

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біології та
біоінформатики
доц., к.б.н. Олексій Нипорко
Протокол №____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2023 р.

**Вплив надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на стан активності
компонентів сигнальних мереж клітин меланоми миші лінії B16,
асоційованих з контролем їх малігнізації**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Журавля Богдана

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н. **Самофалова Дарія**

Робота виконана у відділі сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії
імені О.В. Палладіна НАН України під керівництвом професора, д.б.н.
Людмили ДРОБОТ

Київ – 2023 р.

Анотація

Журавель Б.В. Вплив надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на стан активності компонентів сигнальних мереж клітин меланоми миші лінії B16, асоційованих з контролем їх інвазивності. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Метою роботи було дослідити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регулюванні активності компонентів сигнальних мереж клітин меланоми миші лінії B16, асоційованих з контролем їх інвазивності та малігнізації *in vitro*.

У роботі біохімічними та статистичними методами було проаналізовано вплив експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на життєздатність та міграційний потенціал клітин меланоми миші лінії B16-F10. Також було проаналізовано зміни у рівні експресії та активності деяких ключових протеїнів сигнальних мереж, залучених до контролю епітелійно-мезенхімного переходу (ЕМП) і, як наслідок, малігнізації клітин.

За результатами проведених досліджень встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 призводить до збільшення проліферативної активності і підвищення міграційного потенціалу клітин меланоми миші лінії B16. Виявлено чітку взаємозалежність між змінами вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та важливих компонентів сигнальних шляхів меланомних клітин, зокрема фосфорильованих активних форм Jnk/SAPK кінази, а також таких маркерів ЕМП як протеїни віментин та плакофілін, Rac та pSTAT3.

Отримані дані дозволяють зробити висновок, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85, залежно від рівня його експресії, залучений до контролю малігнізації та набуття інвазивності клітин меланоми шляхом регулювання процесу епітелійно-мезенхімного переходу.

Ключові слова: меланома шкіри, сигнальні мережі, адаптерні

протеїни, Ruk/CIN85, епітелійно-мезенхімний перехід.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Меланома шкіри. Загальна характеристика	8
1.1.1. Причини і передумови виникнення меланоми	9
1.1.2. Класифікація меланом за клінічними і гістологічними характеристиками	11
1.2. Характеристика клітинного сигналювання меланоми	13
1.2.1. Основні сигнальні шляхи залучені до малігнізації клітин меланоми	13
1.2.2. Ключові транскрипційні фактори, що регулюють розвиток і прогресування меланоми	15
1.2.3. Епігенетичні фактори регуляції патогенезу меланоми	17
1.2.4. Роль репрограмування метаболізму в меланомагенезі	19
1.3. ЕМП. Метастазування меланоми	21
1.3.1. Ключові маркери ЕМП у клітинах меланоми	22
1.4. Адаптерні протеїни. Загальна характеристика	23
1.4.1. Особливості будови адаптерних протеїнів, необхідні для виконання їх регуляторних функцій	24
1.4.2. Структурно-функціональна організація адаптерного протеїну Ruk/CIN85	26
1.4.3. Роль Ruk/CIN85 у контролі малігнізації пухлинних клітин	27
1.4.4. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 як мішень у таргетній терапії	29
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	30

2.1. Культивування еукаріотичних клітин _____	30
2.2. Дослідження проліферативної активності клітин B16-F10 _____	32
2.3. Дослідження міграційного потенціалу клітин B16-F10 _____	33
2.4. Екстрагування протеїну та підготовка зразків для Вестерн-блотингу _____	33
2.5. Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз _____	34
2.6. Статистична обробка результатів досліджень _____	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ _____	37
3.1. Модулювання життєздатності клітин меланоми миші залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 _____	37
3.2. Модулювання міграційного потенціалу клітин меланоми миші залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 _____	38
3.3. Дослідження стану активності й вмісту ключових ланок сигнальних мереж клітин меланоми миші B16, залучених до контролю міграційної активності й інвазивного потенціалу, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 _____	40
3.3.1. Зміни внутрішньоклітинного вмісту активних форм сигнальних протеїнів в клітинах меланоми миші лінії B16 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 _____	41
3.3.2. Експресія молекулярних маркерів EMT в клітинах меланоми миші лінії B16 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 _____	43
ВИСНОВКИ _____	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ _____	48

Перелік умовних скорочень

ЕМП	– епітелійно-мезенхімний перехід
ПААГ	– поліакриламідний гель
BRAF	– ген, що кодує протеїн під назвою B-Raf
NRAS	– ген, що кодує протеїн під назвою N-Ras
PTEN	– ген гомологу фосфатази та тензину
PI3K	– фосфатидилінозитол–3–кіназа
Ruk	– регулятор повсюдно розповсюдженої кінази
CIN85	– протеїн з мол. масою 85 кДа, що взаємодіє з c-Cbl
SETA	– протеїн, що кодує SH3-домени й експресується в астроцитомах
SH3KBP1	– протеїн 1, що містить SH3-домени і зв'язується з кіназою
RTK	– receptor tyrosine kinase (рецепторна тирозинкіназа)
ERK	– extracellular signal-regulated kinase (протеїнкіназа, що регулюється позаклітинними сигналами)
SOX10	– Sry-related HMG-Box gene 10 (Sry-споріднений ген HMG-Box 10)
MITF	– Microphthalmia-associated transcription factor (транскрипційний фактор, асоційований з мікрофтальмією)
EGF	– epidermal growth factor (епідермальний фактор росту)
JNK/SAPK	– stress-activated protein kinase/Jun amino-terminal kinase (протеїнкіназа, що активується стресом/кіназа, що фосфорилує N-кінець c-Jun)
Akt/mTOR	– alpha serine/threonine-protein kinase (серин-треонінова протеїнкіназа-альфа)
МАРК	– Mitogen activated protein kinase (протеїнкіназа, що активується

- мітогенами)
- STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3 (перетворювач сигналу та активатор транскрипції 3)
- SH – Src-homology domain (Src-гомологічний домен)

ВСТУП

Меланома, злоякісна пухлина, що розвивається з меланоцитів, вважається найагресивнішим з усіх видів раку шкіри. Хоча меланома складає невеликий відсоток від щорічно діагностованих типів раку шкіри (приблизно 3%), більшість летальних випадків припадає саме на неї (приблизно 70%) [1].

