує комплекси протеаз у інвадоподіях, але й інтегрує процеси мембранного трафіку, ремоделювання мембрани і актинової динаміки, що необхідно для ефективного транспорту ферментів деградації матриксу та росту протрузивних структур. Таким чином, поступове розширення інтерактому TKS5 демонструє, що він функціонує як центральний організатор мультибілкових комплексів, які поєднують сигнальні, цитоскелетні та мембранно-транспортні механізми клітини, що є критично важливими для формування інвадоподій і реалізації клітинної інвазії [42]. Власне для системного розуміння їх точної взаємодії, та ролі в клітинних процесах потрібні додаткові дослідження.

Інше нещодавнє дослідження із застосуванням конфокальної мікроскопії, збільшило потенційний інтерактом TKS5, додавши еукаріотичні фактори ініціації, та протеїни ендодлазматичного ретикулуму; загальний інтерактом TKS5 у контексті цього дослідження наведено в таблиці, яка подана у вигляді малюнка на рисунку 1.4 [8].

Not validated in invadosomes
BASP1, BZW2, C1QBP, CLTB, DLD, EIF3A, EMD, GUSB, HNRNPAB, HNRNPU, LAMP2, LARP4, LRRC59, NUFIP2, PPM1G, PRKAG1, PRR2C2, PRRC2A, PSMD7, PUF60, PVR, RPL0, RPL3, RPL4, RPL5, RPL6, RPL7, RPL8, RPL7A, RPL13, RPL14, RPL15, RPL18A, RPL19, RPL29, RPL32, RPL36A, RPS6, RPS6KA4, RPS8, RTN4, RTRAF, SART1, SPATS2, SRSF1, STAU1, TCOF1, YBX1, YWHAB, YWHAЕ, YWHAG, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ
Validated in at least one of the invadosomes organization
ADAM15, ADAM19, ASPH, BAG3, CALD1, CD44, CTTN, EIF4B, FNBP1L, FXR1, G3BP1, HNRNPA1, IGF2BP2, ITGA5, LAMP1, MAP4, MMP14, MYH9, NONO, NPM1, PABPC1, PPP1CA, PRKAA1, PTBP1, RPL10A, RPL34, RPS4X, RRBP1, SH3PXD2A, SSB, STX7, SYNCRIP, THBD, YBX3

**Рис. 1.4.** Список 88 загальних білків, виявлених у кожному стані. Кольорові коди: помаранчевий – трансляція, зелений – актиновий цитоскелет, синій – адгезія [8]

TKS4 і TKS5 функціонують як мультидоменні скафолд-білки, що через РХ-опосередковану мембранну локалізацію та SH3-залежні білок-білкові взаємодії інтегрують актинову полімеризацію, мембранний трафік і протеолітичну активність; їх Src-залежна активація забезпечує рекрутинг партнерів, організацію ендосомальних і плазматичних протеолітичних комплексів та координацію динаміки інвадоподій і подосом. Розширений інтерактом, особливо для TKS5, включає адаптори ендоцитозу, VAR-доменні білки та сигнальні компоненти, що підкреслює їхню роль як центральних вузлів, які поєднують цитоскелетні, мембранно-транспортні й сигнальні процеси, критичні для клітинної інвазії та ремоделювання позаклітинного матриксу.

### 1.3. Патології, пов'язані з дефектами TKS4 та TKS5

Протеїни TKS4 та TKS5, в тому числі пов'язані й з іншими хворобами, оскільки як зазначалося вище, вони і так існують в організмі, і виконують ряд певних гомеостатичних функцій. Одне з таких порушень є FTNS – рецесивний множинний вроджений синдром з виразними краніофациальними, скелетними, офтальмологічними та серцевими аномаліями: мутації в *SH3PXD2B* були ідентифіковані у пацієнтів з FTNS і вважаються причиною синдрому. Класичні генетичні картографічні та функціональні дослідження підтвердили локус на хромосомі 5q35.1 і продемонстрували, що втрата функції *SH3PXD2B* викликає клінічну картину FTNS [2, 46].

Клінічна фенотипова палітра FTNS включає – краніофациальні дисплазії, вроджені дефекти серця, черепно-лицеві аномалії, деформації довгих кісток, глаукому або підвищений внутрішньоочний тиск і затримку розвитку, гіповербальні прояви; у дослідженнях повідомлялися як летальні, так і менш тяжкі форми захворювання залежно від природи мутації й генетичного фону пацієнта [46].

Окрему групу проявів пов'язують із впливом дефекту TKS4 на кісткову систему і м'язово-скелетний розвиток. У мишей з нокаутіваним *SH3PXD2B* і в поодиноких хворих на FTNS виявлено зменшену товщину кісткових трабекул, підвищену пористість кістки, зниження маркерів остеобластної диференціації – ці знахідки інтерпретуються як підґрунтя для розвитку остеопенії, остеопорозоподібних змін при дефіциті TKS4 [47].

Інший дискретний фенотип, пов'язаний із втратою TKS4, – це призводить до порушення жирової тканини та метаболічних процесів: дослідження на мишачих моделях показали, що відсутність TKS4 модифікує морфологію адипоцитів, зменшує загальний жировий масив і сприяє перетворенню білої жирової тканини у бежеподібні адипоцити, зі зміною експресії peroxisome proliferator-activated receptor gamma-залежних генів. Ці дані вказують на потенційну роль TKS4 у регуляції адипогенезу й гомеостазу

жирових депо, що може мати значення для станів, пов'язаних із обміном речовин [48].

Мутації в РХ-домені TKS4 як R43W, можуть зачепити сайт зв'язування, порушують фосфоінозитид-зв'язування й мембранну транслокацію, що призводить до нефункціональної взаємодії в сигнальних каскадах, зокрема з Src і рецептором EGFR, і до порушення координації міграційної відповіді клітин. Ці молекулярні механізми пояснюють, чому дефіцит або мутації TKS4 мають широкий вплив на тканинний розвиток [49].

Генетичні та модельні дані свідчать, що TKS5 відіграє важливу роль у ембріональному розвитку, зокрема в процесах, пов'язаних з міграцією нейронального гребеня і формуванням краніофасціальних структур; у мишачих моделях порушення локусу *SH3PXD2A* призводить до повного розщеплення вторинного піднебіння та часткової неонатальної летальності, що демонструє значення ролі довгої ізоформи для нормального розвитку [50].

У людини прямих, широко признаних моногенних синдромів, однозначно спричинених мутаціями *SH3PXD2A*, на сьогодні немає такої ж сили доказів, як у випадку *SH3PXD2B* і FTHS; натомість наявні дані вказують на можливу асоціацію *SH3PXD2A* з окремими вродженими вадами розвитку та з дитячими краніофасціальними аномаліями у статистичних/асоціативних дослідженнях. Зокрема, генетичний аналіз та наступні дослідження виділили *SH3PXD2A* як кандидат-ген для несиндромного розщеплення губи та, або піднебіння, що узгоджується з даними про функцію гена в модельних організмах [51].

Окремий напрям досліджень показав зв'язок варіантів *SH3PXD2A* із сімейними формами rosacea – хронічного запального захворювання шкіри з компонентом нейрогенної запальної відповіді. У великому дослідженні з WGS/WES були виявлені рідкісні шкідливі варіанти *SH3PXD2A* у кількох сім'ях з розеа; функціональні експерименти на клітинах продемонстрували, що деякі з цих варіантів підвищують утворення вазоактивних нейропептидів,

що обґрунтовує можливий патофізіологічний зв'язок між варіантами гена і нейрогенним запаленням шкіри. Ці дані поки що мають характер валідаційних знахідок і потребують розширення у незалежних когортах, але вони виразно вказують на нефункціональний спектр асоціацій *SH3PXD2A* у людини [52].

TKS5 необхідний для нормальної міграції клітин нейронного гребеня у зародку zebrafish; порушення цієї міграції може призводити до краніофасціальних дефектів, розщеплення піднебіння. Це робить спостережувані у мишей фенотипи біологічно правдоподібними моделями подібних аномалій у людей, хоча загалом паталогічних станів, безпосередньо пов'язаних із порушенням функцій TKS5 у людей, поки не виявлено [50].

Отже, білки TKS4 і TKS5, що кодуються генами *SH3PXD2B* та *SH3PXD2A*, належать до родини організаторів NADPH-оксидазного комплексу типу p47 і виконують функцію мультидоменних цитозольних адапторних скафолд-білків, здатних координувати формування багатокомпонентних сигнальних і цитоскелетних комплексів. Їхня доменна архітектура включає N-кінцевий PX-домен, який забезпечує зв'язування з фосфатидилінозитолами мембран, та кілька SH3-доменів, що дозволяють взаємодіяти з пролін-збагаченими мотивами партнерських білків. Завдяки цьому TKS-протеїни можуть рекрутувати сигнальні молекули, регулятори актинового цитоскелета та протеази до локальних ділянок плазматичної мембрани, де формуються актин-збагачені протрузивні структури – подосоми та інвадоподії, які забезпечують адгезію клітин і деградацію позаклітинного матриксу під час клітинної міграції, ремоделювання тканин та пухлинної інвазії. Активація TKS4 і TKS5 відбувається через Src-залежне фосфорилування після стимуляції рецепторів факторів росту, що призводить до конформаційних змін білка, мембранної локалізації та рекрутингу актин-полімеризаційних комплексів, таких як N-WASP і Arp2/3, а також металопротеїназ родин MMP і ADAM, необхідних для локального протеолітичного ремоделювання матриксу. Важливою характеристикою цих

білків є їхній розгалужений інтерактом: для TKS5 описано взаємодії з білками ендоцитозу та мембранного ремоделювання, зокрема CIN85, ITSN1, ITSN2, AMPH1 та BIN1, що свідчить про його участь у поєднанні сигнальних шляхів, динаміки актинового цитоскелета та мембранного трафіку. Крім ролі у клітинній інвазії, TKS-білки важливі для розвитку організму і підтримання тканинного гомеостазу: мутації в гені *SH3PXD2B*, який кодує TKS4, спричиняють розвиток FTNS, рідкісного спадкового захворювання з краніофасціальними, скелетними та серцево-судинними аномаліями. Таким чином, TKS4 і TKS5 є регуляторами клітинної міграції, ремоделювання позаклітинного матриксу та формування інвазивних клітинних структур, а подальше вивчення їхніх білкових взаємодій і механізмів регуляції є важливим для розуміння як нормальних клітинних процесів, так і патологій розвитку та пухлинної інвазії.

TKS4 і TKS5, як мультидоменні скафолд-білки, виконують функції не лише в інвазії, а й у нормальному розвитку та гомеостазі тканин; мутації в *SH3PXD2B* достовірно асоційовані з FTNS, що проявляється краніофасціальними, скелетними, офтальмологічними та серцевими аномаліями, а також порушеннями кісткового метаболізму й адипогенезу, тоді як для *SH3PXD2A* переважають дані про роль у ембріогенезі, зокрема міграції клітин нейронального гребеня та формуванні краніофасціальних структур, із обмеженими, переважно асоціативними доказами участі у людських патологіях. Сукупно, порушення структури, мембранної локалізації або інтерактому TKS-протеїнів призводить до дефектів координації актинового цитоскелета, мембранного трафіку та протеолітичної активності, що пояснює їхній плейотропний внесок у розвиткові аномалії та захворювання.

#### 1.4. Альтернативний сплайсинг транскриптів *SH3PXD2A* та *SH3PXD2B*

мРНК генів TKS4 та TKS5 притаманний альтернативний сплайсинг, який призводить до утворення багатьох ізоформ. Протеїн TKS5 кодується геном *SH3PXD2A*, який містить 17 екзонів, розташований у людей на 10-й хромосомі (10q24.33). Цей ген піддається альтернативному сплайсингу, утворюючи три різні ізоформи: Q5TCZ1-1, Q5TCZ1-2 та Q5TCZ1-3. Ці ізоформи відрізняються за довжиною, причому Q5TCZ1-1 є найдовшою (1133 амінокислоти) і вважається канонічною формою. Q5TCZ1-2 і Q5TCZ1-3 є коротшими і складають 940 і 1105 амінокислот відповідно [3, 4].

Загалом ізоформи мають й іншу назву: TKS5 $\alpha$  (TKS5long), TKS5 $\beta$  та TKS5short, кожна з яких транскрибується з окремого промотора. Ізоформа TKS5 $\alpha$  є єдиною, що містить PX-домен, тоді як TKS5 $\beta$  і TKS5short ініціюються перед першим SH3-доменом і, відповідно, не включають PX-домен [50, 53, 54].

Окрім цього, описано два варіанти альтернативного сплайсингу TKS5, що локалізуються по обидва боки першого SH3-домену [53].

Білок TKS4 напротивагу кодується геном *SH3PXD2B*, який містить 15 екзонів, розташований у людей на 5-й хромосомі (5q35.1). Цей ген піддається альтернативному сплайсингу, утворюючи чотири різні ізоформи: A1X283, G3V144, H0YAU1 та A0A1B0GUF2. Ці ізоформи відрізняються за довжиною, причому A1X283 є найдовшою (911 амінокислот) і вважається канонічною формою. G3V144, H0YAU1, та A0A1B0GUF2 є коротшими і складають 430, 81, 444, амінокислот відповідно [17, 18].

На відміну від TKS5, ізоформи TKS4 мало дослідженні, проте зараз відомо що їх є чотири [31]. мРНК обох білків широко експресується в тканинах, однак рівень білкової експресії в різних тканинах залишається недостатньо вивченим. TKS5 $\alpha$ , подібно до TKS5 $\beta$ , виявляється майже в усіх тканинах, хоча рівень мРНК TKS5 $\beta$  може бути значно нижчим, ніж TKS5 $\alpha$ ,

залежно від типу тканини [50]. Експресія TKS5short у різних тканинах поки що не повністю охарактеризована.

У ембріональних фібробластах переважають ізоформи TKS5 $\beta$  і TKS5short, тоді як у ракових клітинах широко експресується TKS5 $\alpha$  [22, 50, 55]. Біологічні функції TKS5 $\beta$  та TKS5short наразі залишаються недостатньо з'ясованими.

