

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**РОЛЬ РЕДОКС-ЗАЛЕЖНОГО СИГНАЛЮВАННЯ В КОНТРОЛІ
БІОЛОГІЧНИХ ВІДПОВІДЕЙ АДЕНОКАРЦИНОМНИХ КЛІТИН**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Кальмуцької Софії Костянтинівни

Науковий керівник від кафедри

д-р біол. наук, ст. наук. співроб.

Андрійчук Т.Р.

Робота виконана у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом завідувача відділу, д-ра біол. наук, проф. Дробот Людмили Борисівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	– активні форми кисню;
ДСН	– додецилсульфат натрію;
ASAP1/ AMAP1	– Arf-GAP with SH3 domain, Ankyrin repeat and PH domain-containing protein 1 (Білок 1, що містить ARF-GAP-домен, SH3-домен, повтор анкірину та PH-домен);
ATG5/7	– Autophagy-related protein 5/7 (білок 5/7, пов'язаний з автофагією);
Cbl	– Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene (Протоонкоген Casitas В-клітинної лімфоми);
CD2AP/CMS	– CD2-associated protein/Cytoskeleton-Membrane-Scaffold (білок, асоційований із CD2/каркас цитоскелет-мембрана);
DPBS	– Dulbecco's phosphate-buffered saline (фосфатно-сольовий буфер Дульбекко);
FITC	– Fluorescein isothiocyanate (флюоресцеїнізотіоціанат);
FSC	– Forward Scatter (пряме розсіювання);
Gp91 ^{phox}	– Glycoprotein of 91 kDa, phagocyte oxidase (Глікопротеїн масою 91 кДа, фагоцитарна оксидаза);
H ₂ DCF-DA	– 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2', 7'-дихлордигідрофлюоресцеїн діацетат);
HRP	– Horseradish peroxidase (пероксидаза хрону);
K-RAS	– Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (гомолог вірусного онкогена саркоми щурів Кірстена);
LC3B	– Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (Білок 1, асоційований з мікротрубочками з легким ланцюгом 3B);
N-WASP	– Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (Нейронний

	білок синдрому Віскотта-Олдріча);
PBS	– Phosphate-buffered saline (Фосфатний буферний розчин);
PI	– Propidium iodide (пропідій йодид);
PI-3-кіназа	– Phosphoinositide-3-kinase (Фосфатидилінозитид-3-кіназа);
p22/47/40 /67 ^{phox}	– Protein of 22/47/40/67 kDa, phagocyte oxidase (Протеїн масою 22/47/40/67 кДа, фагоцитарна оксидаза);
PtdIns(3,4)P ₂	– Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (Фосфатидилінозитол-3,4-дисфосфат);
PtdIns(3,4,5)P ₃	– Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (Фосфатидилінозитол-3,4,5-трисфосфат);
Ruk/CIN85	– Regulator of ubiquitination kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa (Регулятор убіквітинування кінази/Cbl-зв'язуючий білок масою 85 кДа);
SETA	– SH3 domain-containing gene expressed in tumorigenic astrocytes) (ген, що містить домен SH3, експресується в пухлиногенних астроцитах);
SH2/3 домен	– Src-Homology 2/3 domain; (Src-гомологічний домен типу 2/3);
SSC	– Side scatter (Бічне розсіювання);
Src	– Sarcoma proto-oncogene tyrosine-protein kinase (тирозинова протеїнкіназа, протоонкоген саркоми);
Tks4	– Tyrosine kinase substrate 4 (субстрат тирозинкінази 4).

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85: характеристика структурно-функціональної організації та біологічної ролі щодо АФК-залежного регулюванням сигнальних шляхів у пухлинних клітинах.....	8
1.1. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85: структурно-функціональна організація та біологічна роль.....	8
1.2. Джерела АФК у пухлинних клітинах.....	15
1.3. АФК-залежне регулювання сигнальних шляхів у пухлинних клітинах ..	18
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень	21
2.1. Матеріали дослідження	21
2.2. Культивування аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1	23
2.3. Аналіз продукування АФК сублініями аденокарциномних клітин грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85	24
2.3.1. Аналіз АФК в пухлинних клітинах хемілюмінесцентним методом....	24
2.3.2. Аналіз АФК в пухлинних клітинах протоковою цитофлуориметрією	25
2.4. Вестерн-блот аналіз лізатів клітин 4T1	27
2.4.1. Отримання лізатів клітин	28
2.4.2. Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі та Вестерн-блот аналіз.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	30
3.1. Морфологічна характеристика модифікованих субліній культури клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85	30

3.2. Рівень продукування АФК сублініями аденокарциномних клітин грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85	33
3.2.1. Аналіз продукування АФК в пухлинних клітинах хемілюмінесцентним методом.....	33
3.2.2. Аналіз продукування АФК в пухлинних клітинах протоковою цитофлуориметрією	37
3.3. Результати Вестерн-блот аналізу факторів автофагії в лізатах клітин субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.....	40
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44

ВСТУП

Дедалі накопичуються дані досліджень, які демонструють, що пероксид водню (H_2O_2) може виступати в ролі вторинного месенджера, який сприяє посиленню та пролонгації рецептор-опосередкованих сигнальних шляхів і може впливати на регуляцію клітинних відповідей, відповідно, і на розвиток різних системних патологій [1].

Одним з важливих джерел активних форм кисню (АФК) у клітинах є NADPH-оксидазний комплекс, який, використовуючи внутрішньоклітинний NADPH, переносить його електрони через флавінаденіндинуклеотид і гем на зовнішній бік цитоплазматичної мембрани до кисню з утворенням супероксидного радикалу, який надалі швидко дисмутує до H_2O_2 . На ініціацію збірки NADPH-оксидазного комплексу впливають численні протеїни, зокрема субстрат тирозинкінази 4 (Tks4), який, за попередніми дослідженнями, є зв'язувальним партнером регулятора убіквітінування кінази/Cbl-зв'язуючого протеїну масою 85 кДа (Ruk/CIN85) [2]. Ці дані дозволили припустити роль Ruk/CIN85 в активації NADPH-оксидазного комплексу та його вплив на продукцію АФК.

Встановлена участь Ruk/CIN85 у механізмах передачі клітинного сигналу, цей адаптер залучений також до процесів клітинної адгезії [3], мембранного транспорту, опосередкованого везикулами [4], ремоделювання цитоскелета [5], запрограмованої загибелі клітин [6].

Хоча залежність NADPH-оксидазоопосередкованої продукції H_2O_2 від рівня експресії Ruk/CIN85 вже висвітлювалася в попередніх дослідженнях, ця тема потребує подальшого поглиблення, а оскільки активні форми кисню є тригерами процесів автофагії [7], логічним розширенням роботи стало застосування методу Вестерн-блот аналізу для оцінки вмісту ключових факторів автофагії.

Новизна даного дослідження: люмінесцентним та цитофлуориметричними методами вперше проведено порівняльний аналіз

продукування АФК в сублініях клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. Інгібіторним аналізом з апоциніном підтверджено, що зростання продукування АФК клітинами аденокарциноми грудної залози миші 4T1 сублінії зі збільшеною експресією Ruk/CIN85 опосередковано NADPH-оксидазним комплексом. Методом Вестерн-блот аналізу досліджено залучення редокс-залежного сигналювання до контролю автофагії у клітинах аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Метою кваліфікаційної роботи є оцінити особливості продукування H_2O_2 /АФК і редокс-залежного сигналювання в аденокарциномних клітинах грудної залози миші 4T1 залежно від рівня адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та залучення цих процесів до контролю автофагії.

Для реалізації вище вказаної мети було сформульовано наступні завдання:

1. Проаналізувати особливості продукування H_2O_2 /АФК аденокарциномними клітинами грудної залози миші 4T1 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 з використанням люмінесцентних методичних підходів.
2. Оцінити специфіку внутрішньоклітинного продукування H_2O_2 /АФК аденокарциномними клітинами грудної залози миші 4T1 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методом протокової цитофлуориметрії
3. Встановити вміст маркерів автофагії у клітинах грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

РОЗДІЛ 1

АДАПТЕРНИЙ ПРОТЕЇН RUK/CIN85: ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ТА БІОЛОГІЧНОЇ РОЛІ ЩОДО АФК-ЗАЛЕЖНОГО РЕГУЛЮВАННЯ СИГНАЛЬНИХ ШЛЯХІВ У ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ

1.1. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85: структурно-функціональна організація та біологічна роль

Адаптерні протеїни – категорія протеїнів, що беруть участь у процесах передачі сигналу. Зазвичай вони складаються з кількох модульних доменів з різними зв'язувальними активностями. Адаптерні протеїни утворюють комплекси з іншими молекулами, які задіяні у внутрішньоклітинній сигналізації, проте на відміну від них адаптерні протеїни не мають ензимної активності, хоча можуть змінювати свою функційну активність під дією інших ензимів.

Одними з найважливіших вторинних месенджерів, у синтезі яких беруть участь адаптерні протеїни, є інозитол-вмісні ліпіди, зокрема 3'-ОН-фосфорильовані похідні фосфатидилінозиту, сполуки, що безпосередньо регулюють клітинну проліферацію, диференціацію, виживання, міграцію, контроль метаболічних процесів, організацію цитоскелету та мембранний транспорт. Ці функції досягаються шляхом взаємодії зв'язаних з мембраною фосфоінозитидів зі специфічними доменами ефекторних протеїнів, одним з яких є плекстрин-гомологічний домен, який, за взаємодії з фосфоліпідами, зокрема фосфатидилінозитолом 3,4-дисфосфатом ($\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$) та фосфатидилінозитолом 3,4,5-трисфосфатом ($\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$), зумовлює переміщення ефекторного протеїну з цитозолу до мембрани, активуючи його [8].

В свою чергу фосфатидилінозит-3-кінази I (PI-3-кінази I) синтезують фосфоліпіди $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ та $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ шляхом фосфорилування 3'-позиції інозитольного кільця і поділяються за класами, зокрема PI-3-кіназа класу IA бере участь у передачі сигналів від рецепторних та нерецепторних тирозинових кіназ і потребує регуляторної субодиниці для переміщення і активації внаслідок взаємодії з каталітичною субодиницею p110. Регуляторна субодиниця p85 містить Src-гомологічний домен типу 2 (SH2 домен), що взаємодіє з фосфорильованими тирозиновими залишками у специфічних ділянках внутрішньоклітинної частини рецепторних тирозинових кіназ або адаптерних протеїнів, та домен SH3, який взаємодіє з пролін-збагаченими ділянками певних адаптерних протеїнів [9].

Було встановлено, що за втрати активності протеїну-антагоніста до IA PI-3-кінази і постійного фосфорилування 3'-позиції $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ і $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, різко зростав шанс розвитку неоплазії [10]. Таким чином зріс інтерес до механізму негативної регуляції PI-3-кінази класу IA, та згодом було виявлено можливу інгібуючу дію на IA PI-3-кіназу адаптерним протеїном, знайденим у клоні 3E7, пізніше названим Ruk [11].

Ruk мРНК оригінального клона 3E7 починалась з старт-кодону АУГ, оточеного чіткою консенсусною послідовністю Козак в рамці зчитування, далі слідували 3 відкриті бокси SH3 доменів – А, В і С, пролін-збагачений регіон, серин- збагачений регіон та біспіральний структурний мотив, що знаходився у С-кінцевій ділянці та міг слугувати для олігомеризації протеїну. Можлива взаємодія першого домену (А), меншою мірою другого (В), з пролін-збагаченими регіонами цього ж протеїну дає привід припустити існування взаємодій всередині Ruk-адаптера, а також вказує на додаткову можливість олігомеризації даного протеїну [12] і складність налаштування взаємодій між PI-3-кіназою та адаптером Ruk. Структурна організація мРНК Ruk дещо нагадувала мРНК мишачого протеїну, що взаємодіє з протоонкогеном Casitas В-клітинної лімфоми (Cbl) (CD2AP/CMS). Подальший аналіз мишачого CD2AP/CMS та щурячого Ruk1 встановив 53%

схожості між ними, відповідно була висунута гіпотеза про олігомеризацію Ruk з цими протеїнами [13].