Основна причина такої статистики і складності лікування захворювань на меланому – її здатність уникати виявлення за рахунок відсутності симптомів на ранніх стадіях захворювання, а також швидке набуття летальності та резистентності до терапевтичних стратегій лікування у разі поширення організмом - метастазування. Очевидно, що для такого механізму поведінки, захворювання повинно регулюватись складним сигнальним каскадом багаторівневої структури зі здатністю тонко і точно у відповідь на зовнішні сигнали змінювати механізм реагування. Саме тому важливою ціллю сучасних досліджень, спрямованих на винайдення новітніх таргетних терапій меланоми шкіри є ключові сигнальні механізми, залучені до процесів виникнення, розвитку та прогресування меланоми.

Одними з найважливіших компонентів таких сигнальних шляхів є адаптерні протеїни, що є універсальними внутрішньоклітинними перетворювачами, регуляторами та сигнальними трансмітерами. Ці протеїни побудовані з особливих доменів, залучених до міжмолекулярних взаємодій з іншими протеїнами, ліпідами, нуклеїновими кислотами, що дозволяє їм формувати мультимолекулярні комплекси високого ступеня складності, які лежать в основі мережевої організації сигнальних процесів в клітині [2].

Очевидно, що генетичні зміни в структурі настільки важливих і

багатофункціональних клітинних регуляторів і зміни у рівні їх експресії можуть зумовлювати порушення клітинного сигналювання, що, в свою чергу, може призводити до виникнення численних захворювань, у тому числі раку. Тому ці протеїни можна розглядати як тканинно-специфічні маркери канцерогенезу та перспективні мішені для розробки протипухлинних препаратів.

Одним з таких адаптерних протеїнів є Ruk/CIN85. Підтверджено, що цей сигнальний адаптер може відігравати ключову регуляторну роль у багатьох важливих клітинних процесах, а саме: передачі сигналу, везикулярному транспорті, ремоделюванні цитоскелету, апоптозі, вірусній інфекції, а також потенційно впливати на розвиток і прогресію ракових захворювань.

У низці досліджень також було виявлено підвищення експресії цього адаптера значною мірою у клітинах меланоми шкіри, що потенційно може свідчити про його вплив на малігнізацію та зростання інвазивності меланомних, клітин [3].

Метою роботи було дослідити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регулюванні вмісту й активності компонентів сигнальних мереж клітин меланоми миші лінії B16, асоційованих з контролем їх інвазивності та малігнізації *in vitro*.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Оцінити життєздатність клітин меланоми миші лінії B16-F10 з надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
2. Дослідити зміни міграційного потенціалу клітин меланоми миші лінії B16-F10 з надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

3. Проаналізувати вплив надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на зміни вмісту й активності ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу у клітинах меланоми, продемонструвавши таким чином його роль у контролі цього процесу.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 . Меланома шкіри. Загальна характеристика

Меланома шкіри є одним зі швидко поширюваних у світі типом онкологічних захворювань. Щороку меланома шкіри стає причиною близько 60-ти тисяч смертей. Залежно від доступності відповідної медичної допомоги та ранньої діагностики, показники захворюваності та смертності від цього захворювання значно відрізняються в різних країнах світу. Меланома утворюється внаслідок виникнення генетичних мутацій у меланоцитах, спеціалізованих пігментних клітинах, що розташовані переважно в шкірі, де вони утворюють меланіни - пігменти, які надають тканинам кольору. Джерелом меланоцитів шкіри є високорухливі нервово-хрестовидні попередники, які мігрують до шкіри під час ембріонального розвитку. Гомеостаз меланоцитів контролюється епідермальними кератиноцитами [4]. Через відносно широке розповсюдження меланоцитів меланома може виникати повсюдно, незалежно від анатомічної локалізації або типів органів і тканин.

Будучи детектованою вчасно, злоякісна меланома відносно добре піддається лікуванню за допомогою хірургічної резекції, але у разі невчасного виявлення, зокрема під час поширення організмом і утворення метастазів, стає надзвичайно небезпечною, летальною і резистентною до

більшості сучасних методів лікування. Провідні стратегії таргетного лікування меланоми базуються в основному на ключових відкриттях у сфері клітинного сигналювання клітин меланоми, оскільки вони дають змогу зрозуміти біологію виникнення, розвитку і прогресування меланоми на найглибшому з можливих рівнів [5].

1.1.1. Причини і передумови виникнення меланоми

Через свій генотоксичний вплив, **дія ультрафіолетових сонячних променів** визнається найбільш значущим і теоретично здатним до модифікування фактором ризику розвитку злоякісної меланоми. Згідно з дослідженням Елвуд та ін. про взаємозв'язок між ризиком меланоми та впливом сонячного світла, спорадичне перебування на сонці є одним з ключових факторів ризику розвитку меланоми. Наявні дані, які свідчать про те, що наявність сонячних опіків в анамнезі може бути ознакою надмірного періодичного перебування на сонці, а сонячні опіки в дитинстві пов'язані з найвищим ризиком розвитку хвороби [6]. В свою чергу, актинічний кератоз і немеланомні злоякісні новоутворення шкіри - навпаки, частіше пов'язані з хронічним безперервним впливом сонця [7].

Окрім природних джерел ультрафіолету, на формування меланоми може також впливати і **штучне ультрафіолетове опромінення**. Зазначається, що вплив ультрафіолету від звичайного сеансу в солярії значно вищий, ніж від звичайного перебування на свіжому повітрі або навіть від сонячних ванн [8]. Підвищення захворюваності на меланому також може бути пов'язане з деякими методами фотолікування, як ось фотохіміотерапією псораленом УФ-А випромінюванням, що використовується для лікування псоріазу [9].

Кількість **меланоцитних невусів**, обтяжений анамнез та генетична схильність також є одними з основних факторів ризику розвитку хвороби. Загалом, меланоцитні невуси, які можуть бути вродженими або набутими, є

доброякісними скупченнями меланоцитів або невусних клітин. Зазначається, що попередньо існуючий невус присутній приблизно у 25% випадків меланоми [10]. Крім того, кількість, особливо розмір і тип невусів відіграють значну роль у збільшенні ризику розвитку меланоми [11]. За допомогою мета-аналізу, дослідники наводять такі статистичні дані: пацієнти з більш ніж 100 невусами мали у 7 разів вищий ризик розвитку меланоми [12]. Що стосується розміру, то зазвичай невуси великого розміру (>2 мм) і більше (>5 мм) значно частіше перетворюються на меланому [13].

Також відомо, що попередньо існуючий диспластичний (атиповий) невус присутній у 29-49% випадків несімейної меланоми [14]. Зазначається, що ризик розвитку меланоми підвищують не тільки атипові невуси, але й навіть просто наявність одного невуса з атиповими характеристиками. Приміром п'ять атипових невусів підвищують ризик розвитку меланоми в шість разів [12, 15].