У раку легень високий рівень TKS5 $\alpha$  або високий коефіцієнт TKS5 $\alpha$ /TKS5 $\beta$ +TKS5short асоціювався з гіршою виживаністю пацієнтів на ранніх стадіях захворювання.

У раку молочної залози підвищена експресія TKS5 $\alpha$  також корелює зі зниженим рівнем виживаності, особливо на першій та другій стадіях. При цьому рівні TKS5 $\beta$  та TKS5short або співвідношення коротких і довгих ізоформ не впливали на прогноз [56].

У тканинах меланоми рівні TKS5 і TKS4 були значно вищими, ніж у неусах, причому рівень TKS5, на відміну від TKS4, зростав із прогресуванням хвороби [22]. Підвищення експресії TKS5 також спостерігалось при прогресуванні раку простати [57].

Сьогодні відомо, що в нормальних фібробластах найбільш поширеними є ізоформи TKS5 $\beta$  і TKS5short, які не містять PX-домену. Трансформація клітин Src призводить до підвищення експресії TKS5 $\alpha$  та одночасної дестабілізації TKS5 $\beta$  і/або TKS5short [57].

Отже, цитоплазматична локалізація TKS5 у нормальних фібробластах, імовірно, пов'язана саме з відсутністю PX-домену, а не з його конформаційною недоступністю для зв'язування ліпідів [50].

Ще в одному дослідженні виявили, що рівень експресії довгої ізоформи TKS5 був підвищений у клітинах, що походять з метастазів, порівняно з рівнем у неметастатичних пухлинних клітинах [54].

Для повного розуміння внутрішньомолекулярних взаємодій доменів TKS5 необхідні ультраструктурні дослідження.

## 1.5. Функціональні ролі ізоформ та родини TKS у клітинній поведінці раку

Більшість попередніх експериментів як для TKS4, так і для TKS5 використовували підходи “локус-орієнтовані” (загальний knockout, загальні siRNA, антитіла до консервативних регіонів) або аналізи транскриптів/експресії на рівні локусу (TCGA, GENT2), що не дозволяє визначити, яка саме ізоформа забезпечує спостережуваний ефект [21, 22, 24, 38, 58-62]. Для чіткого розділення ролей ізоформ необхідні такі інструменти: ізоформ-специфічні праймери (RT-qPCR), long-read RNA-seq і 5'RACE/CAGE для картографії промоторів; ізоформ-специфічні антитіла або N-термінальна мас-спектрометрія для верифікації білкового представлення; CRISPR-стратегії, націлені на унікальні екзони/промотори; ASO/siRNA, спрямовані на унікальні 5'-UTR або splice-junction. Відсутність таких підходів пояснює, чому короткі/PX-негативні ізоформи залишаються частково “прихованими” в інтерпретації функціональних даних [21, 22, 24, 38, 50, 58-62].

На підставі доменної архітектури та обмежених експериментальних даних можна висунути кілька обґрунтованих гіпотез: короткі / PX-негативні ізоформи можуть виконувати регуляторну роль, конкурентно зв'язуючись із SH3-залежними ефекторами і, таким чином, модулюючи доступ ефекторів до PX-позитивних форм; вони можуть локалізуватися в цитозолі або внутрішніх мембранних компартментах і забезпечувати альтернативні шляхи сигналіngu; співвідношення PX-позитивних/ PX-негативних ізоформ може контролювати “режим” інвадоподій, від ініціювання до зрілості, що має прямі наслідки для інвазивності. Водночас слід підкреслити: ці позиції потребують ціннісної експериментальної валідації [50].

Оскільки TKS-білки пов'язані з інвазією і метастазуванням, варіації в ізоформному складі пухлин можуть мати прогностичне або терапевтичне значення. Наприклад, пухлини з переважанням PX-позитивних ізоформ

можуть більш ефективно формувати функціональні інвадоподії і, отже, бути більш інвазивними; це потенційно впливає на вибір терапевтичних стратегій. Втім, великі публічні набори даних (TCGA, GENT2) зазвичай не розрізняють ізоформи, тому дослідження на рівні ізоформ (long-read транскриптоміка, мас-спектроміка на клінічних зразках) потрібні для встановлення клінічних кореляцій [21, 63, 64].

Ізоформна різноманітність у TKS-родині – фундаментальний біологічний фактор, який модулює локалізацію, взаємодії й функцію адапторних білків у інвадоподіях. Для TKS4 є анотовані альтернативні транскрипти (TKS4b, TKS4c тощо) і велика частина літератури досі орієнтувалася на TKS4L [21, 22, 24, 38, 58-62]. Для TKS5 існують чіткі експериментальні дані про альтернативні старт-сайти й нові ізоформи, а також фундаментальні механістичні дослідження, які показують роль TKS5 у ініціації інвадоподій та у доставці MMP-везикул.

Білки TKS4 і TKS5 (продукти генів *SH3PXD2B* та *SH3PXD2A*) є мультидоменними p47-подібними скафолд-протеїнами, які завдяки поєднанню PX-домену та численних SH3-доменів забезпечують інтеграцію сигнальних, цитоскелетних і протеолітичних процесів у клітині. Їх активація через Src/EGFR-залежне тирозинове фосфорилування зумовлює перехід від автоінгібованого цитозольного стану до мембранно-асоційованого активного комплексу, що ініціює формування подосом і інвадоподій – ключових структур, відповідальних за клітинну міграцію, адгезію та локальну деградацію позаклітинного матриксу. Через широкий інтерактом, який включає регулятори актинової полімеризації, адапторні білки та протеази, TKS4 і особливо TKS5 виступають центральними організаторами мультибілкових комплексів, що координують інвазивну поведінку клітин і процеси тканинного ремоделювання.

Порушення структури або функції цих білків має наслідки: мутації *SH3PXD2B* достовірно асоційовані з розвитком Frank-ter Naag синдрому, тоді як для *SH3PXD2A* показано важливу роль у ембріогенезі та можливі асоціації

з краніофасціальними аномаліями і запальними станами. Це підкреслює, що TKS-протеїни є не лише ефекторами інвазії, а й критичними регуляторами розвитку та гомеостазу тканин. Водночас обидва гени характеризуються вираженою ізоформною різноманітністю, зумовленою альтернативним сплайсингом і використанням альтернативних промоторів, що призводить до утворення білків із різною доменною організацією, зокрема щодо наявності або відсутності РХ-домену. Ця структурна варіабельність безпосередньо визначає субклітинну локалізацію, здатність до мембранного рекрутингу та склад інтерактому відповідних ізоформ.

Наявні експериментальні дані свідчать, що співвідношення між РХ-позитивними та РХ-негативними ізоформами є фактором, який визначає функціональний стан клітини: у нормальних клітинах переважають короткі ізоформи, тоді як у трансформованих і пухлинних клітинах підвищується експресія довгих, РХ-позитивних форм, асоційованих з ефективним формуванням інвадоподій і підвищеною інвазивністю. Проте більшість попередніх досліджень має локус-орієнтований характер і не дозволяє чітко розмежувати внесок окремих ізоформ, що створює суттєвий розрив у розумінні молекулярних механізмів дії TKS-білків. У зв'язку з цим, дослідження експресії ізоформ TKS4 і TKS5 у різних клітинних лініях є необхідним і методологічно обґрунтованим підходом, який дозволить уточнити їхні функціональні ролі, встановити зв'язок між ізоформним складом і клітинним фенотипом, а також поглибити розуміння механізмів клітинної інвазії, пухлинної прогресії та розвитку пов'язаних патологій.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та реактиви

В роботі використовували органічні та неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній Fluka (США), Merck (Німеччина), Serva (Німеччина), Difco (США), NEB (США), Sigma Aldrich (Німеччина), BioRad (США), Amersham Pharmacia Biotech (США), Thermo Fisher Scientific (США) або вітчизняні реактиви кваліфікації «хч» і «осч». Використовували ферменти компанії Thermo Fisher Scientific (США): ендонуклеази рестрикції; фрагмент Кленова; T4 ДНК-лігаза; інгібітор РНКаз RiboLock; ДНКаза I; зворотня транскриптаза RevertAid H Minus; зворотна транскриптаза M-MuLV. Суміш dNTP та праймери oligo-(dT)15 для проведення ПЛР також було придбано у компанії Thermo Fisher Scientific (США). Для кількісної ПЛР в реальному часі було використано DreamTaq полімерази виробництва Thermo Fisher Scientific (США). Для виділення тотальної РНК з клітинних ліній людини використовували реагент RNA Go компанії BioLabTech (Україна). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) було придбано в компанії Sigma-Aldrich (Німеччина).

#### 2.2. Культури клітин та біологічний матеріал

У роботі використовували лінії клітин людини embryonic kidney 293; cervical cancer HeLa; retinal ARPE-19; breast cancer T-47D, MCF-7 and MDA-MB-231; glioblastoma U-251 MG, U-87 MG та T98G; neuroblastoma SH-SY5Y; ovarian adenocarcinoma SKOV-3; fibrosarcoma HT1080; normal skin fibroblasts HaCat; skin epidermoid carcinoma A431; cutaneous melanoma

WM793; hepatocellular carcinoma Hep G2; colorectal adenocarcinoma HT-29; lung carcinoma A549; renal cell carcinoma KRC/Y; testicular seminoma JKT-1; normal prostate PNT2; prostate cancer DU145, LNCaP та PC-3; urinary bladder carcinoma 5637 та T24.

### **2.3. Культивування клітин ссавців**

Культури клітин людини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти FBS (Sigma-Aldrich), 50 од/мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину. Культивування відбувалося в інкубаторі при температурі 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> та 95 % вологості. При досягненні клітинами 70-90 % стану конфлюентності, проводили пасажування у потрібному для роботи розведенні кожні 3-5 днів. Для цього відбирали культуральне середовище, клітини промивали PBS та інкубували в розчині 0,05 % трипсину з 0,053 мМ ЕДТА при кімнатній температурі протягом 3-10 хв. Потім клітини ресуспендували в DMEM з додаванням усіх необхідних компонентів та переносили в нові культуральні чашки або планшети.

### **2.4. Виділення тотальної РНК з клітинних ліній**

Клітинні лінії людини після культивування двічі промивали буфером PBS після чого відразу проводили виділення тотальної РНК або зберігали до використання при -70°C. Виділення тотальної РНК з  $5 \times 10^6$  клітин проводили гуанідинізотіоціонатним методом із використанням реагенту RNA Go (BioLabTech) відповідно до рекомендацій фірми виробника.

## 2.5. Очистка препаратів тотальної РНК від геномної ДНК

Для видалення залишків геномної ДНК, яка могла виділитися разом з РНК та давати неспецифічний сигнал при ПЛР, препарати тотальної РНК оброблялися ДНКазою I. Для цього в реакційну суміш, загальним об'ємом 15 мкл, вносили 1-5 мкг тотальної РНК, 1,5 мкл 10x буфера, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл) та 3 мкл ДНКаз I (50 од./мкл, Thermo Fisher Scientific). Інкубацію проводили при +37°C протягом 30 хв. Після цього проводили інактивацію ДНКаз I шляхом додавання 3 мкл 25 мМ ЕДТА та інкубації при +65°C протягом 10 хв. Отриманий препарат РНК відразу використовували для синтезу кДНК.

## 2.6. Синтез кДНК на препараті тотальної РНК

Для зворотної транскрипції використовували тотальну РНК із клітинних ліній. В реакційну мікропробірку вносили необхідну кількість води вільної від РНКаз, яка потрібна щоб після додавання всіх інших компонентів загальний об'єм складав 20 мкл, 1-8 мкг тотальної РНК попередньо очищеною від домішок геномної ДНК та праймер (Oligo dT15) в кількості 100 мкМ. Проводили денатурацію РНК при +65°C протягом 10 хв. Після чого додавали 4 мкл 5x буфера, 2 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл) та 1 мкл RevertAid H Minus зворотної транскриптази (50 од./мкл, Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили при +42°C протягом однієї години. До подальшого використання кДНК зберігали при -20°C.

## 2.7. Кількісна ПЛР в реальному часі з використанням Taq-Man зондів

Кількісну ПЛР в реальному часі проводили в 25 мкл суміші, що містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера і 0,1 мкМ зонда Taq-Man, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTP, 2,5 одиниці ДНК-полімерази DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) і відповідний буфер. Ампліфікація проводилася за таких умов: денатурація – +95°C, 20 сек (2 хв для першого циклу); реасоціація праймерів і синтез поєднувалися при +60°C протягом 1 хв, протягом 50 циклів. Кожен зразок аналізувався у двох або трьох повторах. Кількісна ПЛР проводилася за допомогою ампліфікатора CFX96 (Bio-Rad). Ген TBP був обраний як референсний ген на основі аналізу літературних джерел, які продемонстрували його придатність як контролю для аналізу експресії генів у раку молочної залози людини [25-27]. Праймери та Taq-Man зонди, що використовувалися для кількісної ПЛР, наведені в таблиці 2.1.