Дослідження експресії Ruk мРНК виявило кілька варіантів транскриптів: у всіх клітинах спостерігалась форма розміром 3,5 кб (*ruk1*), більш тканиноспецифічними були форми 2,5 кб (*ruk2*) та 1,5 кб (*ruks*). Аналіз ізольованих клонів встановив, що різні форми продукту експресії утворюються шляхом альтернативного сплайсингу та регуляції різних промоторів. Вищеописана структурна організація протеїну відповідала саме формі *ruk1*, при цьому ж для *ruk2* встановили наявність лише одного з трьох SH3 доменів на відміну від *ruk1*. *Ruks*, в свою чергу, зберіг лише біспіральний структурний мотив у зоні С-кінцевої ділянки [6].

Для підтвердження гіпотези щодо інгібуючої дії адаптера Ruk1 на PI-3-кіназу класу IA, спочатку дослідили взаємодію протеїну Ruk1 з набором доменів SH3 *in vitro* за допомогою глутатіон-S-трансфераз, експресованих з доменами SH3, на глутатіон-Сефарозі та їхньої подальшої інкубації в лізаті клітин, інфікованих бакуловірусом для експресії Ruk1. Результат аналізували за допомогою вестерн блотингу і дійшли до висновку, що Ruk1 може взаємодіяти з доменами SH3 різних протеїнів, проте найсильніша взаємодія спостерігалась з SH3 доменом регуляторної субодиниці p85α PI-3-кінази [6].

Також взаємодію Ruk1 з SH3 доменом субодиниці p85α підтверджує експеримент з одночасною експресією протеїну Ruk1 з Glu-тегом та регуляторної субодиниці p85α у культурі клітин комах Sf9. Для осадження ймовірних комплексів Ruk1-p85α використали антитіла до Glu-тегу, а для виявлення p85α субодиниці антитіло до неї. Результат виявив утворення стабільних Ruk1-p85α комплексів. До подібних висновків дійшли за використання культури клітин ссавців U937 [6].

Варто зауважити, що взаємодія Ruk1 з SH3 доменом субодиниці p85α залежить як від доменів SH3, так і від пролін-збагачених регіонів цих протеїнів. На це вказують дослідження взаємодії мутатних типів Ruk1 та p85α. Ruk1, що не містить другого або третього пролін-збагаченого сайту в

пролін-багатому регіоні, та p85 α без SH3 доменів можуть взаємодіяти на тому ж рівні, як і варіанти протеїнів дикого типу. На відміну від цього варіант Ruk1 дикого типу та p85 α без SH3 доменів взаємодіяти між собою не можуть [14]. Саме це наштовхує на думку про існування певної закритої форми Ruk1, що фізично перешкоджає більшості взаємодій між модулями адаптера і інших протеїнів.

Для дослідження власне інгібуючої властивості Ruk1 на активність ІА PI-3-кінази очищені з культури клітин Sf9 Ruk1 і p85 α -p110 використали для проведення ензимного аналізу із застосуванням фосфатидилінозитулу як субстрату. Результати цього експерименту показали, що активність досліджуваної кінази була значно меншою у присутності адаптерного протеїну Ruk1, на відміну від культивування чистого голоензиму. Найнижча активність спостерігалась за еквімолярного співвідношення між Ruk1 та PI-3-кінази в реакції.

Встановлення інгібуючої дії Ruk1 на PI-3-кіназу дало поштовх дослідженням потенційного впливу гіперекспресії даного протеїну на виживання та розвиток чутливих клітин. Методом мікроін'єкції було доставлено плазмиду з вставкою гена Ruk1 до ядер первинних чутливих нейронів мишей на 1-й постнатальний день. За результатами дослідження відсоткове співвідношення живих клітин у культурі на момент 2 та 48 год після мікроін'єкції плазмидою з геном Ruk1 була значно меншою порівняно з контрольною групою, що не мала у плазміді вставки гена Ruk. У дослідженні фрагментації ДНК було встановлено, що частина клітин, модифікованих геном Ruk, зазнала апоптозу [6]. Отже, можна припустити важливу роль адаптерного протеїну Ruk1 у механізмі клітинної загибелі.

В подальших дослідженнях встановили форму Ruk-протеїну, знайдену в клітинах людей – CIN85, тому більшість подальших джерел надавали інформацію одразу для варіантів Ruk/CIN85.

Як вже було зазначено раніше, функції Ruk/CIN85 різноманітні та не обмежуються участю в трансдукції сигналу через взаємодію з PI-3-кіназою,

адже він здатний залучати широкий спектр функціонально різноманітних протеїнів завдяки своїм модульним ділянкам взаємодії.

Ruk/CIN85 було знайдено в ламелоподіях та місцях точкових адгезивних контактів, структурах необхідних для міграції і власне клітинної адгезії. У цих структурах протеїнами, з якими зв'язувався Ruk/CIN85, були рецепторні тирозинкінази, протеїни родини Cbl, ендofilіни, динаміни, інозитол-5-фосфатази, індуктор полімеризації актину, нейронний білок синдрому Віскотта-Олдріча (N-WASP), а також нерецепторні тирозинкінази фокальних адгезій (FAK), клітинний гомолог онкогену вірусу лейкемії миші Абельсона та тирозинова протеїнкіназа, протоонкоген саркоми (Src), інші адаптерні та структурні протеїни. Точних функцій Ruk/CIN85 у цих взаємодіях не було визначено, хоча передбачається, що пряма взаємодія Ruk/CIN85 FAK та пролін-збагаченої тирозинкіназою 2 сприяє прикріпленню клітин до субстрату. В свою чергу комплекси Ruk/CIN85 з інгібітором апоптозу 1/протеїном, який взаємодіє геном, пов'язаним з апоптозом (AIP1/Alix) могли інгібувати взаємодію Ruk/CIN85 з пролін-збагаченою тирозинкіназою 2 [5]. Варто зазначити, що фосфорильований нерецепторною тирозинкіназою Src AIP1/Alix не міг взаємодіяти з Ruk/CIN85 [15]. Таким чином можна дійти до висновку, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 бере активну участь у індукції біогенезу точкових адгезивних контактів у межах сигнального шляху, опосередкованого Src.

Як вже зазначалось раніше, протеїн CD2AP/CMS є подібним за структурною будовою до Ruk/CIN85. Було встановлено, що вони разом здатні безпосередньо зв'язуватися з F-актином *in vitro*, сприяючи утворенню актинових пучків шляхом зшивання окремих філаментів. В свою чергу мутантний CD2AP/CMS, що не мав здатності до взаємодії з іншими CD2AP/CMS та Ruk/CIN85, суттєво знижував здатність подоцитів до міграції [16]. З чого можна зробити висновок, що взаємодія між CD2AP/CMS і Ruk/CIN85 може регулювати здатність CD2AP/CMS до зв'язування з

F-актином, індукуючи міграцію подоцитів, хоча безпосередній ефект Ruk/CIN85 на цей процес не був продемонстрований.

Ще однією роллю Ruk/CIN85 в якості потенційного компонента комплексу RICH1 з ангіомотином у механізмах клітинної адгезії може бути здатність підтримувати цілісність щільних з'єднань та полярність епітеліальних клітин [3].

З кожним роком зростає кількість доказів того, що Ruk/CIN85 може сприяти злоякісному перетворенню та підвищувати інвазивність ракових клітин. Дослідження протеїну, що містить домен SH3, і експресується в пухлиногенних астроцитах (SETA) – варіанта Ruk/CIN85 з відсутнім N-кінцевим SH3 доменом, встановили, що приблизно половина досліджуваних людських гліом містили цей протеїн, хоча в здорових зрілих клітинах мозку SETA не експресується [17]. До подібних висновків дійшли досліджуючи карциному товстої кишки [18].

Також було встановлено зв'язок між високим рівнем експресії Ruk/CIN85 та інвазивністю ракових клітин молочної залози. Цей адаптер є важливим компонентом інвадаподій [19]. Інвадаподії – це адгезивні мембранні випинання, багаті на актин, які забезпечують здатність ракових клітин проникати через екстрацелюлярний матрикс та навколишні тканини [20]. Існує припущення, що роль Ruk/CIN85 полягає у зв'язуванні протеїнів Cbl із активаторами ГТФ-ази анкерними протеїнами, що беруть участь у внутрішньоклітинному транспорті та регуляції актинового цитоскелету (ASAP1/AMAP1). Згідно з цією гіпотезою, було досліджено вплив siRNA-опосередкованого пригнічення Ruk/CIN85 на інвазивність пухлинних клітин молочної залози *in vitro*, яка дійсно зменшувалась, проте, в даному випадку варто зазначити, що не здатні до зв'язування з Ruk/CIN85 мутанти ASAP1/AMAP1 все ще могли впливати на процес утворення інвадаподій [21]. Це можна пояснити незалежними функціями Ruk/CIN85 та ASAP1/AMAP1 у цих структурах. Цікаво, що було віднайдено багато структурних подібностей між інвадаподіями та подоцитами

недиференційованих клітин, зокрема наявність певних компонентів точкових адгезивних контактів [20], що власне вказує на більш складний та множинний функціонал Ruk/CIN85 в процесі утворення інвадаподій.

Ще одне дослідження вказує на можливість взаємодії Ruk/CIN85 з Tks4 – адаптерним протеїном, необхідним для формування подосом у Src-трансформованих фібробластах. Його гомолог, Tks5, бере участь у збірці подосом у точкових адгезивних контактах та рекрутується до мембран через PI(3,4)P₂, слугуючи платформою для N-WASP, що сприяє опосередкованій комплексом актин-подібного протеїну організації актину [22]. Ruk/CIN85, окрім кластеризації Src, N-WASP і Tks4, може взаємодіяти з ензимами, необхідними для синтезу PtdIns(3,4)P₂ і PtdIns(3,4,5)P₃, що дозволяє припустити: Tks4 і Ruk/CIN85 разом можуть забезпечувати платформу для ініціації актинової асамблеї в інвадаподіях ракових клітин. Ще однією важливою роллю протеїну Tks4 є участь в ініціації активації NADPH-оксидазного комплексу. Фактично взаємодія Ruk/CIN85 з Tks4 може впливати на активність NADPH-оксидазного комплексу і, відповідно, збільшувати продукцію АФК [1].

Також була встановлена можливість взаємодії Ruk/CIN85 через Sprouty 2 з гомологом онкогену саркоми Гарві у щурів (H-Ras). Протеїн Sprouty 2 є важливим для формування пухлин з H-Ras-трансформованих фібробластів у голих мишей [23], а взаємодія з ним може прямо впливати на онкогенність досліджуваних клітин.

Було віднайдено численну кількість зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85, що дозволяє припустили багатогранні функції цього протеїну. Проте ролі всіх взаємодій Ruk/CIN85 з його потенційними партнерами ще будуть встановлюватись у подальших дослідженнях, як і його роль у розвитку раку. Також важливо відділити, які з описаних зв'язків можливі *in vivo* попри успішні експерименти *in vitro*.