Вагомим фактором ризику розвитку захворювання є **сімейна історія меланоми**. Останнім часом спостерігається велика кількість досліджень, спрямованих на з'ясування генетичного підґрунтя виникнення та прогресування меланоми, оскільки сімейна кластеризація захворювання є індикатором потенційних спадкових причин. У своєму дослідженні сімей зі спадковою меланомою Цао та ін. показали, що існує чітко виражений аутосомно-домінантний тип успадкування, коли кілька членів сім'ї страждають від захворювання більше, ніж родичі у першому поколінні. Найчастішими генетичними аномаліями, виявленими в цих сім'ях, були мутації в інгібіторі циклін-залежної кінази 2A (CDKN2A або p16), тоді як мутації в циклін-залежній кіназі 4 (CDK4) були більш рідкісними [16]. Також дослідниками було зроблено висновок, що пацієнти, які мають множинні первинні меланоми, множинні передракові захворювання або передракові захворювання в анамнезі, такі як диспластичні невуси, з більшою ймовірністю матимуть поверхнево інвазивні пухлини та гірші прогнози, аніж

ті, хто не має такої генетичної схильності [17]. Ризик розвитку меланому також вищий у людей із сімейними онкологічними синдромами, такими як, наприклад, сімейна ретинобластома, синдром раку Лі-Фраумені та синдром Лінча II типу [18].

Також зазначається, що певні **фенотипічні характеристики**, такі як руде волосся, світла шкіра, численні веснянки, світлі очі, підвищена чутливість до сонячного світла і нездатність засмагати, підвищують ризик розвитку меланому приблизно на 50% [19].

1.1.2. Класифікація меланом за клінічними і гістологічними характеристиками

ППМ розшифровується як **поверхнево поширена меланома**. На неї припадає близько 70% загальних випадків захворювання і вона є найпоширенішим типом меланому. ППМ зазвичай з'являється як наслідок спорадичного перебування на сонці і найчастіше вражає задню поверхню ніг у чоловіків і жінок [18]. З клінічної точки зору, цей вид раку має різноманітні відтінки, такі як коричневий, сірий, чорний, фіолетовий, рожевий кольори а в рідкісних випадках - блакитний або білий. Ураження зазвичай має один або кілька неправильних півострівних виступів і різко окреслені краї. З особливих ознак також зазначають, що на шкірі може з'являтися вузол або папула, що пальпується, і яка піднімається на кілька міліметрів над поверхнею шкіри.

Вузлова меланома - ВМ. Складає 5% всіх меланом і найчастіше вражає тулуб і кінцівки пацієнтів віком 50-60-ти років, а також частіше зустрічається у чоловіків, ніж у жінок. У вузлових меланомах часто розвиваються виразки. Для цього виду меланому характерним є те, що вона має лише вертикальну фазу росту, що корелює з більш швидким ростом і вищою частотою метастазування [18]. Клінічно ВМ має відносно

рівномірний коричневий, чорний або синьо-чорний колір і може проявлятися у вигляді підвищеної бляшки з нерівними межами, виразкового поліпа або вузла з гладкою поверхнею. ВМ може бути ахромічною майже у 50% випадків. За гістологічними ознаками пухлина складається з невеликих скупчень і гнізд меланомних клітин, які разом утворюють пухлинний вузол [20].

ММЛ, або малігнізована меланома Лентіго. Від 4% до 15% шкірних меланом - це ММЛ, яка, на відміну від ВМ і ППМ, корелює з тривалим перебуванням на сонці. Перш ніж поширитися на сосочкову дерму, цей вид меланоми може знаходитись на стадії попереднього розвитку протягом десятиліть [18]. Він може мати різний колір, включаючи чорний, коричневий і бурий. Хоча пухлина часто буває плоскою і великою, вона має нерівні краї, а також може виявлятися як папулоподібне вогнище інвазії. ММЛ найчастіше утворюється на шкірі голови та шиї [20]. Гістологічно вона вирізняється клітинною проліферацією, яка обмежується базальними шарами епідермісу.

АЛМ, або акральна лентигінозна меланома. Ця пухлина шкіри зустрічається рідко, складаючи лише 5% меланом у людей зі світлим кольором шкіри, найчастіше вражаючи пацієнтів азійського, латиноамериканського та африканського походження. Зазвичай виникає у пацієнтів похилого віку, переважно жінок. Нігтьове ложе великого пальця зазвичай зазнає найбільшого ураження при АЛМ, а загалом, вона переважно локалізується на гладенькій шкірі та прилеглий шкірі пальців, долонь і стоп [18].

ДМ, або десмопластична меланома. Десмопластична меланома зазвичай виникає на голові та шиї у людей віком від 60 до 70 років. Однак вона може також розвиватися на різних ділянках шкіри та слизових оболонках. Чоловіки дещо частіше зазнають ураження цим видом меланоми. Клінічно десмопластична меланома може проявлятися у вигляді

еритематозного, блідого або яскраво-червоного вузлика або бляшки, що розвивається на пошкодженій сонцем шкірі. Вона також може бути амеланотичною. Через свій високоінфільтративний ріст і часту периневральну інвазію цей підвид онкології часто демонструє інфільтрацію нервів і характеризується високим рівнем рецидивів. Хоча він рідко поширюється на лімфатичні вузли і часто рецидивує на місцевому рівні, він має схильність до поширення в легені [18].

1.2. Характеристика клітинного сигналювання меланоми

1.2.1. Основні сигнальні шляхи залучені до малігнізації клітин меланоми

При захворюванні на меланому шляхи залежний від кіназ, що активується мітогенами (**MAPK**), сприяють швидкій проліферації пухлинних клітин. Ras, Raf, MEK і ERK кінази послідовно активуються для контролю різноманітних онкогенних біологічних активностей у відповідь на позаклітинне зв'язування факторів росту з RTK. Гіперактивування шляхів MAPK при меланомі може бути спричиненим мутаціями таких основних сигнальних протеїнів як: BRAF, NRAS, NF1 і KIT. BRAF - це серин/треонінова кіназа, яка є членом родини Raf. Існує чимало досліджень на користь того, що точкова мутація і цій кіназі є більш поширеною в меланомі, ніж в інших пухлинах.[21,22] Приміром у акральній меланомі та меланомах слизової оболонки, частота мутацій BRAF є набагато нижчою і становить відповідно 20% та 6%.[23,24]

Ключовим ензимом однієї з гілок MAP-кіназного сигнального шляху є кіназа, що активується позаклітинними сигналами (**ERK**), яка відіграє

важливу роль у молекулярних механізмах патогенезу меланоми. ERK конститутивно активується у більш ніж 90% випадках захворювання на меланому [25]. Головними драйверами активування ERK в меланомах є мутації в “up-stream” компонентах сигнального шляху, таких як N-Ras та BRAF. Відомо, що кількість активованої ERK при меланоцитних ураженнях поступово зростає від ранньої стадії до стадії прогресії захворювання [26]. В той же час, вміст фосфорильованих форм ERK (p-ERK) спостерігається переважно на межі первинної меланоми, де пухлинні клітини проникають у дерму, тобто на стадії метастазування [25].