**Таблиця 2.1**

### Праймери та Taq-Man зонди, що використовувалися для аналізу експресії кількісною ПЛР

Назва гену, організму та номер мРНК у GenBank	Послідовність праймерів та Taq-Man зондів з позиціями на мРНК *	Ефективність праймерів, % **
<i>TBP</i> людини NM_003194.5	For. 800-820 5'gtgcccgaaacgccgaatata3' Taq-Man зонд 821-842 5'(BHQ1)atcccaagcggtttgctgcggt(FAM)3' Rev. 874-854 5'ccgtggttcgtggctctctta3';	91,5

## Продовження таблиці 2.1

<i>TKS4</i> людини NM_001017995	For. 226-250 5'cgggtgccsaacaagcattatgtct3' Taq-Ман зонд 279-304 5'(ROX)ctccaccgaggccattaccggcgct(BHQ2)3' Rev. 352-374 5'gggtccttctgtcctccttccat3'	72,8
<i>TKS4L</i> людини NM_001017995	For. 1286-1305 5'agtattacaccatcgccgaa3' Taq-Ман зонд 1320-1339 5'(HEX)cccagacggcatcagcttcc(BHQ1)3' Rev. 1365-1386 5'ccagccactcaagttttctcg3'	104,2
<i>TKS4b</i> людини NM_001308175.1	For. 1286-1305 5'agtattacaccatcgccgaa3' Taq-Ман зонд 1320-1339 5'(HEX)cccagacggcatcagcttcc(BHQ1)3' Rev. 1369-1388 5'gggctctccaagtgaacatt3'	94,3
<i>TKS4c</i> людини	For. 5'agtattacaccatcgccgaa3' Taq-Ман зонд 5'(HEX)cccagacggcatcagcttcc(BHQ1)3' Rev. 5'atcaccagcgtcatcctat3'	91,7
<i>TKS5L</i> людини NM_014631	For. 239-262 5'tgactccacctccagactatcta3' Taq-Ман зонд 54-379 5'(FAM)atcccccttctcccaggaagatcct(BHQ1)3' Rev. 407-431 5'gatgggcttcagtctcttcacagct3'	93,7
<i>TKS5</i> людини NM_014631	For. 955-974 5'tggaaggctggtggtatct3' Taq-Ман зонд 982-1001 5'(FAM)cgcccagccctctttgccca(BHQ1)3' Rev. 1005-1023 5'ccttcttcaggtaggatgc3'	86,7

\* – праймери та Таq-Ман зонди (Metabion) були підібрані з використанням програми OLIGO Version 7.60

\*\* – ефективність сумішей праймерів вираховувалася з використанням програми LinRegPCR Version 2021.2

## 2.8. Обчислення результатів кількісної ПЛР в реальному часі

Для аналізу кількісної ПЛР в реальному часі використовувався ампліфікатор CFX96 (Bio-Rad) для кількісної ПЛР в реальному часі з програмним забезпеченням CFX Maestro 2.3 версії 5.3.022.1030 (Bio-Rad). Для розрахунку результатів кількісної ПЛР використовувалася формула:  $E_{\text{exp}} = 2^{-(E_{\text{ref}} - C_{\text{t}}(\text{ref}) - E_{\text{target}} + C_{\text{t}}(\text{target}))}$ , де  $E_{\text{target}}$  – ефективність ПЛР для цільового гена,  $E_{\text{ref}}$  – ефективність ПЛР для референсного гена,  $C_{\text{t}}(\text{target})$  – середнє значення циклів для цільового гена, а  $C_{\text{t}}(\text{ref})$  – середнє значення циклів для референсного гена. Ефективність ПЛР визначалася за допомогою програмного забезпечення LinRegPCR версії 2021.2. Значення циклів для цільового та референсного генів визначалися за допомогою вбудованого в програмне забезпечення методу регресії. Статистична обробка даних кількісної ПЛР проводилася за допомогою програмного забезпечення CFX Maestro 2.3 версії 5.3.022.1030 за допомогою методу ANOVA, критерію Фішера та тесту HSD Tukey's.

## 2.9. Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методикою Леммлі

Електрофоретичне розділення протеїнів за методом Леммлі у денатуруючих умовах проводили в поліакриламідному гелі (ПААГ) у камерах для вертикального електрофорезу виробництва (BioRad) за методикою фірми виробника. Для протеїнового електрофорезу використовували 4 % концентруючий та розділяючі гелі з концентрацією 7.5-15 %. Для приготування розділяючого гелю змішували 30 % розчин акриламідну (при співвідношенні акриламідну і біс-акриламідну – 29:1), dH<sub>2</sub>O 1,5 мМ Tris-HCl, рН 8.8, 10 % розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 мМ та 0,1 % персульфат амонію. Полімеризація акриламідну ініціювалася

додаванням 0,1 % TEMED. Проводили електрофорез в тріс-гліциновому буфері (195 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, рН 8.3, 0,1 % ДСН) при фіксованій силі струму 20-30 мА.

### **2.10. Вестерн-блот аналіз**

Після електрофоретичного розділення протеїнів в ПААГ за методом Леммлі, протеїни переносили на нітроцелюлозні мембрани в буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20 % етанол) при 250 мА протягом 1-2 год у апараті для електропереносу TE22 Mighty Small Transfer Tank (Hoefer). Після переносу мембрану блокували протягом 40-60 хв у розчині 5 % знежиреного молока в TBS-T (20 мМ трис-HCl, рН 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 буфером TBS-T. Після промивки мембрану інкубували протягом 40-60 хв в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою TBS-T так само як описано вище.

Для хемолюмінісцентної детекції готували розчин 100 мМ Tris-HCl, рН 8.5, 2,5 мМ люмінол, 0,4 мМ кумарова кислота та 0,023 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемілюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ фірми (BioRad).

## 2.11. Статистичні методи

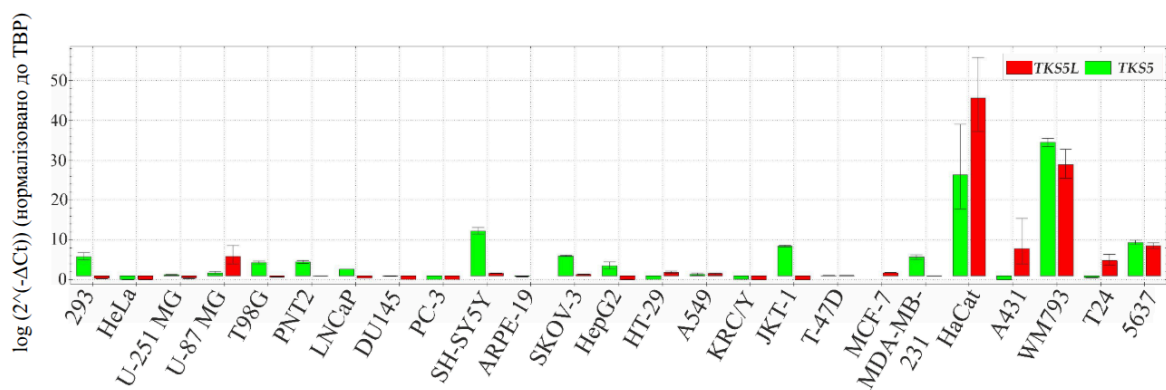
Контролем нормалізації служив транскрипт гена *TBP* як стійкого опорного гена. Результати були отримані як середні значення  $\pm$  стандартну помилку із трьох незалежних повторів, перетворені за методом  $2^{(-\Delta Ct)}$  і представлені у логарифмічному масштабі. Для порівняння між лініями застосовувався тест Тьюкі (Tukey's HSD) на логарифмічних даних.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Експресія загального пулу ізоформ *TKS5* та ізоформи *TKS5L* у панелі клітин людини за даними RT-qPCR

Для аналізу експресії загального пулу ізоформ *TKS5* та довгої ізоформи *TKS5L* було проведено RT-qPCR з специфічними праймерами на кДНК клітинних ліній людини різного походження з нормалізацією отриманих даних до референсного гена *TBP*. Результати аналізу представлені на рисунку 3.1.



**Рис. 3.1.** Стовпчаста діаграма експресії транскриптів загального пулу *TKS5* та ізоформи *TKS5L*

На рисунку зеленим кольором відмічені значення, що відповідають загальному пулу ізоформ *TKS5*, червоним – значення *TKS5L*; значення представлені як середні з показаними стандартними помилками. Рисунок показує виразну гетерогенність експресії: у більшості ліній домінує пул усіх ізоформ *TKS5*, де власне наявні й короткі ізоформи, цьому пулу присвоєно зелений колір. Проте в ряді клітинних ліній: U-87 MG, HaCat, A431, T24 – на рис. 3.1 червоні стовпці репрезентують високу кількість *TKS5L*, або ж можна сказати що наявність суто довгої ізоформи. У низці інших ліній: 293,

SH-SY5Y, WM793, JKT-1, MDA-MB-231 – де видно високі зелені стовпці, переважає експресія загального пулу *TKS5*. У декількох ліній (HeLa, U-251, PC3, DU145, ARPE-19, KRC/Y, A549) кількість транскриптів загального пулу *TKS5* дорівнює кількості транскрипту *TKS5L*.

Довга ізоформа *TKS5L* містить N-термінальний PX-домен, що визначає зв'язування з фосфоінозитолами мембран, тоді як коротші форми не мають PX-домену, що робить їхню мембранну локалізацію менш сприятливою або іншою за специфікою локалізації. Отже, підвищене відносне представлення *TKS5L* у деяких клітинних лініях може свідчити про більшу потребу цих клітин в адаптері з PX-доменом, тобто у білкові, що локалізується на мембранах, багатих на фосфоінозитиди. Така інтерпретація узгоджується з гіпотезою, що PX-домен сприяє прикріпленню початкових комплексів інвадоподій до плазматичної мембрани і, як наслідок, активніших мембранно-асоційованих процесів, пов'язаних із локальною деградацією позаклітинного матриксу [57, 65].

Якщо розглянути конкретні клітинні моделі, поведінка співвідношення *TKS5/TKS5L* може відображати біологічні відмінності, пов'язані з типом тканини або злоякісністю. Наприклад, у клітинних лініях епітеліального походження як: HaCaT, A431 на рис. 3.1 простежується високий та еквівалентний рівень *TKS5L* відносно *TKS5*, що звісно ж свідчить про представлення пулу *TKS5* суто *TKS5L* ізоформою. Хоча діаграма демонструє, що *TKS5L* представлений більшою кількістю транскрипту, проте слід зазначити: значною мірою зумовлено різною ефективністю роботи праймерів, їх ефективність наведено в підрозділі 2.7. Власне висока концентрація цієї ізоформи може вказувати на роль *TKS5L* у процесах, притаманних епітеліальній морфології або в сценаріях, пов'язаних з переходом до інвазивної поведінки. Аналогічно, в уретральній лінії: T24, де теж видно еквівалентність *TKS5L* до загального пулу, це може корелювати з відомими особливостями інвазивності уретеліальних карцином [1, 54]. Такий розподіл також свідчить про відсутність інших ізоформ, які властиві здоровим

клітинам.

Існує кілька пояснень клітинно-специфічної зміни співвідношення ізоформ. Ген *SH3PXD2A* має складну структуру транскрипційної ініціації: у мишачих і людських даних виявлено альтернативні транскрипційні старт-сайти та існування транскриптів, що починаються нижче від екзонів, що кодують PX-домен. Ці альтернативні старт-сайти призводять до утворення відносно коротших ізоформ, які не містять PX-домену. Відповідна робота з 5'RACE і аналізу EST прямо демонструє існування таких альтернативних транскриптів, що свідчить про наявність альтернативних промоторів у межах локусу *SH3PXD2A*. Це дає молекулярну основу для появи *TKS5*-профілю, та окремо – *TKS5L*, що залежать від активації того чи іншого промотора в конкретному клітинному середовищі [1, 50]. Альтернативний сплайсинг також може генерувати різні варіанти, і активність сплайсингових факторів, яка змінюється між тканинами або у відповідь на сигнали, може змінювати частоти формування конкретних ізоформ. Опубліковані дані вказують на те, що варіабельність екзонного включення/виключення у регіонах навколо PX-домену узгоджується з таким механізмом регуляції [50]. Транскрипційна та пост-транскрипційна регуляція, зокрема мікроРНК-опосередкований контроль, регулювання стабільності мРНК і темпи деградації, може змінювати відносно стабільні стани рівні ізоформ навіть при однакових швидкостях синтетичних процесів для кожного промотора. Крім того, посттрансляційні механізми, неспецифічна деградація, протеазна кліренсу, відмінності в трансляційній ефективності, можуть модифікувати співвідношення білкових ізоформ незалежно від рівнів мРНК. В інших системах було показано, що інтенсивність трансляції та стабільність білка можуть суттєво корелювати з вмістом PX-домену або з наявністю певних коротких лінійних мотивів, які впливають на розпізнавання протеазами або протеасомним шляхом [50].

Через вищеописані ролі досліджуваних протеїнів зміна концентрації *TKS5L* має потенціал суттєво впливати на ефективність формування

функціональних інвадоподій, і відповідно, на інвазивний потенціал клітин. Функціональні дослідження показали, що зниження експресії всього пулу *TKS5* призводить до втрати здатності до утворення інвадоподій і зниження інвазивності *in vitro* та *in vivo*, а надекспресія – *TKS5* підсилює інвадоподію-залежну деградацію матриксу. Ці спостереження сумісні з тим, що співвідношення ізоформ може бути визначальним для результату на рівні клітини [39, 56].

Клітинні лінії з відносно високим вмістом *TKS5L*, як-от HaCaT, A431, T24 є особливо цікавими для подальших досліджень. На цих моделях можна перевірити, чи підвищує наявність РХ-доменої ізоформи здатність до локалізованої деградації ЕСМ, формування зрілих інвадоподій і, відповідно посилення інвазивних властивостей. Клітинні лінії з домінуванням порівняно більшим вмістом *TKS5* (SH-SY5Y, WM793) слугують контрольними моделями для вивчення ролі РХ-незалежних варіантів. Порівняльний аналіз між такими групами може допомогти розділити ролі РХ-залежних і РХ-незалежних функцій *TKS5* у клітинних процесах. У клітинах, де *TKS5L* є домінуючим варіантом, варто дослідити, чи існує динамічна регуляція, яка зрушує баланс у бік однієї або іншої ізоформи [57, 58]. В іншому дослідженні було показано, що knock-out *TKS5* у WM793 *in vivo* в мишачій моделі призводить до зупинки проліферації, що власне, свідчить про захисну та метастатичну роль *TKS5* [22].

Фосфорилування *TKS5* в PC-3 в іншому дослідженні призвело до утворення інвадоподій та деградації позаклітинного матриксу [57], хоча згідно наших даних ця культура містить низький рівень транскриптів ізоформ *TKS5*. В тому ж дослідження показано, що сайленсинг *Fgd1* призвів до інгібування процесу утворення інвадоподій, що нашо вхує на думку про різницю механізму, утворення інвадоподій, і важливість інших білків в утворенні інвадоподій [57]. В цьому ж дослідженні було також була здійснена надекспресія *TKS5* для LNCaP, що для даної клітинної лінії призвело до утворення інвадоподій та деградації позаклітинного матриксу [57], і це

цікаво, оскільки ця клітинна лінія згідно наших даних містить тільки короткі ізоформи *TKS5*. Згідно з іншими дослідженнями ця клітинна лінія не формує, як правило, інвадоподій [20].