1.2. Джерела АФК у пухлинних клітинах

АФК є фізіологічними побічними продуктами життєдіяльності клітин внаслідок різноманітних метаболічних процесів. До АФК відносять синглетний молекулярний кисень ($^1\text{O}_2$), супероксидний аніон ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксид водню (H_2O_2), гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$), гіпохлоритну кислоту (HClO) тощо, тобто АФК – це група нестабільних, реакційноздатних, частково відновлених похідних молекулярного кисню, які можуть легко окиснювати інші молекули та виступати в ролі вторинних месенджерів у клітинах [24]. За нормальних умов існує низка механізмів знешкодження АФК для збереження балансу між їхньою продукцією та утилізацією.

Головним джерелом ендогенної продукції АФК у клітин є мітохондрії, власне внутрішня мітохондріальна мембрана, на якій розташовані 5 протеїнових комплексів. Ці комплекси залучені в процес окисного фосфорилування, синтез АТФ з АДФ з використанням енергії окиснення різних органічних молекул, та виконують роль транспортерів електронів. Особливу роль в створенні АФК відіграють комплекси I (нікотинамідаденіндинуклеотид-дегідрогеназний комплекс) і III (цитохром c-оксидоредуктаза). Поява значних змін потенційної енергії електронів в результаті відновлення кисню спричиняє витік електронів з цих комплексів, що веде до утворення супероксидного аніону, який в подальшому може бути перетворений супероксидисмутазою 1 чи 2 на пероксид водню [25].

Ключовими генераторами АФК у багатьох клітинах також є сімейство NADPH-оксидаз, яке включає сім різних варіантів, що локалізуються на плазматичній мембрані та відрізняються за тканинною спеціалізацією і механізмами активації. NADPH-оксидаза є багатоконпонентним ензимом, що складається з мембранних і цитозольних субодиниць, які взаємодіють у відповідь на різні подразники, зокрема вірусні та бактеріальні інфекції. Найкраще була досліджена NADPH-оксидаза фагоцитарних клітин, вона складається з мембранної частини флавоцитохрома b_{588} , що, в свою чергу,

утворюється з глікопротеїнів масою 91 кДа і протеїнів масою 22 кДа, фагоцитарних оксидаз (gp91^{phox} і p22^{phox}) та цитоплазматичної частини, що представлена субодинами протеїнів масами 47/40/67 кДа, фагоцитарних оксидаз (p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox}) та GTPаз, які під час активації прямують до цитоплазматичної мембрани, утворюючи із флавоцитохромом b_{558} ензимний комплекс. Варто зазначити, що флавоцитохромом b_{558} містить усі необхідні елементи для утворення супероксиду, проте не може функціонувати без активованих цитозольних субодинамиць [26].

Після активації NADPH-оксидаза використовує цитоплазматичний NADPH як донор електронів. Електрони передаються через послідовність кофакторів, зокрема флавінаденіндинуклеотидів та гемових груп, транспортуючись через мембрану. В результаті цього процесу на зовнішній стороні мембрани відбувається відновлення молекулярного кисню, що призводить до утворення супероксид-радикалу, цей процес можна описати наступною реакцією:



В подальшому супероксид дисмутує на перекис водню [26].

Факторами, що можуть впливати на активацію NADPH-оксидазного комплексу і, відповідно, утворення супероксидного аніону, є цитокіни, фактори росту, зокрема трансформуючий фактор росту- $\beta 1$, інтерлейкін-1, інтерферон- γ , тромбоцитарний фактор росту, епідермальний фактор росту, основний фактор росту фібробластів, інсулін [27].

Ще одним активатором NADPH-оксидазного комплексу може бути Ca^{2+} , в такому разі субодинамиця gp91^{phox} представлена гомологічним варіантом у NADPH-оксидазі 5. Особливістю структури цієї NADPH-оксидази є наявність N-кінцевої ділянки, яка містить мотив типу «EF-hand», що зв'язує іони Ca^{2+} [26].

Факторами, що можуть впливати на утворення АФК, є перехідні метали, до прикладу у реакції Фентона – шлях розпаду перекису водню за дії солей заліза з утворенням гідроксильного радикалу [28].

Різнманітні хімічні сполуки також можуть бути індукторами утворення АФК, зокрема тютюновий дим. Він є власне джерелом АФК, хоча їхня кількість, що долає клітинні мембрани, є незначною, також він містить певні ліпофільні речовини, які можуть впливати на роботу мітохондрій, і у такий опосередкований спосіб спричиняти оксидативний стрес [29].

Часто малігнізація клітин може виникати під дією постійного подразнення, інфекційного процесу, зокрема запалення, останнє називають критичним компонентом прогресування пухлини. Макрофаги ж можуть індукувати гіперпродукцію АФК в пухлинних клітинах для їхнього знищення, секретуючи фактор некрозу пухлини- α [30]. Крім того, макрофаги після активування можуть генерувати інший клас реактивних сполук, активних форм нітрогену (АФН), оксид нітрогену (I), що може прореагувати з $O_2^{\bullet -}$ з утворенням пероксинітриту, АФН, що подібна за своїми властивостями до гідроксильних радикалів, відомі своєю здатністю ініціювати апоптоз клітини [31]. Таким чином, розвиток запального процесу може впливати на утворення АФК/АФН.

Отже, існує ціла низка механізмів для продукції АФК у відповідь на різнманітні чинники, зокрема клітинне дихання, вплив хімічних речовин, в тому числі й ендогенного походження, постійне подразнення тканин тощо. Неостанню роль в синтезі АФК відіграє родина NADPH-оксидаз, на активність якої потенційно може впливати адаптерний протеїн Ruk/CIN85, що створює простір для досліджень залежності рівнів АФК від рівня експресії Ruk/CIN85.

1.3. АФК-залежне регулювання сигнальних шляхів у пухлинних клітинах

Помірні рівні АФК є важливими для гомеостазу еукаріотичних клітин, вони можуть виступати в ролі вторинних месенджерів і брати участь в різноманітних клітинних процесах [1]. До прикладу АФК регулюють клітинні функції через окислення чутливих до редокс-потенціалу залишків цистеїну певних ензимів. Це особливо добре вивчено на прикладі тирозинових фосфатаз, таких як фосфатаза-гомолог тензину, що делетована в хромосомі 10, білок клітинного поділу 25С, тирозинова фосфатаза 1В, а також тирозинові фосфатази з низькою молекулярною масою, які, в свою чергу, контролюють рівень фосфорилування сигнальних протеїнів й впливають на процеси росту, виживання, метаболізму та рухливості клітин [32]. Окиснення залишків цистеїну в каталітичних центрах фосфатаз призводить до їхньої інактивації, що підсилює фосфорилування протеїнів тирозинкіназами і індукції клітинних сигналів.

Також в ході попередніх експериментів було досліджено, що обробка клітин перекисом водню збільшувала фосфорилування протеїнкінази р38, що сприяло її подальшій активації [33].

Є припущення, що АФК, утворені NADPH-оксидазою, відіграють роль у регуляції йонних каналів, зокрема K^+ -та- Ca^{2+} -каналів, як на плазматичній мембрані, так і всередині клітини. Наприклад, у нейронах ангіотензин II здатний підвищувати рівень Ca^{2+} та знижувати потік K^+ через механізми, пов'язані з NADPH-оксидазами, хоча докази цього механізму ще відсутні через відсутність відповідних моделей досліджень, які могли б бути NADPH-оксидазодефіцитними [34].

Дослідження показують, що АФК можуть викликати апоптоз у ракових клітинах. Крім того, виявлено, що підвищений рівень АФК асоціюється зі зниженням проліферації трансформованих клітин, а також зменшенням ангіогенезу та метастазування пухлин [35]. При чому дія АФК залежить від

їхньої природи: O^{2-} і H_2O_2 можуть пригнітити інвазію і міграцію клітин карциноми легень людини H460, в той час як $\bullet OH$ їх підвищує [36].

Варто зауважити, що хоча високі рівні АФК є надзвичайно токсичними для усіх клітин, у тому числі для пухлинних, проте концентрація АФК вище фізіологічної може сприяти канцерогенезу, викликаючи мутації онкогенів та генів пухлинних супресорів [37].

Окремо варто виділити важливий взаємозв'язок між АФК та автофагією. Автофагія – це катаболічний процес видалення пошкоджених та дефектних клітинних матеріалів через лізосоми. Вона разом з посиленою продукцією АФК вмикається у відповідь на стресові умови, такі як гіпоксія, дефіцит поживних речовин або хіміотерапія [38]. В свою чергу накопичені АФК можуть активувати транскрипційні фактори: протеїн p53, перший фактор, індукований гіпоксією, ядерний фактор, подібний до еритроїдного фактора 2, а також транскрипційні фактори сімейства «forkhead box», які в свою чергу можуть активувати фактори автофагії. [7].

Порушення регуляції автофагії через делецію певних специфічних протеїнів (Беклін-1, Білок 1, асоційований з мікротрубочками з легким ланцюгом 3В (LC3В)), відповідальних за цей процес, сприяє накопиченню пошкоджених мітохондрій та локальному вивільненню мітохондріальних АФК. Додатково це провокує запальні реакції, які тісно пов'язані зі зростанням рівня цитокінів, зокрема інтерлейкіну-1 бета та інтерлейкіну-18 [39].

Також певні онкогени, зокрема гомолог вірусного онкогена саркоми щурів Кірстена (K-RAS) та клітинний онкоген мієлоцитоматозу (c-MYC), індуюють утворення внутрішньоклітинних АФК для посилення проліферації пухлинних клітин. Зокрема дослідження клітин з мутатним варіантом K-RAS встановило, що пригнічення АФК за допомогою антиоксидантів знижує, спричинене цією мутацією, утворення 5-го та 7-го протеїнів, пов'язаних з автофагією (Atg5 та Atg7), а також гальмує саму автофагію та ріст ракових клітин. Крім того, K-RAS сприяє генерації АФК у позаклітинному просторі

шляхом підвищення активності ферментів родини NADPH-оксидаз на мембрані пухлинної клітини [40].

Проте інше дослідження встановило, що застосування рапаміцину (інгібітора ферменту mTOR) у комбінації з блокатором протеїну теплового шоку 90 (Hsp90) спричиняє зменшення пухлини, і такий ефект досягається шляхом стимуляції мітохондріальних пошкоджень, окислювального стресу та автофагії при мутантному раку легень K-RAS/p53 [41].