MAP-кіназний шлях **JNK/c-Jun** також відіграє важливу роль у виникненні та розвитку меланоми. Характерною особливістю JNK є те, що вона зумовлює як позитивний, так і негативний вплив на розвиток меланоми. У більшості випадків цей шлях відіграє онкогенну роль. Водночас, Алексакі та ін. у своїй роботі показали, що інгібування JNK низькомолекулярним інгібітором SP600125 індукує зупинку клітинного циклу й спричинює апоптоз клітин меланоми людини. Ці результати були підкріплені експериментально шляхом нокдауну JNK1 з використанням siRNA [27]. Також було доведено, що селективний і проникний для клітин пептидний інгібітор JNK відіграє важливу регуляторну роль в пригніченні росту пухлини *in vivo* і, в той же час проліферації клітин *in vitro* [27]. Більше того, у своїх дослідженнях Лонго та ін. презентують розроблену ними модель активування JNK та JNK-залежного синтезу MMP-2 у клітинах меланоми людини [28]. В свою чергу, Чої та ін. у своїй роботі виявили, що пухлинний супресор p16INK4a здатний пригнічувати життєздатність пухлинних клітин шляхом зв'язування та пригнічення активності JNK, чим знову підтвердили протуморогенну роль JNK [29].

Близько 70% всіх меланом мають порушену активацію **шляху АКТ**, що є наслідком ампліфікації АКТ3 та втрати PTEN внаслідок епігенетичного вимкнення або делеції [30]. Активування фосфатидилінозитол-3-кінази

(PI3K), як правило, є першим кроком в активуванні шляху АКТ після його стимуляції екзогенними факторами росту. Утворення фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (PIP3) може сприяти транслокації АКТ до плазматичної мембрани для подальшого фосфорилування та активування. Оскільки фосфатаза PTEN контролює внутрішньоклітинний рівень PIP3, її функціональний дефіцит може спричинити up-регулювання PIP3 з наступним активуванням АКТ [31]. Відомо, що АКТ3 є найбільш поширеною ізоформою АКТ при меланомі. Було доведено, що трансфікування нкРНК, спрямоване проти АКТ3, або надекспресія PTEN ефективно пригнічують активність АКТ3 і зменшують здатність клітин меланоми до метастазування [32].

1.2.2. Ключові транскрипційні фактори, що регулюють розвиток і прогресування меланоми

Транскрипційний фактор нервового гребеня SOX10 є необхідним для ініціації та росту меланоцитів і шваннівських клітин. Він неодноразово був визнаний специфічним маркером для діагностики меланоцитних і шваннівських пухлин, включаючи метастатичну меланому [33]. У своїх дослідженнях на трансгенних мишачих моделях Граф та ін. показують, що гаплонедостатність SOX10 запобігає утворенню мутантного вродженого невусу і меланоми, зумовлених NRAS. Під час пригнічення генетичної експресії SOX10 можна спостерігати стійке скасування здатності клітин меланоми до проліферації та міграції *in vitro* і росту *in vivo*. Це вказує на фундаментальну роль SOX10 у збереженні виживання клітин меланоми [34]. Як транскрипційний регулятор, SOX10 здатний активувати MITF, довгу некодуючу РНК (lncRNA) SAMMSON, вилочку D3 (FOXD3) і RAB7, тим самим контролюючи клітинну проліферацію, функції мітохондрій та функціонування ендолізосомного шляху [35].

MITF є добре вивченим транскрипційним фактором, специфічним для меланоцитної лінії. Він регулює різноманітні сигнальні шляхи, задіяні в біології меланоми, тим самим керуючи проліферацією клітин, виживанням, метастазуванням, клітинним метаболізмом, регулюючи фенотипічну пластичність і терапевтичну резистентність [36]. Спершу дослідження функції MITF у проліферації клітин меланоми давали досить суперечливі результати. Ця суперечність значною мірою була вирішена пропозицією "реостатної моделі" Карейра та ін [36]. З одного боку, було виявлено, що зміна фенотипу з інвазивного на проліферативний індукується помірною експресією MITF, що дає клітинам меланоми більшу перевагу в рості. Однак, в той же час пов'язана з диференціюванням зупинка в фазі G1 відновлюється, якщо експресія MITF буде збільшена [37]. Згідно з цією моделлю, активність і біологічна функція MITF тісно пов'язані між собою. Отже, нижчі рівні експресії MITF в першу чергу сприяють транскрипції генів, залучених до зупинки клітинного циклу та інвазії, а помірні та високі рівні експресії MITF потенціюють наступні за ланцюгом мішені, сприяючи проліферації та дедиференціюванню клітин.

Сигнальний шлях Notch є одним з найважливіших сигнальних шляхів, які беруть участь у самооновленні стовбурових клітин та прийнятті рішень щодо контролю диференціювання клітин у багатьох органах. Саме тому Notch має вирішальне значення для збереження гомеостазу меланоцитів [38]. Експресія та активність Notch є значно вищою при захворюванні на меланому, ніж у здорових меланоцитах. У своїх дослідженнях Піннікс та ін. показали, що меланоцити, які були трансфіковані усіченою конструкцією з підвищеною активністю Notch, демонструють підвищену проліферацію клітин і характерні злякисні ознаки, що нагадують меланому [39]. Також відомо, що активування внутрішньоклітинного шляху АКТ і наявність елементів пухлинного мікрооточення, таких як гіпоксія, сприяють уррегулюванню Notch [40]. Тому стає очевидним, що Notch функціонує як

вузол, що координує різні канцерогенні сигнали, оскільки може виконувати свою онкогенну роль при меланомі ще і через активацію шляху MAPK, регуляцію експресії N-кадгерину та потенціювання бета-катенін-залежного сигналювання. Отже, Notch є фундаментальним фактором патогенезу онкологічних захворювань. На додаток до властивого йому впливу на поведінку пухлинних клітин, активація Notch також тісно пов'язана з ангиогенезом і бере участь у комунікації між пухлинними та ендотелійними клітинами, що сприяє міграції пухлинних клітин [41,42]. Крім того, нещодавнє дослідження показало, що активація Notch робить BRAF-мутантні клітини меланоми стійкими до інгібіторів MEK, таких як кобіметиніб [43].