З огляду на наявні експериментальні та клінічні дані, підвищена експресія *TKS5* тісно пов'язана з інвазивним фенотипом пухлин і це положення можна розгорнути кількома взаємопов'язаними твердженнями. Функціональні дослідження на клітинних моделях продемонстрували причинно-наслідковий зв'язок між рівнем *TKS5* та інвазивною активністю: зниження експресії *TKS5* призводить до втрати здатності формувати інвадоподії та до суттєвого зниження деградації матриксу й інвазії *in vitro* [22, 66]. Тоді як надекспресія або відновлення *TKS5* підсилює інвадоподію-залежну деградацію ЕСМ і інвазивну поведінку клітин [67]. На рівні пухлинних зразків і великих когортних аналізів, оглядові й первинні дані вказують на тенденцію підвищеної експресії *TKS5* у більш агресивних пухлинах. Найбільш цікавим є те, що відношення довгої форми до короткої, зміщене в сторону довгої, корелювало з меншою виживаністю [54] і на кореляцію експресії *TKS*-основних компонентів інвадоподій з маркерами інвазивності, що узгоджується з експериментальними моделями та даними про підвищену локалізацію *MT1-MMP* у інвадоподіях. Молекулярні механізми, що лежать в основі онкогенної індукції *TKS5*, включають активацію сигнальних каскадів рецепторних тирозинкіназ *Src*-опосередковане фосфорилування, а також транскрипційну і посттранскрипційну регуляцію, що дає підґрунтя для клітинно-специфічного збільшення *TKS5L*.

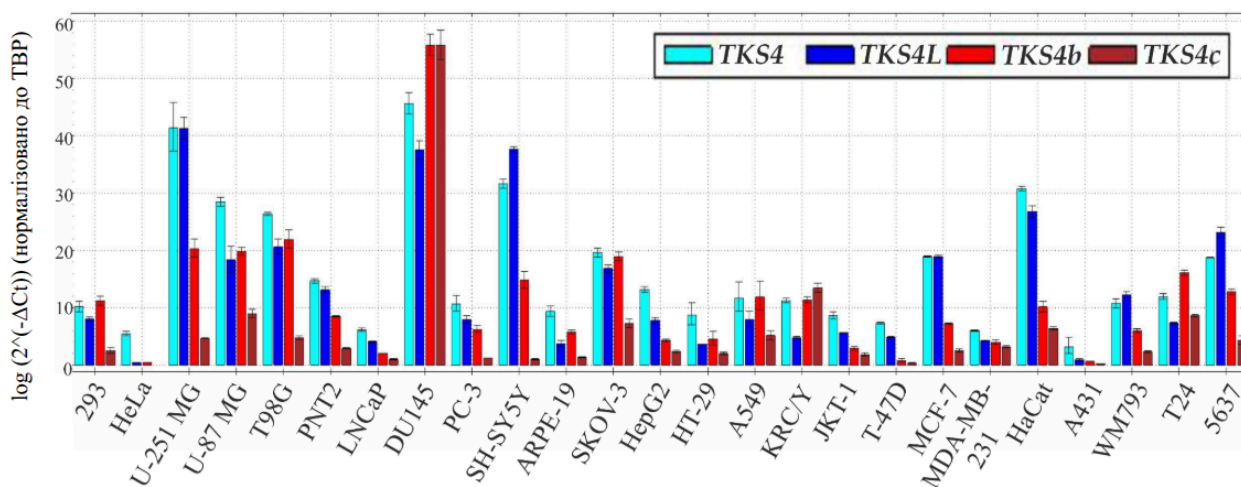
Підсумовуючи, співвідношення кількості *TKS5L* варіює між клітинними лініями людини в клітинно-типовий спосіб; у ряді клітин пул *TKS5* включає й короткі ізоформи, натомість у деяких загальний пул репрезентований суто довгою ізоформою. Це свідчить про складну регуляцію локусу *SH3PXD2A*, яка, згідно з літературними даними, включає альтернативні промотори і варіанти сплайсингу, і має функціональне значення для здатності клітин

формувати інвадоподії та здійснювати інвазію.

### **3.2. Експресія загального пулу ізоформ TKS4 та ізоформ TKS4L, TKS4b та TKS4c у панелі клітин за даними RT-qPCR**

Для вивчення експресії окремих ізоформ TKS4 ми провели RT-qPCR з використанням набору специфічних праймерів: одні – для довгої TKS4L ізоформи – референсний транскрипт NM\_001017995.3, інші – для коротшої TKS4b; NM\_001308175.2, третіх – для варіанту TKS4c та четвертих для загального пулу ізоформ TKS4. Праймери націлені на унікальні екзони, наприклад TKS4b утворений виключенням 13-го екзону та включенням 14-го, або TKS4c – використанням внутрішнього докінг сайту в межах екзону 13 [6], або на екзони присутні у всіх ізоформах. Результати показали виразну ізоформно-специфічну гетерогенність між різними лініями клітин людини. *TKS4L* мРНК виявлялась у всіх проаналізованих клітинах, але на різних рівнях: найвищий рівень фіксувався в клітинах U-251 MG, DU145 та SH-SY5Y, натомість найнижчий – в HeLa і A431. TKS4b-транскрипт був відсутнім у HeLa і A431 і проявлявся, разом з іншими транскриптами, найбільше у клітинній лінії DU145, загалом велика кількість транскриптів *TKS4* узгоджується з даними одного дослідження [68]. В іншому дослідженні було показано, що пептид ламінного походження С16 в DU145 підвищував експресію *TKS4*, *TKS5*, *CTTN* та утворення АФК, що впливало на утворення інвадоподій, що врешті призводить до більшої інвазивності [69]. Хоча наші дані можуть це лиш частково узгодити, адже звертаючись до рисунку 3.1. ми спостерігаємо низьку кількість транскриптів *TKS5*. Низький *TKS4L* у карциномах HeLa/A431 пов'язаний з їхньою адгезивною природою та меншою залежністю від інвадоподій, де можливо короткі форми домінують для базальної міграції. Це може бути подібно до гепатоцелюлярній карциноми, де *SH3PXD2B* арегулюється в інвазивних лініях з високим Ki-67

[24, 70-72]. Варіант *TKS4c* було виявлено в усіх лініях, окрім HeLa, але загалом його рівень був значно нижчим, ніж *TKS4L* чи *TKS4b*, виняток – відносно висока експресія *TKS4c* у DU145 і KRC/Y. Загальний пул *TKS4*-транскриптів за праймерами до екзонів 1–3, віддзеркалював сумарну картину: він був присутній у всіх клітинних лініях, що показано на рисунку 3.2. Співвідношення між *TKS4L*, *TKS4b* і *TKS4c* змінювалося залежно від типу клітин.



**Рис. 3.2.** Стовпчаста діаграма експресії транскриптів *TKS4*, *TKS4L*, *TKS4b* та *TKS4c*; лінійне представлення даних. Нормалізація експресії до гена *TBP* із стандартною похибкою середнього значення (lg)

Загальний рівень транскрипції *TKS4* істотно варіює між різними клітинними лініями. Найвищий сумарний пул *TKS4* спостерігався у DU145, U-251 MG та SH-SY5Y, де представлено всі основні ізоформи у відносно високій кількості, що добре узгоджується з їхнім інвазивним потенціалом. Лінії HT-29 та 293 демонстрували проміжні рівні експресії *TKS4*. Для HT-29 це особливо важливо, оскільки *TKS4* загалом необхідний для формування інвадоподій, а низький його рівень корелює з меншою інвазивністю. Водночас у частині колоректальних моделей втрата *TKS4* може парадоксально посилювати інвазію та EMT-подібні зміни, що підкреслює контекстну залежність функції цього білка.

Лінії з високим рівнем *TKS4* – DU145, U-251 MG, SH-SY5Y, MDA-MB-231 – загалом характеризуються підвищеною агресивністю та здатністю до активного формування інвадоподій. Для U-251 MG також відомо, що ці клітини демонструють агресивний ріст *in vitro* та *in vivo*, що добре узгоджується з їхнім високим пулом *TKS4*. Навпаки, HeLa, A431 та HT-29 мають нижчий загальний рівень *TKS4* і, як правило, виявляють слабшу інвазивну активність або використовують інші, менш залежні від інвадоподій механізми міграції. Отже, відмінності у загальному пулі *TKS4* відображають не лише рівень експресії, а й функціональну спеціалізацію клітин: інвазивні моделі підтримують високий *TKS4* для забезпечення актинового ремоделювання та локальної деградації матриксу, тоді як менш інвазивні – експресують його в обмеженому обсязі.

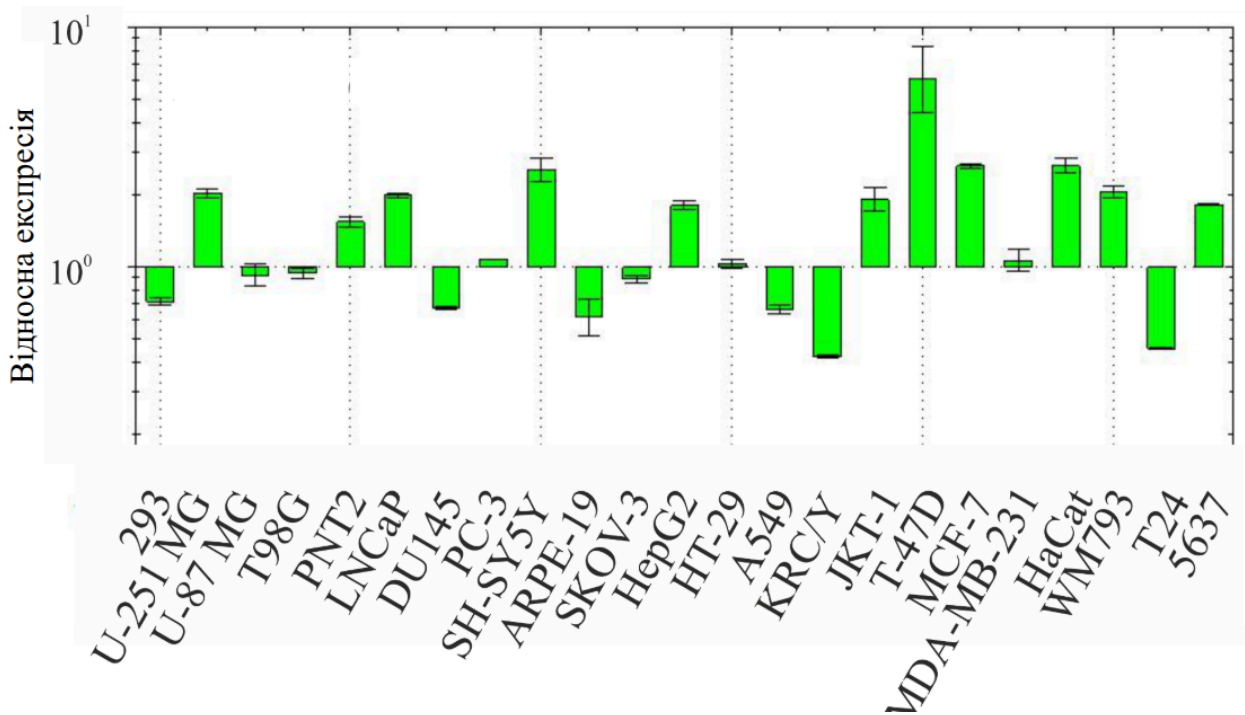
Для розуміння загального впливу ізоформ на інвазивність, було складено приблизний перелік, принаймні по інвазивності за літературними джерелами, хоча перелік є радше гіпотетичним, оскільки для точності необхідне масштабне дослідження, яке уніфікувало би дані за одним типом теста. Згідно літературних джерел перелік складений від найбільш інвазивних до найменш інвазивних клітинних ліній: MDA-MB-231, WM793, U-251 MG, KRC/Y, A549, A431, JKT-1, HepG2, SKOV-3, SH-SY5Y, U-87 MG, LNCaP, PC-3, DU145, HT1080, 5637, T24, HeLa, HT-29, MCF7, T-47D, T98G, [73-84].

Для *TKS5* також спостерігається клітинно-типова варіабельність: у частини ліній переважає довга ізоформа *TKS5L*, тоді як в інших домінує загальний пул *TKS5*. Загалом ми можемо сказати, що в клітинних лініях, які були лідерами по кількості транскриптів *TKS5* на рисунку 3.1. не мають якоїсь певної закономірності, оскільки лідерами були: HaCat, WM793, 5637 – то на рисунку 3.2. вони займають посередні місця за кількістю *TKS4*. Проте лінія HaCat містить приблизно однакову кількість, як *TKS5* так і *TKS4* (транскриптів *TKS4* трохи менше). Натомість, слід виокремити ще те, що більшість ліній на рисунку 3.1., які мали низький профіль *TKS5* мають загалом приблизно в 10 разів більше *TKS4* транскрипту, якщо говорити про

клітинні лінії з найбільшим пулом *TKS5* без (або низьким) *TKS5L*, то до таких ми визначили наступні клітинні лінії: 293, T98G, PNT2, SH-SY5Y (лідер), SKOV-3, JKT-1, MDA-MB-231 – то ці клітинні лінії варіюють в своїх значеннях, хоча більшість має відносно низький рівень транскриптів пулу *TKS4*, хіба T98G та SH-SY5Y виокремлюються серед інших клітинних ліній більшою кількістю *TKS4*. Таким чином, лінія MDA-MB-231 не потребує великої кількості протеїнів *TKS4*, *TKS5* для інвазії, і її агресивність пояснюється іншими механізмами. Методологічно варто зазначити, що дані RT-qPCR були нормалізовані за відносною кількістю копій *TBP* і відображені з логарифмічною шкалою, що забезпечує стабільну варіативність при порівнянні різних ліній.