Тобто існує ціла низка механізмів трансдукції клітинних сигналів, в яких беруть участь АФК, проте ця тема потребує поглиблення, встановлення усіх зв'язків для подальшого використання АФК як вторинних месенджерів для різних потреб.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали дослідження

У ході роботи було використано наступні реагенти:

Середовище Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI) («Gibco», США), ембріональна сироватка теляти («HyClone», США), суміш стандартних антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину («Gibco», США), фосфатний буферний розчин (PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, pH 7,4)), розчин трипсину, середовище ігла в модифікації Дульбекко, 2×HEPES Buffered Saline (HBS) (1,5 мМ Na₂HPO₄, 274 мМ NaCl, 54,6 мМ 4-(2 гідроксиетил) піперазин-1-етансульфонієва кислота (HEPES), pH 7,0, 2 М хлорид кальцію, антибіотик генетицин (G418) («Sigma», США) та пуроміцин («Sigma», США), апоцинін («Sigma», США), флуоресцентний зонд CM-H₂DCF–DA (Invitrogen™, Life Technologies, США), пропідій йодид (PI) (Invitrogen™, Life Technologies, США), фосфатно-сольовий буфер Дульбекко (DPBS) із кальцієм та магнієм (Invitrogen™, Life Technologies, США), трипсин-етилендіамінтетраоцтова кислота (0,05% / 0,02% у PBS) (PAA Laboratories GmbH, Німеччина), збалансований сольовий розчин Хенка (Invitrogen™, Life Technologies, США), пероксидаза хрому (HRP), акутаза, люмінол, буфер лізису (50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1 мМ ортованадат натрію, 50 мМ NaF, 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл пепстатину, 60 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину), комерційний набір для вимірювання вмісту протеїнів у лізаті Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), буфер Леммлі (62,5 мМ Трис- HCl, pH 6,8, 1 мМ ЕДТА, 2% ДСН, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,4% бромфеноловий синій),

4,5% концентруючий гель (1,3 мл буфер А (3М Трис-НСl, рН 8,8), 1,7 мл суміш 30% акриламід/0,8% метиленбісакриламід, 1,9 мл dist H₂O, 50 мкл 10% додецилсульфат натрію (ДСН), 50 мкл 10% персульфат амонію, 5 мкл 10 % тетраметилетилендіамін), 10 % розділяючий гель (393 мкл буфер Б (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8), 515 мкл суміш 30% акриламід / 0,8% метиленбісакриламід, 575 мкл dist H₂O, 15 мкл 10% ДСН, 15 мкл 10% персульфат амонію, 1,5 мкл 10 % тетраметилетилендіамін), електродний буфер (25 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН), нітроцелюлозна мембрана, буфер для трансферу (25 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол), блокувальний розчин (5% знежирене сухе молоко, 0,05 % Твін-20, PBS, рН 7,4), первинні антитіла до факторів автофагії ATG 5 (Invitrogen™, Life Technologies, США), LC3B (Abcam, Cambridge, UK), Beclin-1 (Abcam, Cambridge, UK), розчин для промивки (0,1% Твін-20, PBS), вторинні антитіла (антикролячі) кон'юговані з пероксидазою хрому, розчин для проявки (0,1 М Трис-НСl, рН 8,3, 0,25 М розчин люмінолу в диметилсульфоксиді, 0,9 мМ розчин кумарової кислоти в диметилсульфоксиді, 0,0035% H₂O₂), комерційний набір для проявлення плівки, світлочутлива плівка.

Також були використані такі генетичні конструкції:

Плазміда pRc/CMV2-Rukl, яка кодує повнорозмірну форму Ruk/CIN85, лентивірусний вектор, що кодує специфічну до Ruk/CIN85 shRNA, створений на основі конструкції pLKO.1-shRuk/CIN85 R22.

2.2. Культивування аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1

Для проведення експерименту використовувались клітинна лінія 4T1 – клітинна лінія отримана з аденокарциноми грудної залози миші, яка фактично є моделлю раку молочної залози людини IV стадії. Культуральне середовище було виготовлено на основі RPMI 1640 (Gibco), з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (HyClone, США), 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну. Культивування клітин проводилось у термостатах за температури 37°C та 5% CO₂ в чашках Петрі діаметром 6 і 9 см. Кожні 2-3 дні культури пасажували у нові середовища.

Для проведення експерименту використовувались клітинна лінія 4T1 – клітинна лінія отримана з аденокарциноми грудної залози миші, яка фактично є моделлю раку молочної залози людини IV стадії. Культуральне середовище було виготовлено на основі RPMI 1640 (Gibco), з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки (HyClone, США), 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну. Культивування клітин проводилось у термостатах за температури 37°C та 5% CO₂ в чашках Петрі діаметром 6 і 9 см. Кожні 2-3 дні культури пасажували у нові середовища.

Для досліджень клітини 4T1 модифікували для збільшення та зменшення експресії Ruk/CIN85. Для надекспресії цього протеїну клітини трансфікували методом кальцій-фосфатної трансфекції плазмідною pRc/CMV2-Rukl, яка кодує повнорозмірну форму Ruk/CIN85, в якості контролю паралельно модифікували іншу групу клітин вектором без вставки, що кодує Ruk/CIN85. Для пригнічення експресії протеїну Ruk/CIN85 клітини лінії 4T1 трансдукували лентивірусом на основі конструкції pLKO.1-shRuk/CIN85 R22, що кодує специфічну до Ruk/CIN85 shRNA. Як контроль було використано клітини 4T1, інфіковані лентивірусним вектором, який містить контрольну shRNA, що не має гомології з жодною відомою послідовністю в геномі ссавців. Відбір успішно трансдукованих клітин

здійснювали шляхом культивування у середовищі з додаванням пуроміцину (10 мкг/мл, «Sigma», США) [42]. Після селекції клітини субклонували та за допомогою додаткових аналізів встановили клітинну сублінію, здатну стабільно гіперекспресувати Ruk/CIN85, яка була названа RukUp, і відповідний контроль – група Mock, та клітинну лінію зі зниженою експресією Ruk/CIN85 – RukDown і його відповідний контроль – Scr.

2.3. Аналіз продукування АФК сублініями аденокарциномних клітин грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

2.3.1. Аналіз АФК в пухлинних клітинах хемілюмінесцентним методом

Для визначення інтенсивності продукування АФК пухлинними клітинами використали метод хемілюмінесценції з застосуванням люмінолу [43]. Хемілюмінесценція є методом надчутливого хімічного аналізу, в основі якого лежить перенесення енергії хімічної реакції на специфічні молекулярні системи, що викликає їхнє збудження та подальше випромінювання фотонів. Метод хемілюмінесценції почав стрімко розвиватися завдяки можливості значного посилення сигналу, що в свою чергу суттєво підвищує його чутливість. В основі високої чутливості цього методу лежить реакція окиснення люмінолу за участю H_2O_2 , яку каталізує пероксидаза хрому (HRP) [44].

Завдяки тому, що хемілюмінесценція здебільшого є результатом окиснювальних реакцій, вона відбувається швидко, а отже, ідеально підходить для фіксації короткоживучих АФК. Крім цього, відсутність фонового лазерного збудження забезпечує високе співвідношення «сигнал-шум» [44].

Для проведення аналізу продукування АФК хемілюмінесцентним методом клітини вирощували до 80% конфлюенту. Наступним кроком клітини були оброблені розчином акутази протягом 1 хв та в подальшому промиті PBS. Далі клітини осаджували центрифугуванням (1000 g протягом 5 хв) та ресуспендували в холодному збалансованому сольовому розчині Хенка (Invitrogen™, Life Technologies, США).

Потім клітини висівали в кожну лунку 96-лункового планшета у кількості 2×10^5 . До кожної лунки додавали 250 мкМ люмінолу та 1 од. HRP.

Хемілюмінесценцію вимірювали протягом 30 хв з інтервалом 1 хв за допомогою люмінометра FLx800 (BioTek, США) через 5 хв після додавання суміші HRP та люмінолу.

2.3.2. Аналіз АФК в пухлинних клітинах протоковою цитофлуориметрією

Цитофлуориметрія – це метод, який дає змогу швидко аналізувати окремі клітини або частинки, коли вони рівномірно проходять крізь лазерний промінь у потоці розчину. Під час аналізу вимірюється розсіювання світла та флуоресцентні характеристики частинок. Світло розсіюється у двох напрямках: прямо (FSC), що дає уявлення про відносний розмір клітини; і під кутом 90° (SSC), що відображає складність її внутрішньої структури або гранулярність. Варто зазначити, що розсіювання світла не залежить від флуоресцентних властивостей клітини [45].

Для виявлення АФК у клітинах застосовували флуоресцентний зонд CM-H₂DCF–DA. Під час окиснення АФК нефлуоресцентний CM-H₂DCF–DA перетворюється на високо флуоресцентний 2', 7'-дихлорофлуоресцеїн (DCF). Також до суспензії клітин додавали PI, адже важливо досліджувати рівні АФК саме живих клітин, тобто тих, що будуть PI-негативні. PI збуджується при взаємодії з хвилею довжиною 535 нм і максимально випромінює хвилі

довжиною 617 нм. Завдяки цим спектральним характеристикам PI можна використовувати в комбінації з іншими флуоресцентними зондами, такими як CM-H₂DCFDA, збудження цього зонду виникає за 492-495 нм, а випромінювання – 517-527 нм. Для збудження PI і CM-H₂DCFDA застосовували лазер з довжиною хвилі 488 нм (блакитний), а для детекції флуоресценції PI смуговий фільтр 610/20 нм, відповідний канал детекції ECD, для CM-H₂DCFDA фільтр 525/40 нм – канал FITC. Щоб встановити залежність між експресією Ruk/CIN85 і продукцією АФК NADPH-оксидазою у досліді використовувався апоцинін – інгібітор збирання NADPH-оксидазного комплексу.

Перед початком заміру клітини висівали на шестишункові планшети у щільності близько $2,5 \times 10^5$ клітин на лунку у культуральне середовище. Через 24 год до тестових культур додавали 50; 100; 200 мкМ апоциніну. За досягнення 90% конфлюентності, ще через 24 год, клітини промивали теплим розчином DPBS із кальцієм та магнієм (Invitrogen™, Life Technologies, США), для отримання суспензії клітин вихідні культури у лунках трипсинізували: додали по 250 мкл трипсину-етилендіамінтетраоцтової кислоти (0,05% / 0,02% у PBS) (PAA Laboratories GmbH, Німеччина). Щоб зупинити дію трипсину додали по 1 мл культурального середовища. Згодом клітини ресуспендували. Наступним кроком отримані суспензії збирали у 5 мл полістиролові пробірки з округлим дном, які центрифугували 5 хв при 200 g за кімнатної температури, супернатант видаляли, а осад промивали 4 мл DPBS та повторювали процедуру центрифугування. Ресуспендували осад у збалансованому сольовому розчині Хенка (Hank's Balanced Salt Solution) (Invitrogen™, Life Technologies, США) із 10 мкмоль/л CM-H₂DCFDA (Invitrogen™, Life Technologies, США). Далі клітини інкубували за температури 37°C, 95% вологості, 5% CO₂ у темряві протягом 45 хв. Після інкубації безпосередньо перед аналізом до пробірок додавали 0,5 мкл/0,5 мл PI (Invitrogen™, Life Technologies, США) та поміщали пробірки на лід у темряву.

Зразки аналізували за допомогою приладу DxFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter Biotechnology, Китай) у програмному забезпеченні CytExpert for DxFLEX, оцінюючи параметри FSC, SSC, ECD, FITC [46].

Аналізу підлягали живі клітини, тому для початку за допомогою інструменту «Lasso» була виділена популяція PI-негативних клітин. Утворенні графіки залежностей параметрів FSC, SSC, FITC аналізували за допомогою інших інструментів для створення гейтів: «Line segment», «Verticle».

2.4. Вестерн-блот аналіз лізатів клітин 4T1

Вестерн-блот є одним з аналітичних методів, що дозволяють кількісно та якісно визначати специфічні протеїни, посттрансляційні модифікації або протеїнові комплекси у розчинах лізатів клітин.

Його механізм складається з трьох основних етапів. Першим є розділення суміші протеїнів у розчині за молекулярною масою за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Наступним етапом є перенесення протеїнів з гелю на твердий носій – нітроцелюлозну або полівініліденфторидну мембрану. Останнім кроком є детекція протеїнів на мембрані за допомогою специфічних антитіл, які зв'язуються з цільовими молекулами. Для візуалізації результатів застосовують різні системи детекції: ферментативне утворення забарвлених продуктів чи світла (хемілюмінесценція), або ж можливе використання антитіл, безпосередньо кон'югованих із флуоресцентними мітками [47].

2.4.1. Отримання лізатів клітин

Для отримання лізатів клітин культури аденокарциноми грудної залози миші 4T1 використовувався буфер для лізису (50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон Х-100, 1 мМ ортованадат натрію, 50 мМ NaF, 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл пепстатину, 60 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину). Клітини інкубували у буфері лізису протягом 20 хв у холоді. Наступним кроком нерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням 10000 g протягом 30 хв, після чого відбирали супернатант.