Шлях Wnt є консервативним еволюційним шляхом, що бере участь у контролі клітинного гомеостазу, регенерації тканин та ембріональному розвитку. Ікея та ін. показали пряму залежність між відсутністю меланобластів у мишей і дефіцитом у них Wnt, тим самим продемонструвавши значущість Wnt у дозріванні меланоцитів [44]. Крім того, фундаментальна роль Wnt-бета-катеніну в розвитку меланоцитів також підтверджується тим фактом, що активація бета-катеніну після Wnt суттєво впливає на клітинне диференціювання - від втрати гліальних похідних до експансії меланоцитів. Існує два основних типи сигнальних шляхів Wnt: канонічний бета-катенін-залежний шлях і неканонічний бета-катенін-незалежний шлях. У меланомі ці підвиди Wnt шляху відповідають за проліферацію клітин і клітинну міграцію відповідно [45]. Крім того, нещодавніми дослідженнями Ука та ін. було продемонстровано, що тимчасова активація сигналу Wnt/катеніну є цілком достатньою для пригнічення експресії SOX10 через деградацію бета-катеніну за протеосомним шляхом, що запобігає росту меланоми [46]. Ці дані підтверджують пухлиносупресивну функцію Wnt/катеніну при захворюванні на меланому.

1.2.3. Епігенетичні фактори регуляції патогенезу меланому

Найбільш ретельно вивчена епігенетична зміна при онкологічних захворюваннях, **метилювання ДНК** - це процес, при якому метильна група додається до цитозину в положенні 5 за допомогою ДНК-метилтрансферази з утворенням 5-метилцитозину (5-МЦ) [47]. ДНК-метилтрансферази (DNMT), які додають цю метильну групу до залишку цитозину, і родина ТЕТ, яка опосередковано сприяє деметилюванню ДНК, відіграють ключову роль у динамічному регулюванні цього процесу [48]. Дані досліджень Ліан та ін. підтверджують, що втрата 5-МЦ, спричинена down-регулюванням представників родини ТЕТ, є епігенетичною ознакою прогресування меланому, що має значну діагностичну та прогностичну цінність.

Ацетилювання гістонів, у свою чергу, контролюється ацетилтрансферазами (НАТs) та деацетилазами (HDACs) гістонів [49]. Нещодавно Вудс та ін. шляхом епігеномного профілювання виявили систематичне ацетилювання гістонів в регуляторних ділянках, близьких до специфічних онкорегуляторних генів в пухлиноутворювальних шляхах при меланомі. Завдяки цьому променева терапія, терапія, спрямована на МАРК-шлях, та імунотерапія можуть бути більш ефективними, коли відновлюється ацетилювання гістонів. Це пов'язано з тим, що ці методи лікування контролюють експресію ліганду запрограмованої смерті-1 (PD-L1), внутрішньоклітинне продукування АФК та репарацію пошкоджень ДНК відповідно [50].

Поряд з ацетилюванням гістонів, **метилювання гістонів** впливає на конденсацію хроматину та транскрипцію генів, контролюючи біологію меланому [51]. Під час цього процесу основну роль виконують такі родини ензимів, як SET domain bifurcated 1 (SETDB1), disruptor of telomeric silencing 1-like proteins (Dot1L) та enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2). Під час багаторазової ампліфікації SETDB1 в меланомі, він починає відігравати

онкогенну роль, метилуючи гістон H3 по залишку лізину 9 (H3K9) [52]. Через це клітини меланоми піддаються метаболічному перепрограмуванню, і паралельно збільшують метастатичний потенціал. Підтверджено, що цей процес можна деактивувати, фармакологічно інгібуючи SETDB1 [53]. На відміну від SETDB1, ген DOT1L зазнає соматичних мутацій, що в результаті призводить до меншого рівня метилування H3K79. Впливаючи на активацію механізму нуклеотидної ексцизійної репарації (NER) XPC та перешкоджаючи репарації пошкоджень ДНК, Жу та ін. показали, що втрата функції Dot1L прискорює розвиток меланоми, спричиненої ультрафіолетовим випромінюванням [54]. Крім того, при меланомі підвищується експресія гістонметилтрансферази EZH2, яка підвищує триметилування H3K27, що сильно збільшує загальний рівень резистентності до дії пухлинних супресорів [55].

Метилування некодуєчих РНК та m6A РНК є ще двома важливими парадигмами епігенетичної модифікації при захворюванні на меланому. Численні характеристики злоякісних пухлин, включаючи метастазування, клітинний метаболізм, міграцію та інвазію, а також протипухлинний імунітет, пов'язані саме з профілями експресії мікро РНК, некодуєчих РНК і циркулярних РНК в меланомі [56]. Дослідження Гільот та ін. підтверджують, що секвестрування miR-16 мРНК специфічного для меланоцитів TYRP1 послаблює пригнічення таких факторів пухлинного росту як, наприклад, RAB17, і, відповідно, може стимулювати пухлинний ріст. Це дослідження підкреслює, що штучне витіснення мікро РНК може бути дуже перспективною терапевтичною стратегією лікування меланоми [57]. Дослідження, проведене Лейсі та ін., показує, що некодуєча РНК SAMMSON коампліфікується з MITF і відіграє онкогенну роль, збільшуючи перехресні перешкоди між меланоцитарним лінійно-специфічним фактором і некодуєчою РНК. Відомо, що понад 90% меланом експресують SAMMSON, який є транскрипційною мішенню SOX10. Також вченими було зроблено

висновок, що порушення функцій мітохондрій, спричинене нокдауном SAMMSON за допомогою таргетування p32 може тим самим покращити результати терапії, спрямованої на інгібування шляху MAPK [58].

1.2.4. Роль репрограмування метаболізму в меланомагенезі

Аеробний гліколіз, також відомий як **ефект Варбурга**, є найбільш поширеною метаболічною особливістю як багатьох інших типів пухлин, так і меланоми [59]. Було прийнято вважати, що основною характерною рисою ефекту Варбурга є пригнічення окисного фосфорилування в мітохондріях під час розвитку пухлин. Однак, нещодавніми дослідженнями переконливо доведено, що функція мітохондрій є критично важливою для виживання пухлинних клітин меланоми і значно сприяє її росту. Приміром, Варкез та ін. виявили, що підгрупа меланом з вищою експресією фактора стимуляції біогенезу мітохондрій є більш резистентною до оксидативного стресу. Було підтверджено, що виживання і ріст цієї групи меланом прямо залежить від мітохондрійної функції [60].

Ще однією метаболічною особливістю розвитку меланоми є **порушення ліпідного обміну**. Підвищене споживання ліпідів і посилений ліпогенез дають пухлинним клітинам перевагу в проліферації, оскільки вони слугують одночасно джерелом енергії і основою для різних біологічних мембран [61]. Експресія факторів регулювання ліпідного обміну зазвичай сильно підвищена в меланомах, а їх пригнічення може призвести до помітної регресії пухлини. Це свідчить про те, що біосинтез ліпідів відіграє одну з вирішальних ролей у проліферації клітин меланоми.