Якщо присутність *TKS4L* mRNA універсальна, то її рівень і співвідношення з короткими *TKS4b/c* значно варіюють. Така неоднорідність може відображати функціональні відмінності: можливо, *TKS4L* відповідає за одні процеси, тоді як *TKS4b* чи *TKS4c* – за інші з урахуванням втрати або зміни однієї з SH3-доменних структур це передбачувано.

Те, що співвідношення транскриптів ізоформ подібне в настільки різних лініях U-87 MG, T98G, PC-3, MDA-MB-231, HT-29,  $TKS4b \approx TKS4L$  можна бачити на рисунку 3.3, що найчастіше вказує на регуляцію альтернативного сплайсингу гена *SH3PXD2B*.



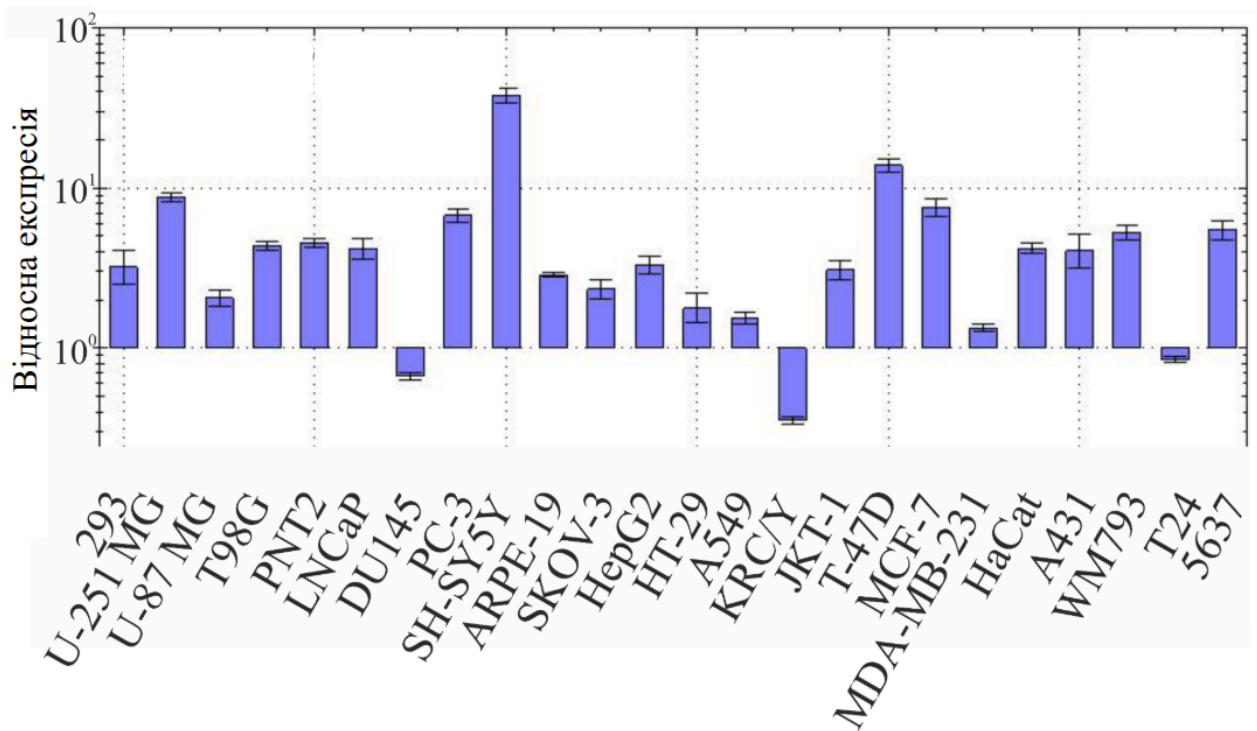
**Рис. 3.3.** Стовпчаста діаграма співвідношення транскриптів *TKS4L/TKS4b*

Умовно, один і той самий набір сплайсинг факторів підтримує стабільне співвідношення повнорозмірної та вкороченої ізоформи. Одночасна експресія короткої форми *TKS4b* може давати клітині можливість зберегти або переналаштувати білок-білкові взаємодії з CTTN і N-WASP, що може підтримувати альтернативні актинові режими руху і створює молекулярну пластичність для переключення між протеолітичним та немембранним способами міграції. У клітинах U-87 MG середній рівень транскриптів *TKS4* за збереженого співвідношення ізоформ створює достатню кількість білка для формування інвадоподій і рекрутування протеаз деградації матриксу, що узгоджується з відомою високою інвазивністю гліобластомних клітин і їх здатністю активно ремоделювати позаклітинний матрикс. Натомість у HT-29 подібне співвідношення ізоформ супроводжується дуже низькою загальною кількістю транскриптів, що обмежує сумарний рівень білка TKS4 і відповідно потенціал формування інвадоподій, тому ці клітини демонструють значно слабшу інвазивну активність і більш епітеліально-адгезивний фенотип. Таким чином, співвідношення *TKS4b* до *TKS4L* відображає частину архітектури

регуляції ізоформ, тоді як агресивність клітин значною мірою визначається купою факторів, частиною яких є рівень експресії *TKS4*, який у U-87 MG достатній для підтримки інвазивних структур, а у HT-29 залишається обмежувальним фактором [85, 86].

На цій діаграмі показано відношення експресії довгої ізоформи *TKS4L* до короткої *TKS4b* в різних клітинних лініях. Спостерігається велика варіативність: у деяких ліній як T-47D, HaCaT, *TKS4L* значно переважає над *TKS4b*, а в інших, HT-29, MDA-MB-231, обидві форми представлені майже еквівалентними або *TKS4b* навіть трохи вищий, проте це не відкриває повної ролі *TKS4c* адже, на нашій шкалі інвазивності HT-29, MDA-MB-231 знаходяться відносно далеко одне від одного, й радше за все *TKS4b* несе за собою іншу важливу роль. Це свідчить про те, що різні клітинні лінії по-різному “збалансовані” за ізоформами *TKS4*. Специфічна роль ізоформ у формуванні інвадаподій наразі невідома. Аналогічно до випадку з *TKS5*, де висока довга ізоформа корелює з інвазивністю, можна припустити, що клітини зі збалансованим рівнем ізоформ *TKS4* мають більш агресивний фенотип. Проте для *TKS4* потрібно більше досліджень, тому наведені співвідношення демонструють лише різні регуляторні стани ліній без безпосереднього підтвердження функціонального ефекту.

Відношення *TKS4L/TKS4c* для тих же клітинних ліній наведено на рисунку 3.4. Знову бачимо, що в більшості з репрезентованих ліній довга форма *TKS4L* значно домінує, тоді як в інших: DU145, KRC/Y, T24 – *TKS4L* і *TKS4c* експресуються на порівнянному рівні або ж *TKS4c* переважає. Переважаючі ізоформи різні навіть у сусідніх лініях, що підкреслює клітинну специфічність регуляції.



**Рис. 3.4.** Столпчаста діаграма співвідношення транскриптів *TKS4L/TKS4c*

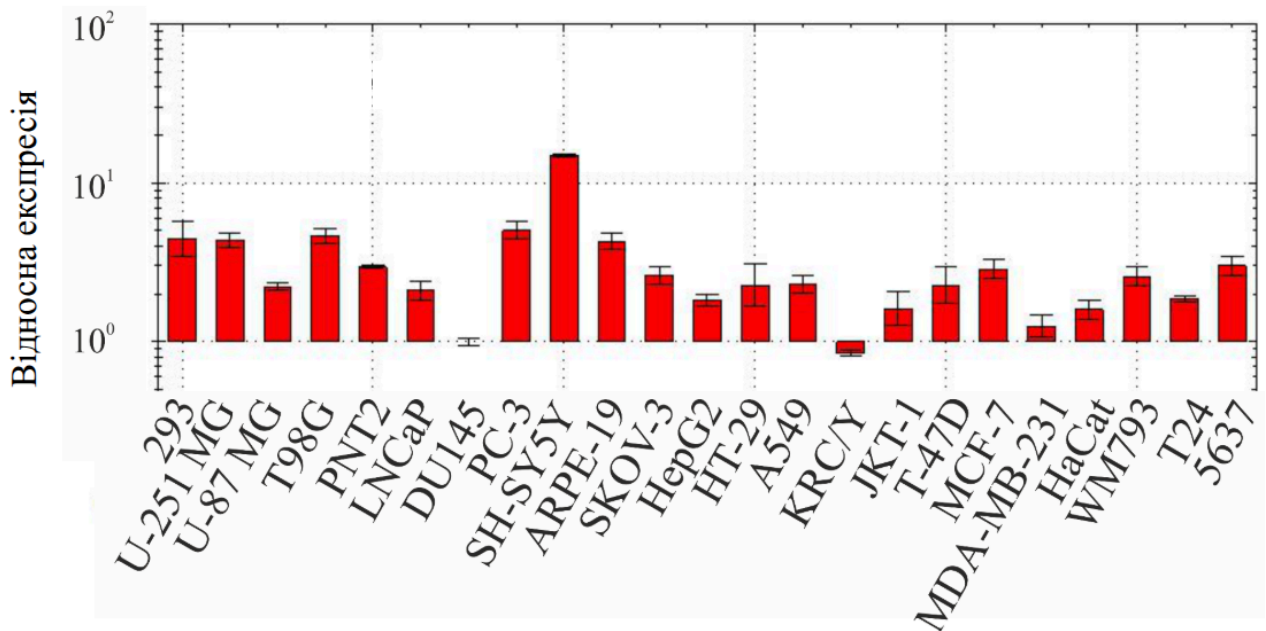
У представлених клітинних лініях інвазивність і життєздатність різняться суттєво і це пояснює, чому однакове ізоформне співвідношення *TKS4* не дає однакового фенотипу. Клітинна лінія DU145 демонструє здатність до інвазії та підвищену матрикс-деградацію за стимуляції факторами росту й в метастатичних похідних показує значно вищу міграційну й інвазивну активність, що корелює з підвищеною пухлинною ініціюючою здатністю інвазивних субпопуляцій [87]. Лінія T24 є класично інвазивною в моделі Matrigel і в 3D органоїдних/он-чип тестах демонструє, не найбільший інвазивний потенціал, проте, при цьому її виживаність і здатність до колонієутворення підтримуються шляхами, що регулюють апоптоз і проліферацію [88]. Лінія KRC/Y як модель нирково-клітинного раку показує здатність до утворення пухлин *in vivo* і реагує на маніпуляції супресорними генами, що свідчить про значну життєздатність *in vivo* хоча дані по класичній Matrigel-інвазії у цій лінії менш відомі [89]. Модель SH-SY5Y в 3D матриксах демонструє виражену колективну

мезенхімоподібну інвазію і при високому рівні транскрипту *TKS4L* має потенціал для формування інвазуючих структур. Водночас її виживаність суттєво залежить від антиапоптотичних факторів і модулюється через білки як сурвівін, що робить SH-SY5Y здатною одночасно до інвазії і високої резистентності за певних умов [90].

Отже, попри подібне співвідношення транскриптів ізоформ *TKS4* у різних клітинних лініях, їхній фенотипічний результат може суттєво відрізнятись, що свідчить про визначальну роль додаткових факторів клітинного контексту. Клітинні лінії WM793, MDA-MB-231 демонструють високий інвазивний потенціал, що узгоджується з їх здатністю активно формувати інвадоподії та деградувати позаклітинний матрикс, тоді як модель KRC/Y характеризується вираженою пухлиногенністю *in vivo*, що підтверджує її здатність підтримувати агресивний пухлинний фенотип у складнішому тканинному середовищі. Натомість клітинна лінія SH-SY5Y, незважаючи на відносно високу експресію транскрипту *TKS4L*, демонструє поєднання інвазивних властивостей із залежністю від механізмів клітинного виживання, що свідчить про значний внесок сигнальних шляхів, які регулюють баланс між проліферацією, апоптозом та клітинною пластичністю. Такі відмінності підкреслюють, що функціональна роль ізоформ *TKS4* не визначається виключно їхнім відносним співвідношенням на рівні транскриптів, а значною мірою залежить від загального рівня експресії білка, та інших факторів, ефективності трансляції, посттрансляційних модифікацій та наявності партнерів взаємодії, які залучені до організації актинового цитоскелету та формування інвадоподій. Додатковим фактором є активність сигнальних каскадів, зокрема Src-залежних тирозинкіназних шляхів, що регулюють рекрутування TKS-білків до мембранних доменів і забезпечують збірку мультибілкових комплексів, відповідальних за локальну деградацію позаклітинного матриксу та клітинну інвазію. Таким чином, навіть за подібного ізоформного профілю різні клітинні лінії можуть демонструвати суттєво відмінні біологічні

властивості, що відображає складну багаторівневу регуляцію функції *TKS4*, де поєднання експресійного рівня, сигнального середовища та доступності ефекторних білків визначає кінцевий фенотип клітини.

Більшість клітинних ліній мають тенденцію до переважання транскриптів *TKS4b* на противагу *TKS4c*, що можна спотерігати на рисунку 3.5. Наприклад, у DU145, MDA-MB-231, та у деяких інших відношення  $\approx 1$ , що означає майже рівну експресію обох ізоформ. Лише в KRC/Y, *TKS4c* дещо переважає над *TKS4b*. *TKS4b* в найбільшій кількості репрезентований у лінії SH-SY5Y, та на треть менше по кількості в: 293, U-251 MG, T98G, PC-3, ARPE-19.