Далі вимірювали вміст протеїнів у лізаті за допомогою комерційного набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Після чого лізати клітин прогрівали за температури 95°C протягом 5 хв у буфері для зразків Леммлі (62,5 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ ЕДТА, 2% ДСН, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0,4% бромфеноловий синій). Виготовлені лізати заморозили і зберігали за температури -70°C.

2.4.2. Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі та Вестерн-блот аналіз

Для проведення електрофорезу протеїнів в поліакриламідному гелі було використано камеру для вертикального гель-електрофорезу (BioRad, США) з використанням джерела живлення PowerPac Universal (BioRad, США). Для розділення застосовано 4,5% концентруючий гель (1,3 мл буфер А (3М Трис-НСl, рН 8,8), 1,7 мл суміш 30% акриламіду/0,8% метиленбісакриламіду, 1,9 мл dist H₂O, 50 мкл 10% додецилсульфат натрію (ДСН), 50 мкл 10% персульфат амонію, 5 мкл 10 % тетраметилетилендіамін) та 10 % розділяючий гель (393 мкл буфер Б (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8), 515 мкл суміш 30% акриламіду/0,8% метиленбісакриламіду, 575 мкл dist H₂O,

15 мкл 10% ДСН, 15 мкл 10% персульфат амонію, 1,5 мкл 10 % тетраметилетилендіамін). Під час розділення використали електродний буфер (25 мМ Трис-НСІ, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН) та напругу 14 мА для концентрування, 30 мА для розділення. Клітинні лізати наносили мікрошприцом на дно комірок концентруючого гелю в кількості 30 мкг протеїну на доріжку.

Після електрофоретичного розділення суміші протеїнів лізатів, їх перенесли на нітроцелюлозну мембрану. Для цього попередньо мембрану замочили у буфері для трансферу (25 мМ Трис-НСІ, рН 8,3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол) протягом 10 хв. Переніс здійснили у камері для переносу (BioRad, США) за сили струму 250 мА з використанням джерела живлення PowerPac Universal (BioRad, США). Наступним кроком мембрану заблокували у блокувальному розчині (5% знежирене сухе молоко, 0,05 % Твін-20, PBS, рН 7,4). Далі нанесли первинні антитіла до фактора автофагії ATG 5 (Invitrogen™, Life Technologies, США), LC3B (Abcam, Cambridge, UK), Beclin-1 (Abcam, Cambridge, UK) у розведенні 1:1000, промили розчином для промивки (0,1% Твін-20, PBS). Згодом мембрану інкубували з вторинними антитілами (антикролячі) кон'юговані з пероксидазою хрому, в розведенні 35:100000. Після інкубування з вторинними антитілами також здійснили промивку.

Для проявлення блотів мембрану обробили розчином для проявки (0,1 М Трис-НСІ, рН 8,3, 0,25 М розчин люмінолу в диметилсульфоксиді, 0,9 мМ розчин кумарової кислоти в диметилсульфоксиді, 0,0035% H_2O_2) та накрили світлочутливою плівкою протягом 2-5 хв у темній кімнаті. Плівку проявили у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику і фіксували кислим фіксажем.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Морфологічна характеристика модифікованих субліній культури клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85

Попередні дослідження демонструють, що Ruk/CIN85 може впливати на ріст та поділ клітин [5, 6], що, в свою чергу, може впливати на морфологічні ознаки клітинних культур.

За даними фазово-контрастної мікроскопії культура клітин сублінії з підвищеною експресією Ruk/CIN85 (RukUp) порівняно з контрольною групою (Mock) менш однорідна, містить більшу частку округлих та ізольованих клітин, нехарактерних для лінії клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1, веретеноподібні клітини RukUp мають більш видовжену форму зі зменшеною кількістю відростків (рис. 3.1, А – Б).

Відповідно до результатів фазово-контрастної мікроскопії сублінія клітинної культури зі зниженою експресією Ruk/CIN85 (RukDown) порівняно з контрольною групою (Scr) містить менш видовжені клітини, що щільніше прилягають одна до одної та мають форму багатокутників, що нагадує епітеліоподібну морфологію (рис. 3.1, В – Г).

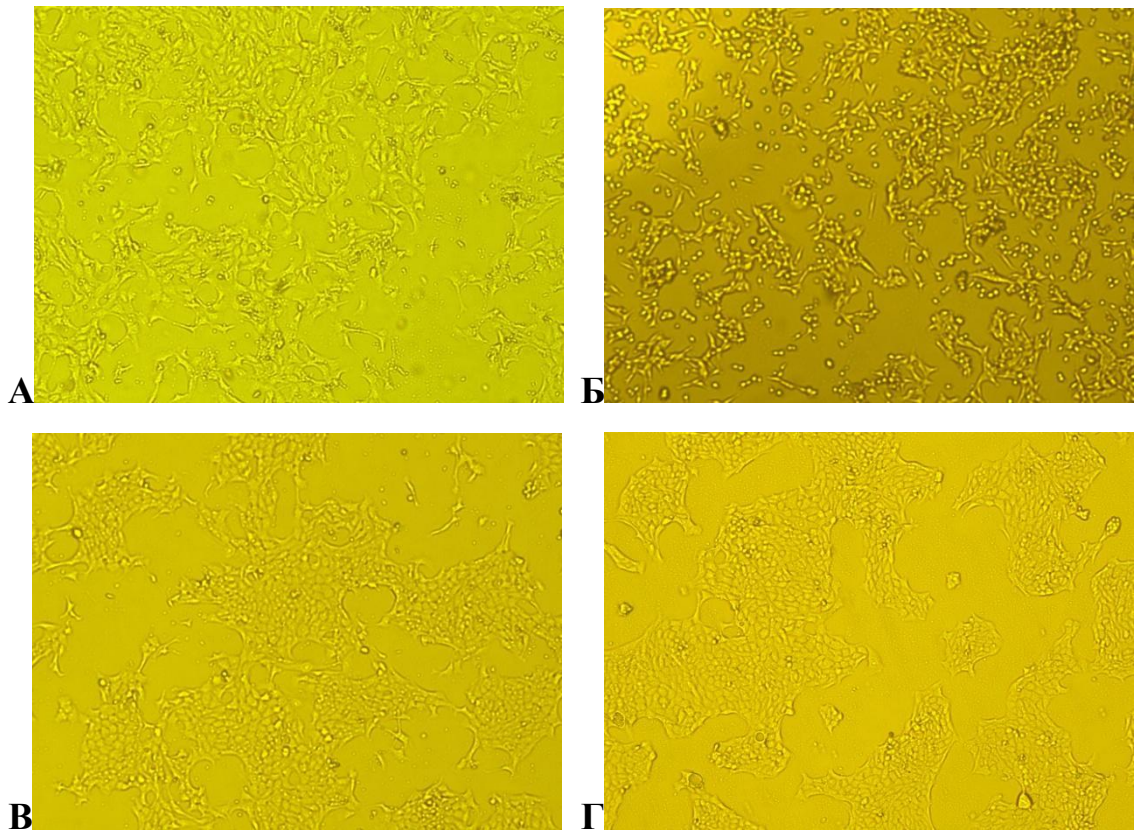


Рис. 3.1. Мікрофотографії клітинних субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1. А – сублінія Mock, Б – сублінія RukUp, В – сублінія Scr, Г – сублінія RukDown (інвертований мікроскоп Olympus; Об.×4, Ок.×10)

Відповідно до результатів, отриманих за допомогою фазово-контрастної мікроскопії клітинних субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1, через 24 год після внесення апоциніну (інгібітора збірки NADPH-оксидазного комплексу) концентрацією 200 мкМ, можна зробити висновок, що апоцинін несуттєво впливає на морфологію клітин контрольної сублінії Mock (рис. 3.2, А) (порівняно з клітинами, інкубованими лише в середовищі культивування (див. рис. 3.1, А), проте у культурі сублінії RukUp (рис. 3.2, Б) внаслідок внесення апоциніну різко зменшилась частка класичних для культури клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 фібробластоподібних клітин, натомість з'явилося більше округлих ізольованих (порівняно з клітинами, інкубованими лише в середовищі

культивування (див. рис. 3.1, Б). Що підтверджує дані про взаємозв'язок Ruk/CIN85 з NADPH-оксидазою [2].

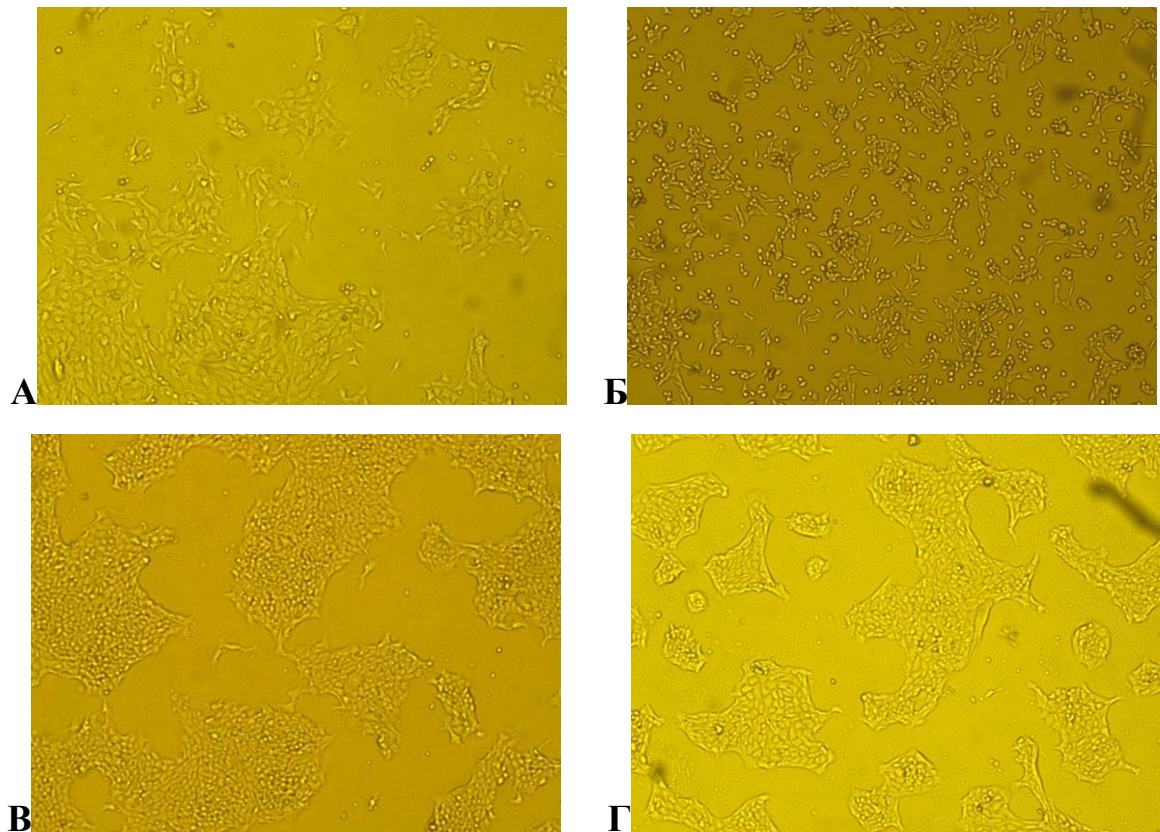


Рис. 3.2. Мікрофотографії клітинних субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1 через 24 год після внесення апоциніну концентрацією 200 мкМ. А – сублінія Mock, Б – сублінія RukUp, В – сублінія Scr, Г – сублінія RukDown (інвертований мікроскоп Olympus; Об.×4, Ок.×10)

У свою чергу інкубування сублінії RukDown та його контролю Scr з апоциніном не спровокувало видимого ефекту (рис. 3.2, В, Г) порівняно з клітинами субліній, що були інкубовані лише у середовищі культивування (див. рис. 3.1, В, Г).