Доставка внутрішньоклітинних протеїнів і органел в автолізосоми для перетравлення і переробки, або **автофагія**, є важливим метаболічним процесом, що зазнає змін при меланомагенезі. Цей процес забезпечує водночас достатню кількість будівельного матеріалу для біогенезу

макромолекул і достатню кількість АТФ для виживання і гомеостазу клітин [62]. У своїх дослідженнях Лю та ін. роблять висновок, що низька експресія регулятора автофагії 5 (ATG5), сприяє злоякісній трансформації меланоми на ранніх стадіях, запобігаючи BRAF-індукованому старінню [63]. Крім того, відсутність автофагії сприяє метастазуванню пухлини, стабілізуючи p62-акумулюючий протеїн фактора транскрипції 1 родини Twist (TWIST1) [64]. Згідно з наведеними вище даними можна зробити висновок, що, автофагія діє як супресор пухлинного розвитку при меланомі.

На патогенез меланоми також значною мірою впливає **порушення метаболізму амінокислот**, особливо серину, глутаміну та амінокислот, що мають розгалужений ланцюг. Було виявлено, що 3-фосфогліцератдегідрогеназа (ензим, що обмежує швидкість синтезу серину *de novo*) має значно більшу кількість копій у клітинах меланоми [65]. Також зазначається, що підвищення внутрішньоклітинного рівня серину в раціоні харчування або генетично-спровокована надекспресія 3-фосфогліцератдегідрогенази може досить ефективно сприяти прогресуванню меланоми [66]. Ще більш цікавим є факт, що цей ензим пригнічення синтезу серину відіграє ключову роль у метастазуванні меланоми в головний мозок. Метастатичні ураження меланоми чутливі до обмеження синтезу серину в середовищах з обмеженою кількістю поживних речовин, що робить 3-фосфогліцератдегідрогеназу однією з головних мішеней для таргетної терапії віддалених метастазів меланоми [67].

Загалом клітини меланоми мають високий ступінь метаболічної гнучкості і складну метаболічну мережу за участю декількох парадигм, включаючи гліколіз, мітохондрійне окисне фосфорилування, метаболізм ліпідів, автофагію і метаболізм амінокислот. Ці метаболічні особливості надають пухлинним клітинам перевагу над нормальними клітинами в плані росту, оскільки вони забезпечують як достатню кількість енергії, так і багато метаболічних проміжних продуктів для синтезу різних макромолекул,

необхідних для швидкого клітинного поділу [68].

1.3. ЕМП. Метастазування меланоми

Основним фактором, що впливає на погіршений прогноз пацієнтів з меланою, є метастазування пухлини [69]. Загалом, виникнення метастазів включає в себе наступні ключові етапи, а саме: інвазію, інтравазування, циркуляцію, екстравазування та колонізацію у вторинних пухлинних ділянках [70]. Ці етапи регулюються за участі унікальних біологічних принципів та молекулярних механізмів, що лежать в основі епітелійно-мезенхімного переходу [71].

Термін "ЕМП" означає клітинний процес, який зазвичай характеризується up-регулюванням мезенхімних маркерів, таких як N-кадгерин, віментин, та down-регулюванням епітелійних маркерів, таких як E-кадгерин, ламінін і цитокератини. З фізіологічної точки зору, ЕМП має фундаментальне значення для ембріогенезу, фіброзу та загоєння ран [71]. Коли ЕМП індукується при захворюванні на злоякісні новоутворення, морфологія пухлинних клітин змінюється з епітелійної на мезенхімну (веретеновидну), що надає їм більшої здатності до інвазії та міграції. ЕМП був визнаний ключовим фактором метастазування меланоми завдяки високопродуктивному профілю експресії генів [72]. Цей процес зокрема, регулюється такими канонічними онкогенними шляхами, як BRAF/MEK, АКТ/mTOR, Wnt/ β -катенін і TGF- β , перемиканням експресії ЕМП-індукувальних транскрипційних факторів (EMT-TF): MITF, SOX2, Snail, Slug, TWIST1, ZEB1/2, і NF- κ B [72].

1.3.1. Ключові маркери ЕМП у клітинах меланоми

Перетворювач сигналу та активатор транскрипції 3 (STAT3) є цитоплазматичним фактором транскрипції, що здатен керувати проліферацією клітин, їх диференціюванням, апоптозом, ангіогенезом, запаленням та імунними реакціями. У багатьох типах пухлин людини атипозна активація STAT3 викликає малігнізацію пухлинних клітин й наступну прогресію пухлинного росту через диференційний контроль експресії великої низки про-онкогенів. З іншого боку, активація STAT3 в імунних клітинах сприяє підвищенню рівня експресії імуносупресорних факторів. Багатьма дослідженнями підтверджено також існування регуляторної взаємозалежності між мікрооточенням пухлини та сигнальним шляхом STAT3. Це дозволяє зробити висновок, що розробка та застосування ефективних терапевтичних препаратів, що таргетно пригнічуватимуть експресію/активність STAT3, має перспективу значною мірою гальмувати прогресування пухлин та підсилювати протипухлинний імунітет онкохворих [73]. Також підтверджується роль фосфорилування STAT3 у посиленні міграції й інвазії меланомних клітин [74, 75]

Плакофіліни (Plakophilins, PKPs) - це протеїни цитоскелету, які залучаються до регулювання адгезивної здатності E-кадгерину. У людини ідентифіковано три типи плакофілінів: PKP, PKP1, PKP2 та PKP3. Вони локалізуються в клітинному ядрі, а також в десмосомах. PKP2 відіграє ключову роль у морфогенезі серця, а також має про-онкогенний ефект в пухлинних клітинах [76]. Даними Ванг та ін. підтверджується, що PKP1 асоційований з метастазуванням меланоми людини [77].

Віментин (Vimentin, Vim) є протеїном проміжних філаментів, а також маркером мезенхімних клітин, оскільки рівень його експресії зростає в процесі ЕМП [78].

Rac (~21 кДа) належить до низькомолекулярних GTPаз родини Rho. Як і інші G протеїни, Rac виконує функцію молекулярного перемикача, при цьому залишаючись неактивним у комплексі з GDP, і здатним до активації у

випадку звільнення GDP факторами обміну гуанілових нуклеотидів (GEF). Знаходячись у активованому стані, Ras регулює рух клітин, беручи участь у структурних перебудовах актинового цитоскелету і зміні динаміки цього процесу всередині клітини. Завдяки його функціональній ролі у контролі рухливості клітин, Ras також є одним із маркерів пухлинних клітин з мезенхімальним фенотипом [79].