**Рис. 3.5.** Столпчаста діаграма співвідношення транскриптів *TKS4b/TKS4c*

У представлених лініях співвідношення коротких ізоформ *TKS4b/TKS4c* вказує на наявність резерва коротких транскриптів для актинового ремоделювання, однак їхній внесок у агресивність залежить від життєздатності та інвазивності конкретної моделі: DU145 демонструє стимульовану інвазію й підвищену матрикс-деградацію [91, 92], тому рівні

*TKS4b* і *TKS4c* тут можуть ефективно брати участь в утворенні інвадоподій та підтримки виживаності. MDA-MB-231 як агресивна модель молочної залози має потенціал для протеолітичної інвазії за активного сигналінгу [93]. У KRC/Y помітне переважання *TKS4c* може відображати зсув у пулі SH3-інтеракторів і сприяти зміні маршруту рекрутування протеаз за умови достатньої життєздатності [94]. Високий абсолютний вміст *TKS4b* у лінії SH-SY5Y у поєднанні з механізмами виживання може одночасну забезпечувати здатність до інвазії й резистентність клітин [95]. Епітеліальні чи непухлинні моделі, такі як 293 і ARPE-19, зазвичай показують меншу інвазивність незалежно від співвідношення ізоформ [96, 97]. Гліобластомні лінії U-251 MG і T98G мають високий інвазивний потенціал [98, 99], тож навіть помірні зміни коротких ізоформ можуть підсилювати агресивну поведінку. PC-3 відома як метастатична і життєздатна модель, тому в ній короткі ізоформи можуть активно конвертуватися в інвазійний ефект [100]. T24 показує виражену інвазивність у Matrigel тестах і здатність до колонієутворення, що робить співвідношення *TKS4b/TKS4c* значущим для її фенотипу [101].

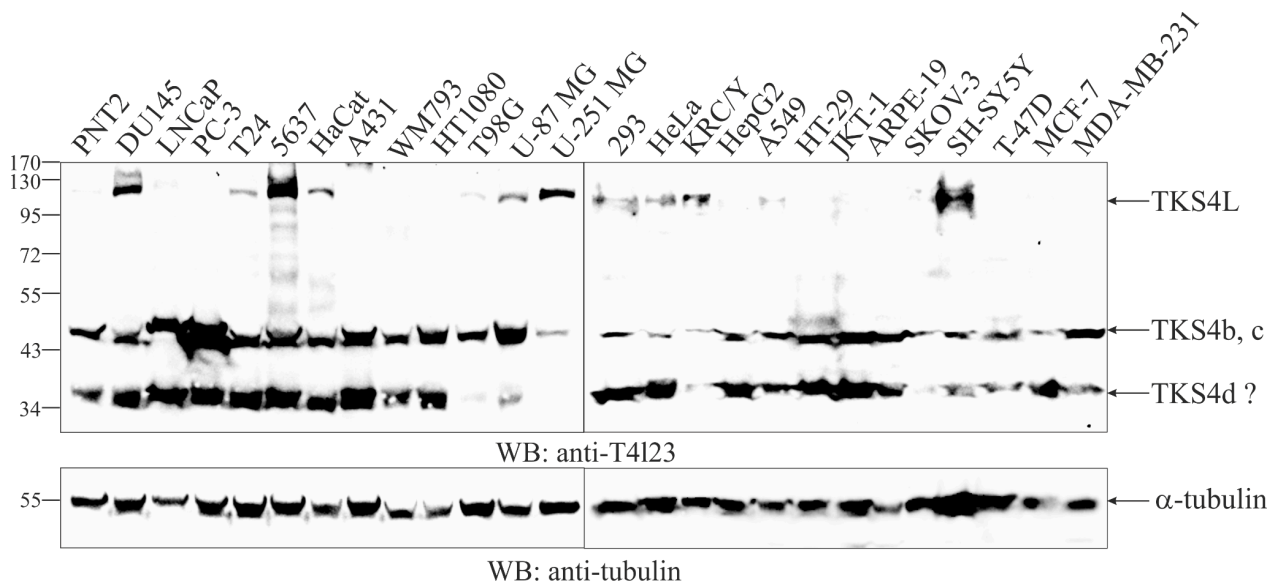
Спостережуване домінування короткої ізоформи *TKS4b* у більшості аналізованих ліній, її особливо висока представленість у SH-SY5Y та приблизно рівні співвідношення *TKS4b* і *TKS4c* у DU145 і MDA-MB-231 свідчать про наявність резерву коротких транскриптів, здатних підтримувати актинове ремоделювання в різних клітинних контекстах. Водночас випадок KRC/Y, де *TKS4c* дещо переважає, вказує на можливу клітинно-специфічну переналаштування пулу SH3-інтеракторів і маршруту рекрутування протеаз. Однак внесок цих коротких ізоформ у агресивність клітин не є автоматичним і залежить від життєздатності моделі, рівня сумарного *TKS4*, наявності і локалізації MT1-MMP та ADAM ферментів, активності сигнальних шляхів і партнерів типу CTTN та N-WASP; тому співвідношення *TKS4b/TKS4c* само по собі не прогнозує інвазивний фенотип, але задає молекулярну й функціональну потенцію, яка за сприятливого сигналінгу може бути

реалізована.

### **3.3. Вестерн-блот аналіз ізоформ TKS4L, TKS4b, TKS4c в клітинах людини різного походження**

Для співставлення рівнів мРНК і білка ми провели Вестерн-блотинг тих самих клітинних ліній, що використовувались у підрозділі 3.2. В аналізі застосовували поліклональне антитіло anti-T4123, спрямоване на консервативний регіон TKS4. На відміну від комерційних антитіл, здатних розпізнати лише TKS4L, anti-T4123 виявляє також коротші ізоформи та будь-які інші, що містять цільовий епітоп. Для контролю кількості протеїнів використовували  $\beta$ -тубулін.

На мембрані спостерігали три характерні імуноактивні смуги: близько 120 кДа, 49 кДа та 35 кДа. Відповідну блотограму наведено на рисунку 3.6. Зіставлення з розміром очікуваних ізоформ дозволило ідентифікувати 120 кДа як TKS4L, 49 кДа – як об'єднану смугу TKS4b/c і 35 кДа – як невідомий новий білок, що отримав назву TKS4d. Смуга 120 кДа яка відповідає TKS4L, зафіксована лише у клітинних лініях DU145, T24, 5637, HaCaT, T98G, U-87 MG, U-251 MG, 293, HeLa, KRC/Y, A549 та SH-SY5Y. Ці лінії демонстрували її присутність попри те, що загальний транскрипт TKS4L мРНК був виявлений у всіх лініях.



**Рис. 3.6.** Блотограма лізатів досліджуваних клітинних ліній з ізоформами TKS4

Смуга 49 кДа, яка відповідає TKS4b/c, присутня в усіх проаналізованих клітинах, включно з HeLa, де не виявлено відповідної мРНК. Оскільки TKS4b і TKS4c мають однаковий приблизний розмір в ~49 кДа, вони не розрізняються у Вестерн-блоті, тому смуга може представляти сумарну присутність обох.

Смуга 35 кДа, що репрезентує TKS4d, виявлена в усіх клітинних лініях, окрім U-251 MG. Оскільки жоден з відомих транскриптів не передбачає білок такої молекулярної маси, цю смугу позначено як новий TKS4d.

В результаті наявність білкових ізоформ TKS4 суттєво розходиться з профілем мРНК. Так, TKS4L-протеїн присутній далеко не у всіх клітинах, де виявлено mRNA, а короткі TKS4b/c – буквально скрізь. TKS4d присутній майже скрізь, хоча транскрипту для нього немає.

Набір спостережень вказує на суттєву невідповідність між профілями експресії *TKS4L/b/c* на рівні мРНК і білка. Зокрема, довгий варіант TKS4L виявляється лише в частині клітин, незважаючи на повсюдну наявність mRNA, тоді як короткі TKS4b/c ізоформи – практично скрізь. Додатковий ізоформний продукт TKS4d зовсім не відповідає жодному відомому транскрипту, що свідчить про альтернативні шляхи утворення.

Збіг чи невідповідність між рівнями мРНК і білка часто залежить від пост-транскрипційної чи пост-трансляційної регуляції. Наші дані підтверджують, що транскриптні профілі *TKS4* не завжди передбачають відповідну наявність білкових ізоформ. Це узгоджується з відомими спостереженнями, у системних аналізах для певної частини генів спостерігається слабка кореляція мРНК–білок [102]. Також існує багато прикладів, коли протеїн регулюється окремо через деградацію або взаємодію з партнерами [103, 104]. У нашому випадку, присутність *TKS4L/b/c* у відсутності мРНК може означати або високу стабільність білка чи навіть відсутність коливань регуляції зворотного зв'язку. мРНК *TKS4* може бути стабільною, але білок швидко розпадається. Наприклад, короткі транскрипти або довго діючі білки можуть мати різне напівжиття [105, 106].

Можна зробити висновок, що експресія як *TKS5*, так і *TKS4* у панелі клітинних ліній людини має виразно клітинно-типову та ізоформно-специфічну варіабельність, яка відображає не лише тканинне походження, а й функціональний стан клітини, її інвазивність та здатність до формування інвадоподій. Для *TKS5* показано, що в одних клітинних лініях переважає довга РХ-доменна ізоформа *TKS5L*, тоді як в інших домінує загальний пул *TKS5*, що включає також короткі транскрипти. Така картина особливо характерна для ліній із підвищеним інвазивним потенціалом, де РХ-домен може забезпечувати ефективну мембранну локалізацію адаптера, рекрутування ефекторних білків і локальну організацію протеолітично активних інвадоподіальних структур. Для *TKS4* виявлено ще складніший профіль регуляції: загальний пул транскриптів і окремі ізоформи *TKS4L*, *TKS4b* та *TKS4c* істотно різняться між лініями, причому найвищі рівні *TKS4* характерні для DU145, U-251 MG та SH-SY5Y, тоді як найнижчі – для HeLa та A431. Це узгоджується з тим, що високий сумарний рівень *TKS4* загалом асоціюється з інвазивними або агресивними фенотипами, а низький – з меншою залежністю від інвадоподієзалежних механізмів міграції або з використанням альтернативних міграційних програм. Водночас отримані дані

переконливо свідчать, що для *TKS4*, як і для *TKS5*, вирішальним є не лише абсолютний рівень експресії, а й баланс між ізоформами, оскільки саме співвідношення довгих і коротких варіантів відображає багаторівневу регуляцію локусу *SH3PXD2B* на транскрипційному, посттранскрипційному та, ймовірно, посттрансляційному рівнях. Особливо показовим є те, що клітинні лінії з високим *TKS4* і/або *TKS5*, зокрема DU145, U-251 MG, SH-SY5Y, WM793, загалом відповідають моделям із підвищеною здатністю до інвазії, активного ремоделювання актинового цитоскелету та формування інвадоподій, тоді як HeLa, A431, HT-29 демонструють слабшу інвазивність або ж переорієнтацію на інші способи клітинної міграції. Хоча як нами було показано, MDA-MB-231 не має великої кількості транскриптів жодного з досліджуваних протеїнів, проте попри низьку кількість культура найбільш інвазивна, і певно найбільш цікава з переліку, оскільки має високу кількість транскриптів ізоформ *TKS5* за майже повної відсутності, і майже рівномірний пул транскриптів *TKS4*. Особливої уваги заслуговує те, що експериментальні профілі *TKS4/TKS5* не завжди повністю збігаються з білковою картиною, а отже, транскрипційний рівень сам по собі не є достатнім для повної функціональної інтерпретації. Це вказує на важливість додаткових механізмів регуляції, включно зі стабільністю мРНК, ефективністю трансляції, посттрансляційними модифікаціями, деградацією білка та наявністю взаємодіючих партнерів, таких як CTTN, N-WASP і Src-залежні сигнальні компоненти. Найважливішим підсумком є те, що *TKS4* і *TKS5* слід розглядати як взаємопов'язані елементи однієї функціональної осі, які в багатьох клітинних моделях працюють у тандемі й спільно забезпечують збірку інвадоподіальних комплексів, мембранну рекрутацію ефекторів та деградацію позаклітинного матриксу. Тому високі сумарні рівні обох адаптерів, як правило, відповідають більш агресивному фенотипу, тоді як низькі рівні одного або обох білків асоціюються зі зниженим інвазивним потенціалом або переключенням на альтернативні міграційні стратегії.

## ВИСНОВКИ

Встановлено значну варіабельність експресії ізоформ TKS у 22 клітинних лініях людини різного тканинного походження та виявлено невідповідність транскрипційних профілів рівням відповідних білків. Це підтверджує складний характер регуляції експресії даних генів і зумовлює необхідність застосування ізоформно-специфічних підходів для подальшого дослідження їхньої ролі у процесах інвазії.

1. Експресія *TKS5L* є клітинно-типово варіабельною з підвищенням у U-87 MG, WM793, HaCaT, A431 і 5637, тоді як високий рівень загального пулу *TKS5* спостерігається в 293, SH-SY5Y, WM793, JKT-1 і MDA-MB-231 за мінімальної експресії *TKS5L*.

2. *TKS4L* експресується у всіх лініях з максимумом у U-251 MG, DU145 і SH-SY5Y, тоді як *TKS4b* варіює фрагментарно, *TKS4c* представлена нижчою експресією, а загальний пул *TKS4* корелює з *TKS4L*.