3.2. Рівень продукування АФК сублініями аденокарциномних клітин грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Як вже було згадано раніше, рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 впливає на продукування АФК, зокрема H_2O_2 , у пухлинних клітинах [2]. Щоб встановити цей зв'язок у клітинах аденокарциноми грудної залози миші 4T1 було проведено аналіз продукування АФК в пухлинних клітинах хемілюмінесцентним методом та протоковою цитофлуориметрією.

3.2.1. Аналіз продукування АФК в пухлинних клітинах хемілюмінесцентним методом

Реакція окиснення люмінолу під дією пероксидази та АФК, зокрема H_2O_2 , дозволяє фіксувати хемілюмінесцентний сигнал, який є пропорційним до позаклітинної кількості АФК у суспензії клітин. Таким чином, було встановлено, що посилення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози миші 4T1 (RukUp) сприяє вищим рівням утворення АФК у позаклітинне середовище (рис. 3.3). На противагу, зниження експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у пухлинних клітинах аденокарциноми грудної залози миші 4T1 (RukDown) призвело до зниження генерації АФК у позаклітинний простір (див. рис. 3.3).

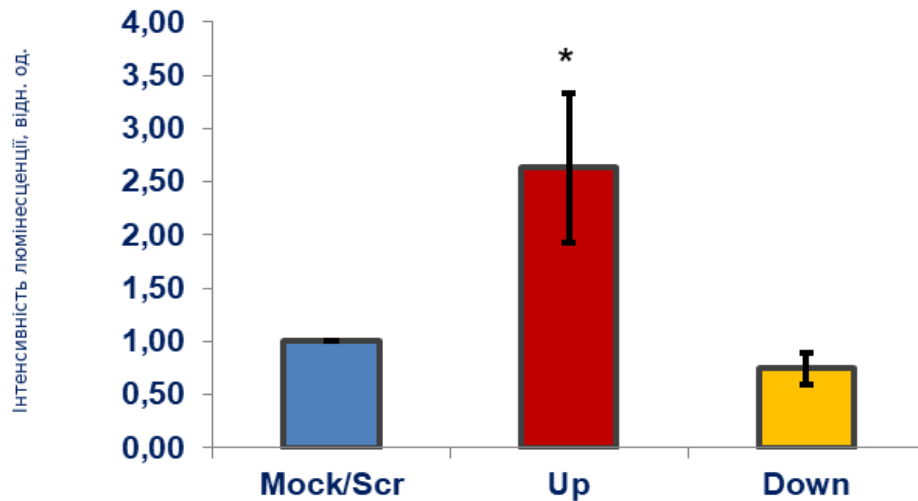


Рис. 3.3. Рівень позаклітинних АФК, оцінених за інтенсивністю хемілюмінесцентного сигналу, продукованих сублініями клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1 із різним рівнем адаптерного протеїну Ruk/CIN85: RukUp та RukDown і відповідних контролей Mock та Scr

* – різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

Аналіз динаміки хемілюмінесцентного сигналу в часі демонструє, що виявлені відмінності у рівнях АФК не є наслідком відтермінованості протікання реакції. Стабільне розходження кривих інтенсивності хемілюмінесценції протягом усього періоду спостереження однозначно вказує на реальну різницю в продукуванні АФК у позаклітинне середовище між контрольними клітинами та сублініями зі підвищеним (рис. 3.4, А) або зниженим (рис. 3.4, Б) рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

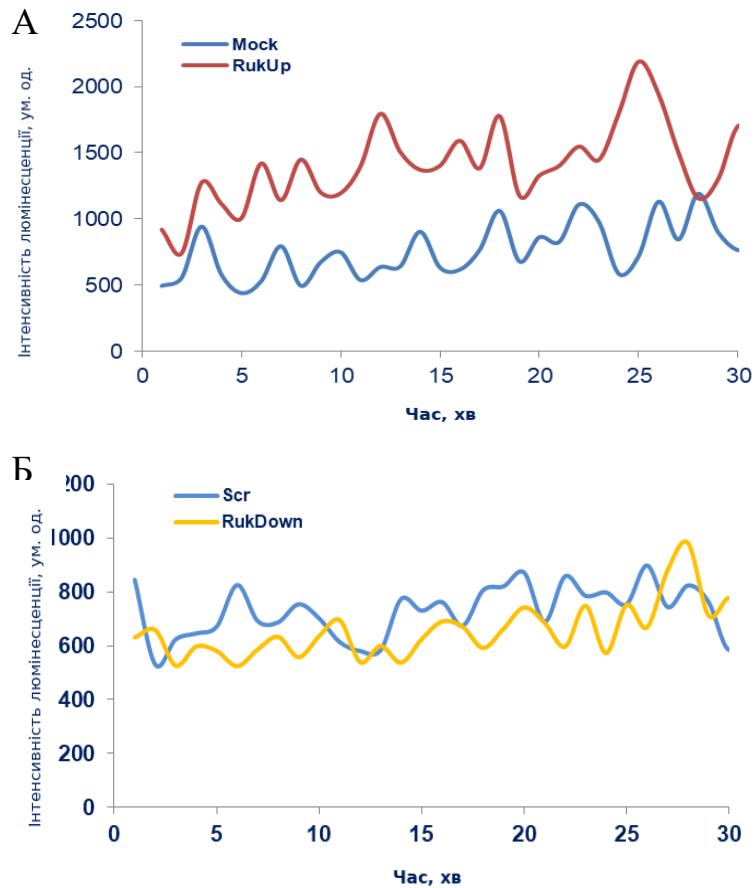


Рис. 3.4. Динаміка хемілюмінесцентного сигналу, що відображає рівень АФК сублінії RukUp порівняно з контролем Mock (А), у сублінії RukDown порівняно з контролем Scr (Б)

* – різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

Для встановлення джерела збільшеного продукування АФК, внаслідок гіперекспресії Ruk/CIN85, було використано інгібітор збірки NADPH-оксидазного комплексу апоцинін. На рис. 3.5 продемонстровано, що внесення апоциніну до суспензії клітин RukUp дозозалежно знижує утворення АФК у позаклітинне середовище. З цього можна зробити висновок, що підвищений рівень генерації АФК у позаклітинне середовище в клітинах аденокарциноми грудної залози миші 4Т1 відбувається за участю NADPH-оксидази.

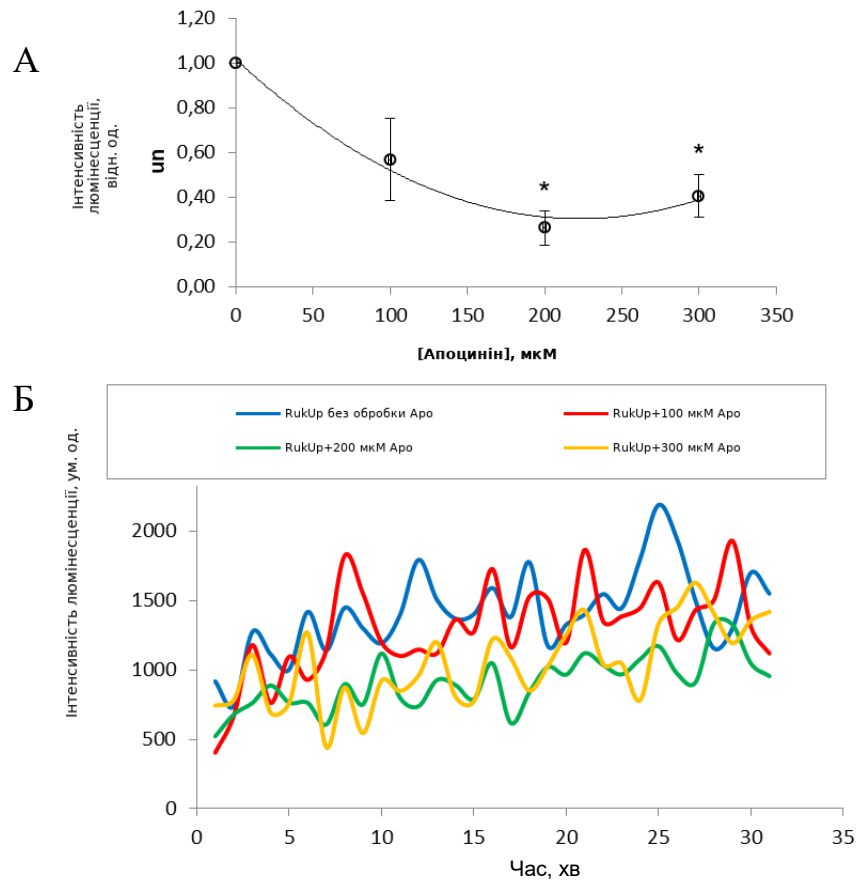


Рис. 3.5. Залежність продукування АФК у позаклітинне середовище від концентрації апоциніну в клітинах RukUp: А – середні значення інтенсивності хемілюмінесценції, Б – динамічні показники хемілюмінесцентного сигналу

* – різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

Варто зазначити, що за концентрації апоциніну більш ніж 200 мкМ продукція АФК знову зростала, ймовірно це може бути пов'язаним з увімкненням певних компенсаторних механізмів у клітинах.

3.2.2. Аналіз продукування АФК в пухлинних клітинах протоковою цитофлуориметрією

Внесення зонду CM-H₂DCFDA до культури клітин дозволяє оцінити рівні АФК у клітинах відповідно до інтенсивності флуоресценції у каналі FITC-A. На рис. 3.6 можна дослідити чітку тенденцію: внесення зонду спричиняє посилення флуоресцентного сигналу FITC-A та збільшення частки клітин субпопуляції RukUp з високими рівнями інтенсивності флуоресценції з 67,21% до 79,19%, внаслідок детекції АФК. Інкубування з апоциніном знижує флуоресцентний сигнал, та зменшує частку клітин з високими рівнями АФК до 72,55%.

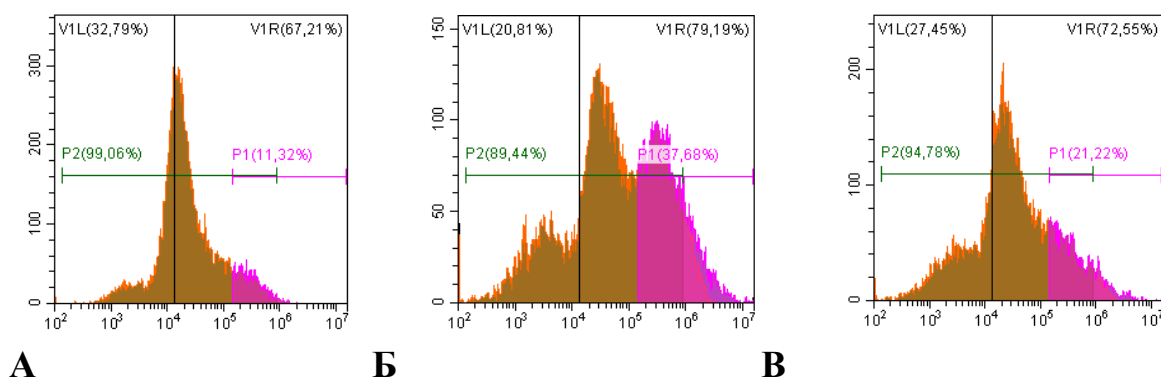


Рис. 3.6. Гістограми розподілу клітинних субліній 4T1 RukUp аденокарциноми грудної залози миші щодо інтенсивності флуоресценції FITC-A: А – клітини, інкубовані у середовищі культивування без забарвлення; Б, В – клітини, інкубовані у середовищі культивування з додаванням зонду CM-H₂DCFDA (Б – без апоциніну; В – з 50 мкМ апоциніном)

Аналіз цієї популяції за параметрами розміру (FSC) та гранулярності (SSC) (рис. 3.7) демонструє наявність двох субпопуляцій у дослідних зразках, одна з яких візуалізується за появи зонду CM-H₂DCFDA і відповідає гейту P1 (див. рис. 3.6). Після інкубування клітин з апоциніном продукція АФК субпопуляції P1 дозозалежно знижується.