1.4. Адаптерні протеїни. Загальна характеристика

Адаптерні протеїни складаються виключно з доменів і мотивів, які опосередковують молекулярні взаємодії. Завдяки цьому, вони можуть з'єднувати інші компоненти сигнальних мереж, такі як активовані рецептори клітинної поверхні, з ефекторами, формуючи таким чином складні регуляторні мережі. Окрім того вони демонструють надзвичайно високодинамічні характеристики, які дозволяють дуже точно контролювати потік інформації через утворені ними сигнальні мережі [80]. Конформаційна реорганізація та кооперативна взаємодія доменів у межах одного адаптера є основними характеристиками адаптерних протеїнів, що контролюють їх зв'язувальну активність. Важливою особливістю також є те, що, приміром, один адаптер може залучатись до кількох сигнальних підмереж одночасно, використовуючи кілька комбінацій партнерів по зв'язуванню. Для підвищення специфічності клітинних відповідей адаптери можуть також модулювати олігомеризацію сигнальних комплексів рецепторів, субклітинне розташування і тривалість сигнальних подій [81].

Різноманітні протеїн-зв'язувальні модулі, знайдені в адаптерних протеїнах, уможливають побудову великих мультимолекулярних сигнальних комплексів. Конкретні протеїни з'єднуються разом для передачі

клітинних сигналів, які змушують клітину належним чином реагувати на зміни навколишнього середовища. Тип модулів зв'язування, послідовність доменів або мотивів, які визначають специфічність зв'язування, субклітинна локалізація та близькість партнерів по зв'язуванню - все це формує специфічність сигналювання. Підсумовуючи усе вищесказане, можна зробити висновок, що адаптерні протеїни здатні контролювати клітинне сигналювання як у просторі, так і в часі [82].

1.4.1. Особливості будови адаптерних протеїнів, необхідні для виконання їх регуляторних функцій

Для того щоб ефективно виконувати свою функцію позиціонування інших компонентів сигнальних мереж адаптери повинні характеризуватись особливими рисами будови, такими як наявність доменів зв'язування, мотивів зв'язування та структурної гнучкості. Здебільшого домени зв'язування є консервативними ділянками з чіткою структурою та специфічністю. На відміну від них, мотиви зв'язування можуть бути точними «кишенями», визначеними вторинною і третинною структурою протеїну, або гнучкими короткими лінійними мотивами. Структурну гнучкість може бути утворена як внутрішньо неупорядкованими ділянками без чіткої тривимірної структури, так і посттрансляційними модифікаціями що динамічно змінюють структуру або властивості молекули [81].

Молекулярний шлях, в якому бере участь протеїн, визначається його **доменами зв'язування** [83]. Наприклад, шляхи фосфорилування тирозину в більшості реакцій імунних клітин залежать від Src-гомологічних доменів типу 2 (SH2). Еволюційно консервативні SH2-домени можуть розпізнавати фосфотирозинові мотиви, що продукуються кіназами. Таким чином приєднуючись до специфічних фосфотирозинових мотивів інших протеїнів,

SH2-домен надає адаптерові здатність "зчитувати" активність тирозинових кіназ.

Домени, залучені до зв'язування pTyr, що розпізнають специфічні фосфопептидні мотиви, плекстрин-гомологічні домени (PH), які зв'язують поліфосфоінозитиди, та SH3-домени, які зв'язують багаті на пролін мотиви, також є вартими уваги прикладами доменів взаємодії.

Вважається, що протеїни, які не мають стабільної тривимірної структури, мають **внутрішньо неупорядковані ділянки** [84]. Два десятиліття тому було виявлено, що неупорядковані ділянки більшості протеїнів еволюціонують швидше, ніж структуровані [85]. Існує значна кількість ознак, які характеризують важливість неупорядкованих ділянок, що визначають їхні унікальні функції у внутрішньоклітинному сигналюванні. Наприклад, внутрішньо неупорядковані ділянки можуть зумовлювати викривлення мембрани; формувати фазово розділені компартменти; містити адаптивні короткі лінійні мотиви, які можуть перекриватися або зазнавати посттрансляційної модифікації; слугувати гнучкими зв'язками між доменами; збільшувати гідродинамічний радіус протеїну; динамічно змінювати структуру протеїну; сприяти олігомеризації [86].

1.4.2 Структурно-функціональна організація адаптерного протеїну

Ruk/CIN85

Ruk/CIN85 є одним із важливих адаптерних протеїнів у ссавців. Все більше доказів свідчать, що Ruk/CIN85 необхідний для регулювання різних клітинних процесів, включаючи передачу сигналу, опосередкований везикулами транспорт, ремоделювання цитоскелету, апоптоз та вірусну інфекцію [86-88].

На своєму N-кінці цей адаптерний протеїн містить три SH3 домени, які, як відомо, опосередковують протеїно-протеїнові взаємодії шляхом

зв'язування з пролін-багатими мотивами. Ці три SH3-домени мають більшу подібність між собою, ніж з будь-якими іншими SH3-доменами. Спільні особливості їх структурно-функціональної організації свідчать про те, що вони можуть мати особливості зв'язування, які перекриваються між собою. Між другим і третім SH3-доменами знаходиться область, багата на залишки серину і треоніну, які можуть зазнавати фосфорилування. На N-кінці є також три послідовності FxDxF, які можуть використовуватись як центри зв'язування протеїна-адаптера клатрину AP2 [89]. За третім доменом SH3 у Ruk/CIN85 знаходиться ділянка, де локалізовані 4 блоки пролін-багатих мотивів, які є потенційними центрами розпізнавання для інших протеїнів, що містять SH3-домени. С-кінцева частина адаптеру є глобулярною, а її останні 50 амінокислотних залишків демонструють високу спорідненість до суперспіралізованої структури "coiled-coil". Такі структури беруть участь у гомотипних і гетеротипних міжпротеїнових взаємодіях [90].

У гризунів і людей Ruk/CIN85 експресується у вигляді кількох молекулярних форм, які є результатом альтернативного сплайсингу або використання альтернативних ATG-центрів ініціації транскрипції (Рис. 1).

Havrylov et al.