3. Вестерн-блот виявив смуги ~120 кДа (*TKS4L*), ~49 кДа (сукупно *TKS4b/c*) і ~35 кДа (ймовірна ізоформа *TKS4d*).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kudlik, G., Takács, T., Radnai, L., Kurilla, A., Szeder, B., Koprivanacz, K., Merő, B., Buday, L. and Vas, V. (2020). 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*, [online] Volume 21(21), p. 8117. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21218117> [Accessed 30 Oct. 2020].
2. Iqbal, Z., Cejudo-Martin, P., de Brouwer, A., van der Zwaag, B., Ruiz-Lozano, P., Scimia, M., Lindsey, J., Weinreb, R., Albrecht, B., Megarbane, A., Alanay, Y., Ben-Neriah, Z., Amenduni, M., Artuso, R., Veltman, J., van Beusekom, E., Oudakker, A., Millan, J., Hennekam, R., Hamel, B., Courtneidge S. and van Bokhoven, H. (2010). Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (*SH3PXD2B*) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *American journal of human genetics*, 86(2), pp. 254-261.
3. *SH3PXD2A* - SH3 and PX domain-containing protein 2A - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5TCZ1/entry#structure> (Accessed 05 February 2023).
4. *SH3PXD2A* SH3 and PX domains 2A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=9644> (Accessed: 05 February 2023).
5. *SH3PXD2B* SH3 and PX domains 2B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Available at: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A1X283/entry> (Accessed 3 March 2024).
6. *SH3PXD2B* SH3 and PX domains 2B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285590> (Accessed 3 March 2024).
7. Kalman, Z., Lazar, T., Dobson, L., and Pancsa, R. (2025). Definition and

- Discovery of Tandem SH3-Binding Motifs Interacting with Members of the p47phox-Related Protein Family. *Biomolecules*, [online] Volume 15(12), p. 1641. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom15121641> [Accessed 22 Nov. 2025].
8. Normand, L., Bonnard, B., Sala, M., Di Tommaso, S., Dourthe, C., Raymond, A., Dupuy, J., Mercier, L., Goetz, J., Moreau, V., Henriët, E. and Saltel, F. (2025). Tks5 interactome reveals endoplasmic-reticulum-associated translation machinery in invadosomes. *The FEBS journal*, 292(23), pp 6400–6419.
  9. Murphy, D. and Courtneidge, S. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. Nature reviews. *Molecular cell biology*, 12(7), pp. 413–426.
  10. Mader, C., Oser, M., Magalhaes, M., Bravo-Cordero, J., Condeelis, J., Koleske, A. and Gil-Henn, H. (2011). An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer research*, 71(5), pp. 1730–1741.
  11. MBIInfo contributors. Invadopodia assembly. In MBIInfo Wiki. Available at: <http://mbinfo.mbi.nus.edu.sg/figure/invadopodia-assembly/> (Accessed 21 October 2022).
  12. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H., Kirschner, M. and Mayer, B. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), pp. 26448–26452.
  13. Rivera, G., Briceño, C., Takeshima, F., Snapper, S. and Mayer, B. (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Current biology : CB*, 14(1), pp. 11–22.
  14. Buschman, M., Bromann, P., Cejudo-Martin, P., Wen, F., Pass, I. and Courtneidge, S. (2009). The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Molecular biology of the cell*, 20(5), pp. 1302–1311.
  15. Lányi, Á., Baráth, M., Péterfi, Z., Bogel, G., Orient, A., Simon, T., Petrovszki, E.,

- Kis-Tóth, K., Sirokmány, G., Rajnavölgyi, É., Terhorst, C., Buday, L. and Geiszt, M. (2011). The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading. *PloS one*, [online] Volume 6(8), p. e23653. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023653> [Accessed 23 Aug. 2011].
16. Abram, C., Seals, D., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T. and Courtneidge, S. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), pp. 16844-16851.
17. Stylli, S., Stacey, T., Verhagen, A., Xu, S., Pass, I., Courtneidge, S. and Lock, P. (2009). Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *Journal of cell science*, 122(15), pp. 2727–2740.
18. Yan, X., Cao, N., Chen, Y., Lan, H., Cha, J., Yang, W. and Yang, M. (2020). MT4-MMP promotes invadopodia formation and cell motility in FaDu head and neck cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 522(4), pp. 1009–1014.
19. Fekete, A., Bögel, G., Pesti, S., Péterfi, Z., Geiszt, M. and Buday, L. (2013). EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5. *Journal of molecular signaling*, [online] Volume 8, p. 8. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-8> [Accessed 8 Jul. 2013].
20. Daly, C., Logan, B., Breeyear, J., Whitaker, K., Ahmed, M. and Seals, D. (2020). TKS5 SH3 domains exhibit differential effects on invadopodia development. *PLoS ONE*, [online] Volume 15(1), p. e0227855. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227855> [Accessed 30 Jan. 2020].
21. Tilajka, Á., Kurilla, A., László, L., Lovrics, A., Novák, J., Takács, T., Buday, L. and Vas, V. (2024). Predictive value analysis of the interaction network of Tks4 scaffold protein in colon cancer. *Frontiers in molecular biosciences*, [online] Volume 11, p. 1414805. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1414805> [Accessed 21 Aug. 2024].

22. Iizuka, S., Abdullah, C., Buschman, M. D., Diaz, B. and Courtneidge, S. (2016). The role of Tks adaptor proteins in invadopodia formation, growth and metastasis of melanoma. *Oncotarget*, 7(48), pp. 78473–78486.
23. Zhu, Y., Hu, Y., Wang, P., Dai, X., Fu, Y., Xia, Y., Sun, L. and Ruan, S. (2023). Comprehensive bioinformatics and experimental analysis of SH3PXD2B reveals its carcinogenic effect in gastric carcinoma. *Life sciences*, [online] Volume 326, p. 121792. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121792> [Accessed 1 Aug. 2023].
24. Kui, X., Wang, Y., Zhang, C., Li, H., Li, Q., Ke, Y. and Wang, L. (2021). Prognostic value of SH3PXD2B (Tks4) in human hepatocellular carcinoma: a combined multi-omics and experimental study. *BMC medical genomics*, [online] Volume 14(1), p. 115. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12920-021-00963-6> [Accessed 28 Apr. 2023].
25. Kropyvko, S. (2015). New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolymers and cell*, (31, № 5), pp. 395-401.
26. Okrut, J., Prakash, S., Wu, Q., Kelly, M. and Taunton, J. (2015). Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), pp. E6436–E6445.
27. Morris, H., Fort, L., Spence, H., Patel, R., Vincent, D., Park, J., Snapper, S., Carey, F., Sansom, O. and Machesky, L. (2018). Loss of N-WASP drives early progression in an Apc model of intestinal tumourigenesis. *The Journal of pathology*, 245(3), pp. 337–348.
28. Yan, P., Liu, J., Zhou, R., Lin, C., Wu, K., Yang, S., Yang, S., Zhou, J., Xu, L., Wang, H. and Zhao, L. (2020). LASP1 interacts with N-WASP to activate the Arp2/3 complex and facilitate colorectal cancer metastasis by increasing tumour budding and worsening the pattern of invasion. *Oncogene*, 39(35), pp. 5743–5755.
29. Zhang, X., Liu, K., Zhang, T., Wang, Z., Qin, X., Jing, X., Wu, H., Ji, X., He, Y. and Zhao, R. (2017). Cortactin promotes colorectal cancer cell proliferation by activating the EGFR-MAPK pathway. *Oncotarget*, 8(1), pp. 1541–1554.

30. Tsyba, L., Gryaznova, T., Dergai, O., Dergai, M., Skrypkina, I., Kropyvko, S., Boldyryev, O., Nikolaienko, O., Novokhatska, O. and Rynditch, A. (2008). Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), pp. 929-934.
31. Bazalii, A., Samoylenko, A., Petukhov, D., Rynditch, A., Redowicz, M. and Drobot, L. (2014). Interaction between adaptor proteins Ruk/CIN85 and Tks4 in normal and tumor cells of different tissue origins. *Biopolymers and cell*, 30(1), pp. 37-41.
32. Gianni, D., Taulet, N., DerMardirossian, C. and Bokoch, G. (2010). c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 21(23), pp. 4287–4298.
33. Xie, W., Chen, C., Han, Z., Huang, J., Liu, X., Chen, H., Zhang, T., Chen, S., Chen, C., Lu, M., Shen, X. and Xue, X. (2020). CD2AP inhibits metastasis in gastric cancer by promoting cellular adhesion and cytoskeleton assembly. *Molecular carcinogenesis*, 59(4), pp. 339–352.
34. Kurilla, A., László, L., Takács, T., Tilajka, Á., Lukács, L., Novák, J., Pancsa, R., Buday, L. and Vas, V. (2023). Studying the Association of TKS4 and CD2AP Scaffold Proteins and Their Implications in the Partial Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *International journal of molecular sciences*, [online] Volume 24(20), p. 15136. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms242015136> [Accessed 13 Oct. 2023].
35. Chen, C., Xu, J., Zhang, J., Chen, L., Wei, Y., Zhang, W., Shao, P and Xu, H. (2024). CD2AP is a potential prognostic biomarker of renal clear cell carcinoma. *Cancer medicine*, 13(4), p. e7055. Available at: <https://doi.org/10.1002/cam4.7055> [Accessed 8 Mar. 2024].
36. Giubellino, A., Burke, T. and Bottaro, D. (2008). Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*, 12(8), pp. 1021-1033.
37. Bisson, N., James, D., Ivosev, G., Tate, S., Bonner, R., Taylor, L. and Pawson, T.

- (2011). Selected reaction monitoring mass spectrometry reveals the dynamics of signaling through the GRB2 adaptor. *Nature biotechnology*, 29(7), pp. 653-658.
38. Wenzel, E., Pedersen, N., Elfmark, L., Wang, L., Kjos, I., Stang, E., Malerød, L., Brech, A., Stenmark, H. and Raiborg, C. (2024). Intercellular transfer of cancer cell invasiveness via endosome-mediated protease shedding. *Nature communications*, [online] Volume 15(1), p. 1277. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45558-8> [Accessed 10 Feb. 2024].
39. Jacob, A., Linklater, E., Bayless, B., Lyons, T. and Prekeris, R. (2016). The role and regulation of Rab40b-Tks5 complex during invadopodia formation and cancer cell invasion. *Journal of cell science*, 129(23), pp. 4341–4353.
40. Stylli, S., I, S., Verhagen, A., Xu, S., Pass, I., Courtneidge, S. and Lock, P. (2009). Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *Journal of cell science*, 122(15), pp. 2727-2740.
41. Kropyvko, S. (2015). Interactome of invadopodia scaffold protein TKS5. *Biopolymers and Cell*. 31(6), p. 418.
42. Немеш, Я. та Кропивко, С. (2018) Нові взаємодії скафолдного білка інфадоподій TKS5 з білками перебудови актинового цитоскелету, ендо-/екзоцитозу та ремоделювання клітинної мембрани. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 16(2), сс. 183-189.
43. Dikic I. (2002). CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS letters*, 529(1), pp. 110–115.
44. Wong, K. A., Wilson, J., Russo, A., Wang, L., Okur, M. N., Wang, X., Martin, N., Scappini, E., Carnegie, G. and O'Bryan, J. (2012). Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks. *PloS one*, [online] Volume 7(4), p. e36023. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036023> [Accessed 27 Apr. 2012].
45. Pant, S., Sharma, M., Patel, K., Caplan, S., Carr, C. and Grant, B. (2009). AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nature cell biology*, 11(12), pp. 1399–1410.
46. Durand, B., Stoetzel, C., Schaefer, E., Calmels, N., Scheidecker, S., Kempf, N.,

- De Melo, C., Guilbert, A., Timbolschi, D., Donato, L., Astruc, D., Sauer, A., Antal, M., Dollfus, H. and El Chehadeh, S. (2020). A severe case of Frank-ter Haar syndrome and literature review: Further delineation of the phenotypical spectrum. *European journal of medical genetics*, [online] Volume 63(4), p. 103857. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103857> [Accessed 1 Apr. 2020].
47. Vas, V., Kovács, T., Körmendi, S., Bródy, A., Kudlik, G., Szeder, B., Mező, D., Kállai, D., Koprivanacz, K., Merő, B., Dülk, M., Tóvári, J., Vajdovich, P., Şenel, Ş., Özcan, I., Helyes, Z., Dobó-Nagy, C. and Buday, L. (2019). Significance of the Tks4 scaffold protein in bone tissue homeostasis. *Scientific reports*, [online] Volume 9(1), p. 5781. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42250-6> [Accessed 8 Apr. 2019].
48. Vas, V., Háhner, T., Kudlik, G., Ernszt, D., Kvell, K., Kuti, D., Kovács, K., Tóvári, J., Trexler, M., Merő, B., Szeder, B., Koprivanacz, K. and Buday, L. (2019). Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. *Cells*, [online] Volume 8(8), p. 831. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8080831> [Accessed 5 Aug. 2019].
49. Bögel, G., Gujdár, A., Geiszt, M., Lányi, Á., Fekete, A., Sipeki, S., Downward, J. and Buday, L. (2012). Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 287(37), pp. 31321–31329.
50. Cejudo-Martin, P., Yuen, A., Vlahovich, N., Lock, P., Courtneidge, S. and Díaz, B. (2014). Genetic disruption of the sh3pxd2a gene reveals an essential role in mouse development and the existence of a novel isoform of tks5. *PloS one*, [online] Volume 9(9), p. e107674. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107674> [Accessed 26 Sep. 2014].
51. van Rooij, I., Ludwig, K., Welzenbach, J., Ishorst, N., Thonissen, M., Galesloot, T., Ongkosuwito, E., Bergé, S., Aldharae, K., Rojas-Martinez, A., Kiemeny, L., Vermeesch, J., Brunner, H., Roeleveld, N., Devriendt, K., Dormaar, T., Hens, G., Knapp, M., Carels, C. and Mangold, E. (2019). Non-Syndromic Cleft Lip with or without Cleft Palate: Genome-Wide Association Study in Europeans Identifies a

- Suggestive Risk Locus at 16p12.1 and Supports SH3PXD2A as a Clefing Susceptibility Gene. *Genes*, [online] Volume 10(12), p. 1023. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes10121023> [Accessed 7 Dec. 2019].
52. Zhili, D., Mengting, C., Zhixiang, Z., Wenqin, X., Tangxiele, L., Qinqin, P., Zheng, W., San, X., Wei, S., Dan, J., Ben, W., Fangfen, L., Yan T., Yingxue, H., Yiya, Z., Qian, W., Lunquan, S., Hongfu, X., Guohong, Z. and Ji, L. (2023). Whole genome sequencing identifies genetic variants associated with neurogenic inflammation in rosacea. *Nat Commun*, [online] Volume 14, p. 3958. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39761-2> [Accessed 5 Jul. 2023].
53. Lock, P., Abram, C., Gibson, T. and Courtneidge, S. (1998). A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *The EMBO journal*, 17(15), pp. 4346–4357.
54. Li, C., Chen, G., Dayton, T., Kim-Kiselak, C., Hoersch, S., Whittaker, C., Bronson, R., Beer, D., Winslow, M. and Jacks, T. (2013). Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma. *Genes and development*, 27(14), pp. 1557–1567.
55. Seals, D., Azucena, E., Jr, Pass, I., Tesfay, L., Gordon, R., Woodrow, M., Resau, J. and Courtneidge, S. (2005). The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer cell*, 7(2), pp. 155–165.
56. Blouw, B., Patel, M., Iizuka, S., Abdullah, C., You, W., Huang, X., Li, J., Diaz, B., Stallcup, W. and Courtneidge, S. (2015). The invadopodia scaffold protein Tks5 is required for the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, [online] Volume 10(3), p. e0121003. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121003> [Accessed 6 Jan. 2023].
57. Burger, K., Learman, B., Boucherle, A., Sirintrapun, S., Isom, S., Díaz, B., Courtneidge, S. and Seals, D. (2014). Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells. *The Prostate*, 74(2), pp. 134–148.