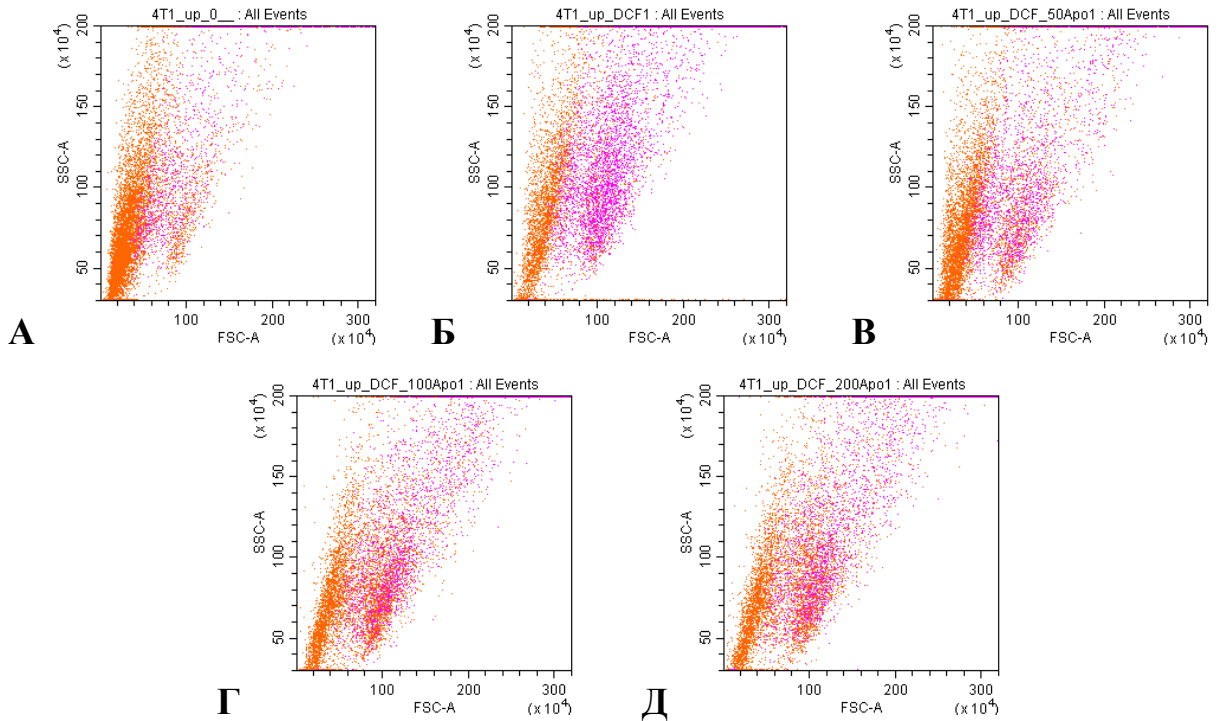


Рис. 3.7. Двовимірні діаграми розсіювання за розміром (FSC) та гранулярністю (SSC) клітинних субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1 RukUp: А – клітини, інкубовані у середовищі культивування без фарбування; Б-Д – клітини, інкубовані у середовищі культивування з додаванням зонду CM-H₂DCFDA (Б – без апоциніну; В – з 50 мкМ апоциніном; Г – з 100 мкМ апоциніном; Д – з 200 мкМ апоциніном)

Вищезазначена тенденція спостерігається також у клітинній сублінії Моск (рис. 3.8). Проте в порівнянні з даними досліджень RukUp (див. рис. 3.8) дія апоциніну на продукцію АФК є менш вираженою.

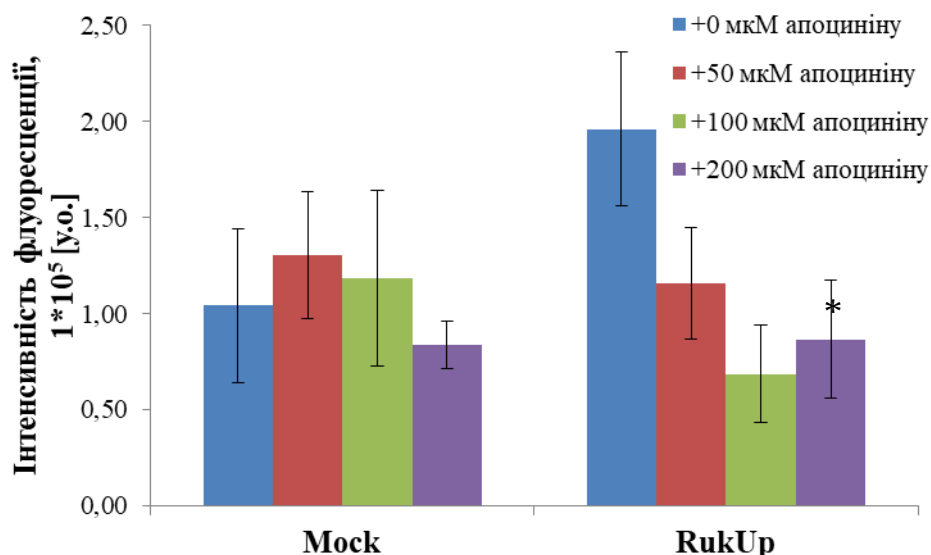


Рис. 3.8. Інтенсивність флуоресцентного сигналу каналу FITC-A залежно від концентрації апоцинину у сублінії аденокарциноми грудної залози миші 4T1 RukUp та контролю Mock

* – різниця статистично значуща за $p \leq 0,05$

Слід зауважити, що дія інгібітора є дозозалежною, але за концентрації апоцинину 200 мкМ генерація АФК знову посилюється, що узгоджується з результатами хемілюмінесцентного аналізу. Цей ефект знову, як і раніше, наштовхує на припущення про увімкнення певних компенсаторних механізмів у клітинах.

Отже, отримані результати демонструють, що підвищена експресія Ruk/CIN85 у клітинній сублінії RukUp аденокарциноми грудної залози миші 4T1 безпосередньо збільшує частку утворення АФК NADPH-оксидазним комплексом.

3.3. Результати Вестерн-блот аналізу факторів автофагії в лізатах клітин субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Як вже було згадано раніше між АФК і автофагією існують певні взаємозв'язки, які відіграють залежну від контексту роль у виживанні та прогресії пухлинних клітин [7, 39]. Враховуючи цей зв'язок, для комплексної оцінки автофагічного процесу в досліджуваних сублініях аденокарциномних клітин грудної залози миші 4T1 необхідно було проаналізувати вміст ключових протеїнів-регуляторів.

До прикладу одним з них є Beclin-1, який відіграє критичну роль на початкових етапах процесу автофагії – формуванні автофагосом. Цей протеїн діє як пухлинний супресор, а його втрата тісно пов'язана зі злоякісною трансформацією [48].

В свою чергу ATG5 є ключовим компонентом комплексу, необхідного для елонгації мембрани автофагосом. Цей протеїн виконує подвійну функцію, беручи участь як у регуляції автофагії, так і в індукції апоптозу. Також попередніми дослідженнями було встановлено, що онкогени (зокрема, K-RAS та c-MYC) індукують внутрішньоклітинні АФК для сприяння проліферації ракових клітин. У цьому процесі автофагія відіграє пухлино-стимулюючу роль і окислювальний стрес, спричинений онкогенами, викликає гіперекспресію протеїнів ATG5 та ATG7, що в свою чергу індукують автофагію та підтримує неконтрольований ріст пухлини [49].

Протеїн LC3 є завершальним компонентом формування автофагосом, після його приєднання до комплексу ATG5 та ATG7 автофагосоми зливаються з лізосомами, утворюючи автолізосоми, де відбувається деградація вмісту [50].

Результати Вестерн-блот аналізу продемонстрували залежність вмісту фактора ATG5 від рівня адаптерного протеїну Ruk/CIN85. У сублінії клітин RukUp було встановлено помітне підвищення базового рівня ATG5

порівняно з клітинами відповідного контролю Mock. Водночас, зниження експресії Ruk/CIN85 (у сублінії RukDown) не призвело до очікуваного падіння рівня фактора елонгації автофагії (рис. 3.9, Б).

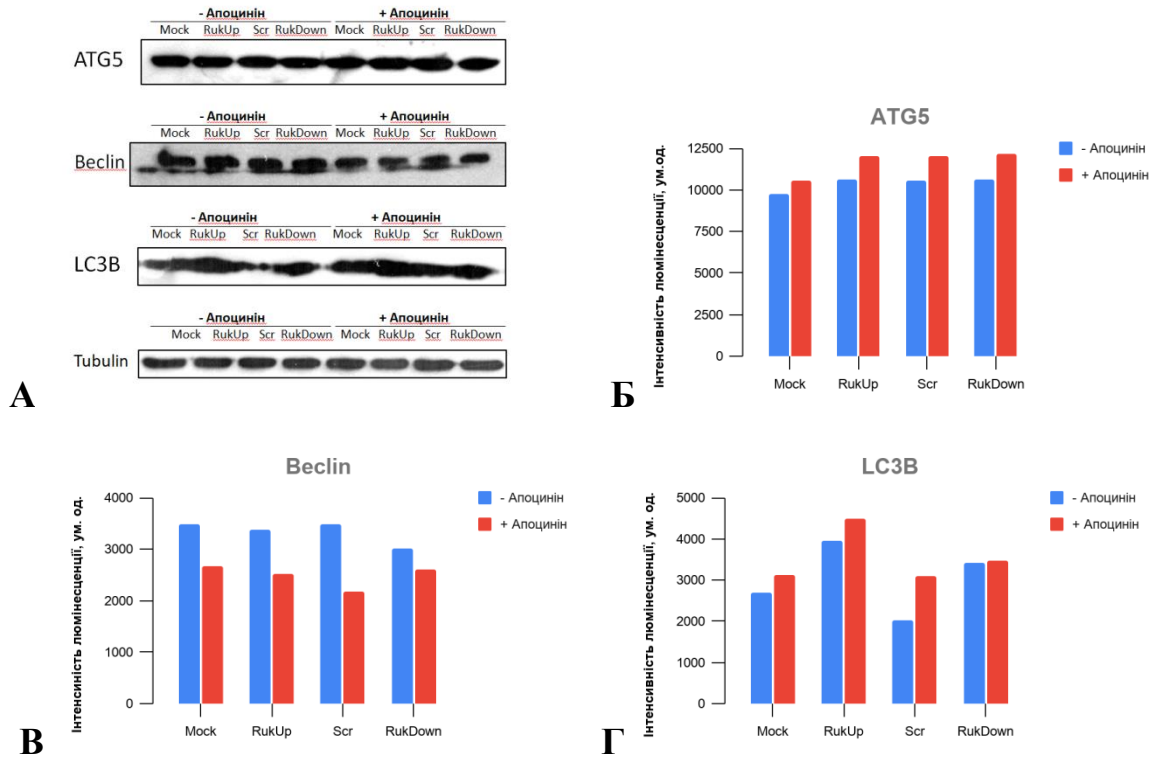


Рис. 3.9. Аналіз лізату клітин субліній аденокарциноми грудної залози миші 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на наявність факторів автофагії: А – блотограми; Б-Г – гістограми імуноблот-аналізу (Б – ATG5; В – Beclin-1; Г – LC3B)

Інкубування клітин з 200 мкМ апоциніном спричинило підвищення рівнів вмісту протеїну ATG5 у всіх сублініях клітин аденокарциноми грудної залози миші 4T1.

На відміну від результатів дослідження рівнів вмісту ATG5, блотограма Beclin-1 (рис. 3.9, В) демонструє протилежні тенденції: підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 не призводить до змін рівня Beclin-1 у субпопуляції RukUp, проте спостерігається пряма кореляція між зниженням

рівня Ruk/CIN85 та Beclin-1, а інкубування з апоциніном провокує падіння рівнів вмісту Beclin-1 у всіх субпопуляціях.

У випадку протеїну LC3B гіперекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 призвела до збільшення вмісту досліджуваного фактора порівняно з контрольною сублінією Mock. Знижений рівень Ruk/CIN85 також призвів до його зростання (рис. 3.9, Г). Інкубування клітин з апоциніном спричинило підвищення вмісту LC3B у всіх дослідних сублініях, окрім RukDown.

Отже, можна зробити висновок про неоднозначний вплив рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та редокс-залежного сигналювання, опосередкованого NADPH-оксидазним комплексом, на рівні факторів автофагії у клітинах мишачої аденокарциноми грудної залози лінії 4T1.

ВИСНОВКИ

Отже, у результаті проведеної роботи було оцінено залучення адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до регулювання редокс-залежного сигналювання, опосередкованого функціонуванням мембранних NADPH-оксидазних комплексів, та його внесок до контролю автофагії.

1. Проаналізовано продукування АФК аденокарциномними клітинами грудної залози миші лінії 4T1 залежно від рівня адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методами люмінесцентного аналізу та протокової цитофлуориметрії. Встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 призводить до значного посилення генерації АФК.
2. Виявлено, що інтенсивність продукування АФК клітинами сублінії 4T1 RukUp дозозалежно пригнічується за дії інгібітора збирання NADPH-оксидазних комплексів апоциніну.
3. Встановлено, що вміст маркерів автофагії (LC3B, ATG5, Beclin-1) у сублініях клітин 4T1 залежить від рівня адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та частково модулюється під впливом інгібітора збирання NADPH-оксидазних комплексів апоциніну.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Okon, I. and Zou, M. (2015). Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacological Research*, 11(100), pp. 170–174.
2. Havrylov, S., Rzhepetsky, Y., Malinowska, A., Drobot, L. and Redowicz, M. (2009). Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Journal of Proteome Science*, 7(21), pp. 1–19.
3. Wells, C., Fawcett, J., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., Colwill, K., Starostine, A., Metalnikov, P. and Pawson, T. (2006). A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell*, 125(3), pp. 535–548.
4. Zhang, J., Zheng, X., Yang, X. and Liao, K. (2009). CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Research*, 19(6), pp. 733–746.
5. Schmidt, M., Chen, B., Randazzo, L. and Bogler, O. (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 14), pp. 2845–2855.
6. Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N., Drobot, L., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A., Waterfield, M. and Buchman, V. (2000). Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO Journal*, 19(15), pp. 4015–4025.
7. Li, L., Tan, J., Miao, Y., Lei, P., and Zhang, Q. (2015). ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5), pp. 615–621.
8. Leivers, S., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), pp. 219–225.

9. Harrison-Findik, D., Susa, M. and Varticovski, L. (1995). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene*, 10(7), pp. 1385–1391.
10. Cantley, L. and Neel, B. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(8), pp. 4240–4245.
11. Akopian, A., Baka, I., Chestkov, A., Bukhman, V. and Georgiev, G. (1996). Cloning of genes, differentially expressed in the cerebellum during postnatal rat development. *Genetika*, 32(7), pp. 886–895.
12. Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Haglund, K., Kowanetz, M., Husnjak, K., Taylor, J., Soubeyran, P., Engström, U., Ladbury, J. and Dikic, I. (2003). Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), pp. 39735–39746.
13. Kirsch, K., Georgescu, M., Ishimaru, S. and Hanafusa, H. (1999). CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96(11), pp. 6211–6216.
14. Take, H., Watanabe, S., Takeda, K., Yu, Z., Iwata, N. and Kajigaya, S. (2000). Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), pp. 321–328.
15. Schmidt, M., Dikic, I. and Bogler, O. (2005). Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), pp. 3414–3425.
16. Gaidos, G., Soni, S., Oswald, D., Toselli, P. and Kirsch, K. (2007). Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 14), pp. 2366–2377.

17. Bogler, O., Furnari, F., Kindler-Roehrborn, A., Sykes, V., Yung, R., Huang, H. and Cavenee, W. (2000). SETA: a novel SH3 domain-containing adapter molecule associated with malignancy in astrocytes. *Neuro-Oncology*, 2(1), pp. 6–15.
18. Cascio, S. and Finn, O. (2015). Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in Colon Cancer Progression and Metastasis. *Cancers*, 7(1), pp. 342–352.
19. Nam, J., Onodera, Y., Mazaki, Y., Miyoshi, H., Hashimoto, S. and Sabe, H. (2007). CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *The EMBO Journal*, 26(3), pp. 647–656.
20. Weaver, A. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clinical & Experimental Metastasis*, 23(2), pp. 97–105.
21. Bharti, S., Inoue, H., Bharti, K., Hirsch, D., Nie, Z., Yoon, H., Artym, V., Yamada, K., Mueller, S., Barr, V. and Randazzo, P. (2007). Src-dependent phosphorylation of ASAP1 regulates podosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 27(23), pp. 8271–8283.
22. Oikawa, T., Itoh, T. and Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *Journal of Cell Biology*, 182(1), pp. 157–169.
23. Lito, P., Mets, B., Kleff, S., O'Reilly, S., Maher, V. and McCormick, J. (2008). Evidence that sprouty 2 is necessary for sarcoma formation by H-Ras oncogene-transformed human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 283(4), pp. 2002–2009.
24. Yang, H., Villani, R., Wang, H., Simpson, M., Roberts, M., Tang, M. and Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), pp. 266–279.

25. Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E., Wang, H. and Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, pp. 19–24.
26. Cipriano, A., Viviano, M., Feoli, A., Milite, C., Sarno, G., Castellano, S. and Sbardella, G. (2023). NADPH Oxidases: From Molecular Mechanisms to Current Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(17), pp. 11632–11655.
27. Sundaresan, M., Yu, Z., Ferrans, V., Irani, K. and Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270(5234), pp. 296–299.
28. Beyersmann, D. and Hartwig, A. (2008). Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82(8), pp. 493–512.
29. van der Toorn, M., Rezayat, D., Kauffman, H., Bakker, S., Gans, R., Koëter, G., Choi, A., van Oosterhout, A. and Slebos, D. (2009). Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(1), pp. 109–114.
30. Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 1(10), pp. 1881–1896.
31. Cui, S., Reichner, J., Mateo, R. and Albina, J. (1994). Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Research*, 54(9), pp. 2462–2467.
32. Hamanaka, R. and Chandel, N. (2011). Warburg effect and redox balance. *Science*, 334(6060), pp. 1219–1220.
33. Juhasz, A., Ge, Y., Markel, S., Chiu, A., Matsumoto, L., van Balgooy, J., Roy, K. and Doroshow, J. (2009). Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. *Free Radical Research*, 43(6), pp. 523–532.

34. Díaz, B. and Courtneidge, S. (2012). Redox signaling at invasive microdomains in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), pp. 247–256.
35. Levitzki, A. and Klein, S. (2010). Signal transduction therapy of cancer. *Journal of Molecular Aspects of Medicine*, 31(4), pp. 287–329.
36. Roy, K., Wu, Y., Meitzler, J., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Antony, S. and Doroshov, J. (2015). NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science*, 128(12), pp. 863–875.
37. Grivennikov, S., Greten, F. and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), pp. 883–899.
38. Hu, C., A, A., White, K., Torres, S., Ishak, M., Sillerud, M., Miao, L., and Ye, Z. (2015). Apoptosis and Autophagy: The Yin–Yang of Homeostasis in Cell Death in Cancer. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Academic Press*, pp. 161–181.
39. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, HP., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., and Choi, A. M. (2011). Autophagy Proteins Regulate Innate Immune Responses by Inhibiting the Release of Mitochondrial DNA Mediated by the NALP3 Inflammasome. *Nature Immunology*, 12(3), pp. 222–230.
40. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002). C-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate P53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability. *Molecular Cell*, 9(5), pp. 1031–1044.
41. De Raedt, T., Walton, Z., Yecies, J. L., Li, D., Chen, Y., Malone, C. F., Maertens, O., Jeong, S. M., Bronson, R. T., Lebleu, V., Kalluri, R., Normant, E., Haigis, M. C., Manning, B. D., Wong, K.-K., Macleod, K. F., and Cichowski, K. (2011). Exploiting Cancer Cell Vulnerabilities to Develop a Combination Therapy for Ras-Driven Tumors. *Cancer Cell*, 20(3), pp. 400–413.

42. Самойленко, А., Биць, Н., Пасічник, Г., Козлова, Н., Базалій, А., Геращенко, Д., Шандренко, С., Воротніков, О., Кітцман, Т., Комісаренко, С. та Дробот, Л. (2013). Відповідь пухлинних клітин на пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 рекомбінантними лентівірусами. *Biotechnologia Acta*, 6(4), сс. 182–189.
43. Gianni, D., Nieminen, A. L., Ronchi, C., and Di Lisa, F. (2008). The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Biochemical Journal*, 410(3), pp. 581–589.
44. Huang, C., Zhou, W., Wu, R., Guan, W., and Ye, N. (2023). Recent Advances in Nanomaterial-Based Chemiluminescence Probes for Biosensing and Imaging of Reactive Oxygen Species. *Nanomaterials* [online] Volume 13(11), p. 1726. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano13111726> [Accessed 25 May 2023].
45. McKinnon, K. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, pp. 5.1.1–5.1.11.
46. Ameziane-El-Hassani, R. and Dupuy, C. (2013). Detection of intracellular reactive oxygen species (CM-H₂DCFDA). *Bio-Protocol* [online] Volume 3(2), p. 313. Available at: <http://www.bio-protocol.org/e313> [Accessed 20 Jan. 2013].
47. Zadeh, C. O., Huggins, J. R., Sarmah, D., Westbury, B. C., Interiano, W. R., Jordan, M. C., Phillips, S. A., Dodd, W. B., Meredith, W. O., Harold, N. J., Erdem, C., and Birtwistle, M. R. (2022). Mesowestern Blot: Simultaneous Analysis of Hundreds of Submicroliter Lysates. *ACS Omega*, 7(38), pp. 33902–33910.
48. Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., and Jung, J. U. (2006). Autophagic and Tumour Suppressor Activity of a Novel Beclin1-Binding Protein UVRAG. *Nature Cell Biology*, 8(7), pp. 688–699.
49. Kim, M. J., Woo, S. J., Yoon, C. H., Lee, J. S., An, S., Choi, Y. H., Hwang, S. G., Yoon, G., and Lee, S. J. (2011). Involvement of Autophagy in Oncogenic

K-Ras-Induced Malignant Cell Transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), pp. 12924–12932.

50. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp. 24131–24145.