58. Mehes, E., Barath, M., Gulyas, M., Bugyik, E., Geiszt, M., Szoor, A., Lanyi, A. and Czirok, A., (2019). Enhanced endothelial motility and multicellular sprouting is mediated by the scaffold protein TKS4. *Sci. Rep.*, [online] Volume 9, p. 14363. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50915-5> [Accessed 7 Oct. 2019].
59. László, L., Kurilla, A., Tilajka, Á., Pancsa, R., Takács, T., Novák, J., Buday, L., Vas, V., (2024). Unveiling epithelial plasticity regulation in lung cancer: Exploring the cross-talk among Tks4 scaffold protein partners. *Mol. Biol. Cell*, [online] Volume 35, p. ar111. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E24-03-0103> [Accessed 22 Jul. 2024].
60. Szeder, B., Tárnoki-Zách, J., Lakatos, D., Vas, V., Kudlik, G., Merő, B., Koprivanacz, K., Bányai, L., Hámori, L., Róna, G., Czirók, A., Füredi, A., Buday, A. (2019). Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells. *Cells*, [online] Volume 8, p. 1343. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8111343> [Accessed 29 Oct. 2019].
61. Mitre, G., Balbinot, K., Ribeiro, A., da Silva Kataoka, M., de Melo Alves Júnior, S., de Jesus Viana Pinheiro, J., (2021). Key proteins of invadopodia are overexpressed in oral squamous cell carcinoma suggesting an important role of MT1-MMP in the tumoral progression. *Diagn. Pathol.*, [online] Volume 16, p. 33. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13000-021-01090-7> [Accessed 20 Apr. 2021].
62. Hubiernatorova, A., Novak, J., Vaskovicova, M., Sekac, D., Kropyvko, S. and Hodny, Z., (2025). Tristetraprolin affects invasion-associated genes expression and cell motility in triple-negative breast cancer model. *Cytoskeleton (Hoboken)* 82, pp. 311-326.
63. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Soerjomataram, I. and Jemal, A., (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 74, pp. 229-263.
64. Bray, S., Carleton, N., Lucas, P., Bruno, T., Lee, A., Vignali, D.

- and Oesterreich S., (2023). The Great Immune Escape: Understanding the Divergent Immune Response in Breast Cancer Subtypes. *Cancer Discov.* 13, pp. 23-40.
- 65.Saha, T. and Gil-Henn, H. (2021). Invadopodia, a Kingdom of Non-Receptor Tyrosine Kinases. *Cells*, [online] Volume 10(8), p. 2037. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells10082037> [Accessed 9 Aug. 2021]
- 66.Chen, Y., Baik, M., Byers, J., Chen, K., French, S. and Díaz, B. (2019). TKS5-positive invadopodia-like structures in human tumor surgical specimens. *Experimental and molecular pathology*, 106, pp. 17–26.
- 67.Stylli, S., Luwor, R., Kaye, A., I, T., Hovens, C. and Lock, P. (2014). Expression of the adaptor protein Tks5 in human cancer: prognostic potential. *Oncology reports*, 32(3), pp. 989–1002.
- 68.Aldhafeeri. H. and Leong, H. (2022). The Subline of Metastatic Prostate Cancer Cell line, DU145 expresses Tks4 and reveals distinctive Phenotype. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences.* 16(9), pp. 862-867.
- 69.Banerjee, S., Lo, W., Majumder, P., Roy, D., Ghorai, M., Shaikh, N., Kant, N., Shekhawat, M., Gadekar, V., Ghosh, S., Bursal, E., Alrumaihi, F., Dubey, N., Kumar, S., Iqbal, D., Alturaiki, W., Upadhye, V., Jha, N., Dey, A. and Gundamaraju, R. (2022). Multiple roles for basement membrane proteins in cancer progression and EMT. *European journal of cell biology*, 101(2), p. 151220.
- 70.Graeber, S. and Hülser, D. (1998). Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. *Experimental cell research*, 243(1), pp. 142–149.
- 71.Sun, X., Zhou, L., Wang, X., Li, Y., Liu, X., Chen, Y., Zhong, Z. and Chen, J. (2022). FYCO1 regulates migration, invasion, and invadopodia formation in HeLa cells through CDC42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 100(6), pp. 458–472.
- 72.Crawford, J. and Jacobson, B. (1998). Extracellular calcium regulates HeLa cell morphology during adhesion to gelatin: role of translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2. *Molecular biology of the cell*, 9(12), pp. 3429–3443.

73. Shen, J., Yang, J., Sang, L., Sun, R., Bai, W., Wang, C., Sun, Y. and Sun, J. (2021). PYK2 mediates the BRAF inhibitor (vemurafenib)-induced invadopodia formation and metastasis in melanomas. *Cancer biology and medicine*, 19(8), pp. 1211–1223.
74. Ren, J., Li, W., Yan, L., Jiao, W., Tian, S., Li, D., Tang, Y., Gu, G., Liu, H. and Xu, Z. (2011). Expression of CIP2A in renal cell carcinomas correlates with tumour invasion, metastasis and patients' survival. *British journal of cancer*, 105(12), pp. 1905–1911.
75. Liu, Y., Su, C., Yan, Y., Wang, J., Li, J., Fu, J., Wang, Y. and Zhang, J. (2022). Exosomes of A549 Cells Induced Migration, Invasion, and EMT of BEAS-2B Cells Related to let-7c-5p and miR-181b-5p. *Frontiers in endocrinology*, [online] Volume 13, p. 926769. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.926769> [Accessed 8 Jul. 2022].
76. Lan, G., Gan, Q., Shao, J. and Sun, T. (2025). Inhibition of hepatocellular carcinoma proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by curcumin via upregulation of MIR-200C-3P to target the JAK1/STAT3 signaling pathway. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, [online] Volume 82(3). Available at: <https://doi.org/10.32383/appdr/213398> [Accessed 20 Nov. 2025].
77. Wu, B., Li, J., Huang, D., Wang, W., Chen, Y., Liao, Y., Tang, X., Xie, H. and Tang, F. (2011). Baicalein mediates inhibition of migration and invasiveness of skin carcinoma through Ezrin in A431 cells. *BMC cancer*, [online] Volume 11, p. 527. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-527> [Accessed 28 Dec. 2011].
78. Xu, P., Hou, L., Ju, C., Zhang, Z., Sun, W., Zhang, L., Song, J., Lv, Y., Liu, L., Chen, Z. and Wang, Y. (2016). Isatin inhibits the proliferation and invasion of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Molecular medicine reports*, 13(3), pp. 2757–2762.
79. Thompson, E., Reich, R., Shima, T., Albini, A., Graf, J., Martin, G., Dickson, R. and Lippman, M. (1988). Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens. *Cancer research*, 48(23), pp. 6764–6768.

80. Zhang, Z., Lin, M., Wang, J., Yang, F., Yang, P., Liu, Y., Chen, Z. and Zheng, Y. (2021). Calycosin inhibits breast cancer cell migration and invasion by suppressing EMT via BATF/TGF- $\beta$ 1. *Aging*, 13(12), pp. 16009–16023.
81. Pang, K., Zhang, Z., Hao, L., Shi, Z., Chen, B., Zang, G., Dong, Y., Li, R., Liu, Y., Wang, J., Zhang, J., Cai, L., Han, X. and Han, C. (2019). The ERH gene regulates migration and invasion in 5637 and T24 bladder cancer cells. *BMC cancer*, [online] Volume 19(1), p. 225. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5423-9> [Accessed 12 Mar. 2019].
82. Zhang, J., Deng, Y., Liu, J., Wang, Y., Yi, T., Huang, B., He, S., Zheng, B. and Jiang, Y. (2016). Norepinephrine induced epithelial-mesenchymal transition in HT-29 and A549 cells in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 142(2), pp. 423–435.
83. Formolo, C., Williams, R., Gordish-Dressman, H., MacDonald, T., Lee, N. and Hathout, Y. (2011). Secretome signature of invasive glioblastoma multiforme. *Journal of proteome research*, 10(7), pp. 3149–3159.
84. Kim, H., Zhang, H., Li, H., Wu, T., Swisher, S., He, D., Wu, L., Xu, J., Elmets, C., Athar, M., Xu, X. and Xu, H. (2008). Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(12), pp. 1411–1420.
85. Mylavarapu, S., Kumar, H., Kumari, S., Sravanthi, L., Jain, M., Basu, A., Biswas, M., Mylavarapu, S., Das, A. and Roy, M. (2019). Activation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Altered  $\beta$ -Catenin Signaling in a Novel Indian Colorectal Carcinoma Cell Line. *Frontiers in oncology*, [online] Volume 9, p. 54. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00054> [Accessed 15 Feb. 2019].
86. Jin, S., Jeong, Y., Jung, S., Ryu, H., Jin, Y. and Kim, I. (2009). The effect of hyaluronic Acid on the invasiveness of malignant glioma cells : comparison of invasion potential at hyaluronic Acid hydrogel and matrigel. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 46(5), pp. 472–478.
87. Klarmann, G., Hurt, E., Mathews, L., Zhang, X., Duhagon, M., Mistree, T.,

- Thomas, S. and Farrar, W. (2009). Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clinical and experimental metastasis*, 26(5), pp. 433–446.
88. Jin, H., Yu, Y., Hu, Y., Lu, C., Li, J., Gu, J., Zhang, L., Huang, H., Zhang, D., Wu, X., Gao, J. and Huang, C. (2015). Divergent behaviors and underlying mechanisms of cell migration and invasion in non-metastatic T24 and its metastatic derivative T24T bladder cancer cell lines. *Oncotarget*, 6(1), pp. 522–536.
89. Wang, F., Grigorieva, E., Li, J., Senchenko, V., Pavlova, T., Anedchenko, E., Kudryavtseva, A., Tsimanis, A., Angeloni, D., Lerman, M., Kashuba, V., Klein, G. and Zabarovsky, E. (2008). HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro. *PloS one*, [online] Volume 3(8), p. e3031. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003031> [Accessed 22 Aug. 2008].
90. Gavin, C., Geerts, N., Cavanagh, B., Haynes, M., Reynolds, C., Loessner, D., Ewald, A. and Piskareva, O. (2021). Neuroblastoma Invasion Strategies Are Regulated by the Extracellular Matrix. *Cancers*, [online] Volume 13(4), p. 736. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13040736> [Accessed 10 Feb. 2021].
91. Saikali, Z., Setya, H., Singh, G. and Persad, S. (2008). Role of IGF-1/IGF-1R in regulation of invasion in DU145 prostate cancer cells. *Cancer cell international*, [online] Volume 8, p. 10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2867-8-10> [Accessed 03 Jul. 2008].
92. Colella, R., Jackson, T. and Goodwyn, E. (2004). Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. *Biotechnic and histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 79(3-4), pp. 121–127.
93. Viola, M., Brüggemann, K., Karousou, E., Caon, I., Caravà, E., Vigetti, D., Greve, B., Stock, C., De Luca, G., Passi, A. and Götte, M. (2017). MDA-MB-231 breast cancer cell viability, motility and matrix adhesion are regulated by a complex interplay of heparan sulfate, chondroitin-/dermatan sulfate and hyaluronan biosynthesis. *Glycoconjugate journal*, 34(3), pp. 411–420.
94. Yano, H., Maruiwa, M., Sugihara, S., Kojiro, M., Noda, S. and Eto, K. (1988).

- Establishment and characterization of a new human renal cell carcinoma cell line (KRC/Y). *In vitro cellular and developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 24(1), pp. 9–16.
95. Kovalevich, J. and Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, pp. 9–21.
96. Thomas, P. and Smart, T. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 51(3), pp. 187–200.
97. Dunn, K., Aotaki-Keen, A., Putkey, F. and Hjelmeland, L. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research*, 62(2), pp. 155–169.
98. Torsvik, A., Stieber, D., Enger, P., Golebiewska, A., Molven, A., Svendsen, A., Westermark, B., Niclou, S., Olsen, T., Chekenya Enger, M. and Bjerkvig, R. (2014). U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer medicine*, 3(4), pp. 812–824.
99. Stein G. (1979). T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *Journal of cellular physiology*, 99(1), pp. 43–54.
100. Tai, S., Sun, Y., Squires, J., Zhang, H., Oh, W., Liang, C. and Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), pp. 1668–1679.
101. Senger, D., Perruzzi, C. and Ali, I. (1988). T24 human bladder carcinoma cells with activated Ha-ras protooncogene: nontumorigenic cells susceptible to malignant transformation with carcinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(14), pp. 5107–5111.
102. Srivastava, H., Lippincott, M., Currie, J., Canfield, R., Lam, M. and Lau, E. (2022). Protein prediction models support widespread post-transcriptional regulation of protein abundance by interacting partners. *PLoS computational biology*, [online] Volume 18(11), p. e1010702. Available

- at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010702> [Accessed 10 Nov. 2022].
103. Gonçalves, E., Fragoulis, A., Garcia-Alonso, L., Cramer, T., Saez-Rodriguez, J. and Beltrao, P. (2017). Widespread Post-transcriptional Attenuation of Genomic Copy-Number Variation in Cancer. *Cell systems*, 5(4), pp. 386–398.
  104. An, H. and Harper, J. (2020). Ribosome abundance control via the ubiquitin–proteasome system and autophagy. *Journal of molecular biology*, 432(1), pp. 170-184.
  105. Liu, Y., Beyer, A. and Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165(3), pp. 535-550.
  106. Waldbauer, J., Rodrigue, S., Coleman, M. and Chisholm, S. (2012). Transcriptome and proteome dynamics of a light-dark synchronized bacterial cell cycle. *PloS one*, [online] Volume 7(8), p. e43432. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043432> [Accessed 29 Aug. 2012].