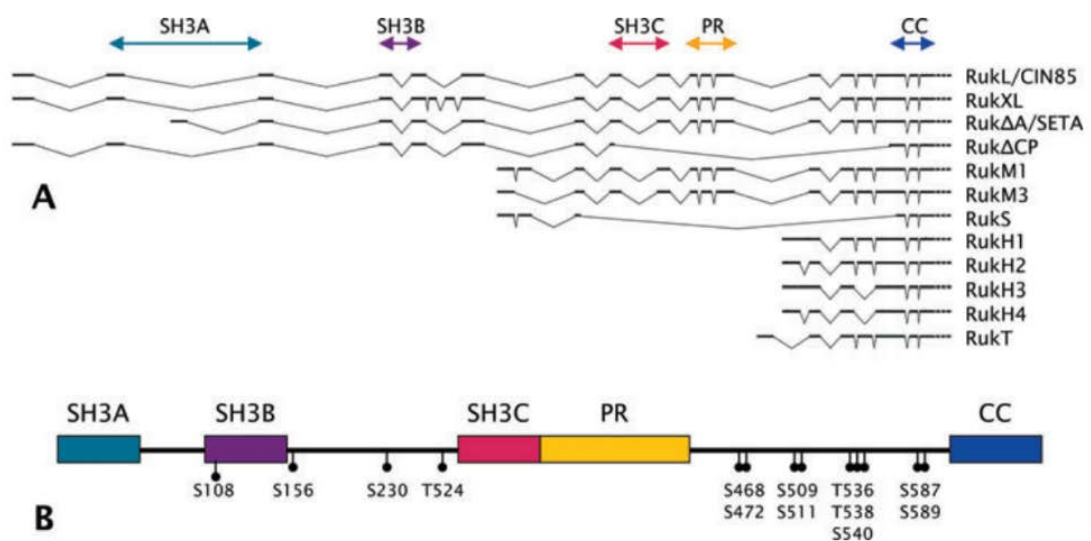


Рис. 1 - Доменна організація та молекулярні форми адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (за [98]).

А – Будова транскриптів відомих молекулярних форм Ruk/CIN85. Б – будова протеїну Ruk/CIN85, крапками позначені центри посттрансляційної модифікації (фосфорилування) Ruk/CIN85. Позначення: PR – збагачений на пролін район, SS – суперспіралізований домен, S – залишок амінокислоти серину, T – залишок амінокислоти треоніну

Більшість виявлених і охарактеризованих молекулярних варіантів Ruk/CIN85 у гризунів і людей є коротшими, без одного, двох або всіх SH3-доменів з N-кінця [98].

1.4.3. Роль Ruk/CIN85 у контролі малігнізації пухлинних клітин

Результати багатьох досліджень вказують на те, що Ruk/CIN85 на регуляторному рівні може сприяти малігнізації та стимулювати інвазивність ракових клітин кількома різними способами. Ідея про те, що Ruk/CIN85 потенційно може сприяти канцерогенезу, виходить із спостереження, що молекулярний ортолог Ruk/CIN85, який називають SETA (SH3-вмісний протеїн, що експресується в трансформованих астроцитах), був ідентифікований приблизно у половині гліом людини, найбільше в астроцитомах та мультиформних гліобластомах [91]. У SETA відсутній N-кінцевий SH3-домен і, як правило, в нормі він слабо експресується в тканинах

мозку дорослих особин. Нещодавно також було отримано переконливі докази того, що Ruk/CIN85 може безпосередньо сприяти інвазивній поведінці ракових клітин. Було продемонстровано високі рівні експресії Ruk/CIN85 в інвазивних клітинах раку молочної залози і виявлено, що цей адаптер може бути важливим компонентом інвадоподій. Інвадоподії – це адгезивні збагачені актином мембранні вип'ячування, які опосередковують здатність ракових клітин проникати через позаклітинний матрикс і навколишні

тканини [92].

Відсутність знань що стосуються біологічної значущості як рівнів експресії, так і співвідношення різних молекулярних форм Ruk/CIN85 ускладнює дослідження його ролі в ракових клітинах. Важливо з'ясувати, як саме і наскільки сильно впливає експресія цього адаптеру на рівень малігнізації ракових клітин. Раніше у відділі Сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії імені О.В. Палладіна було підтверджено ключову роль цього протеїну в канцерогенезі – посиленні рухливості клітин, інвазивності та метастатичного потенціалу. Також було показано, що високі рівні експресії Ruk/CIN85 виявляються в меланомах та інших типах пухлин людини. Крім того, було продемонстровано, що Ruk/CIN85 бере участь у контролі епітелійно-мезенхімного переходу (EMT), який є ключовим процесом у прогресуванні раку [93].

1.4.4. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 як мішень у таргетній терапії

Участь Ruk/CIN85 у контролі інвазії ракових клітин робить його перспективною мішенню для антиметастатичної терапії. SH3-домени цього адаптера, що опосередковують більшість взаємодій між Ruk/CIN85 та іншими протеїнами, виглядають найбільш очевидними мішенями для таргетної терапії. Проникні для клітин пептидні ліганди для SH3-доменів Ruk/CIN85 вже успішно використовуються для зниження інвазивності клітин раку молочної залози *in vitro* [92]. Пептидні ліганди, що блокують SH3-домени інших адаптерів також були успішно використані як протипухлинні агенти [94, 95]. Отже, проникні для клітин пептиди або інші сполуки, призначені для блокування SH3-доменів Ruk/CIN85, в принципі можуть використовуватися як антиметастатичні препарати.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Культивування еукаріотичних клітин

Для аналізу впливу різних рівнів експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на розвиток ознак малігнізації меланомних клітин на базі відділу Сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України з використанням лентивірусної технології було створено клітинні сублінії B16-F10 меланоми миші зі стабільно підвищеною і зниженою експресією досліджуваного адаптеру. Створення сингенної мишачої моделі дало змогу подолати недоліки використання імунодефіцитних мишей [97,98]. Для досліджень було відібрано дві сублінії (Up7 та Up21) клітин B16-F10 з надекспресією Ruk/CIN85, кон'югованого з GFP (GFP-Ruk/CIN85) та одну сублінію з пригніченою експресією (Down), що була створена за допомогою shRNA-інтерференції (Рис. 2.1.). Для клітин з up/down-регулюванням Ruk/CIN85 були створені контрольні сублінії Mock і Scr, відповідно.

З мікрофотографій чітко видно, що в клітинній сублінії Mock клітин B16 має місце гомогенний патерн розподілення протеїну GFP у цитоплазматичному компартменті, тоді як в клітинах з надекспресією GFP-Ruk/CIN85 спостерігається переважно точкоподібний розподіл відповідно до ролі цього адаптерного протеїну у транспорті ендоцитних везикул.

Клітини меланоми лінії B16-F10 та їх сублінії з підвищеним і зниженим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (що були створені за допомогою лентивірусної технології) культивували в середовищі RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®, Німеччина), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FCS HyClone, Німеччина), 50 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ L-глутаміну, при температурі 37°C, 5% CO₂ та у зволоженій атмосфері. Клітини лінії B16-F10 пасажували у співвідношенні

1:10 кожні 2-3 дні при досягненні 70-80% конфлюенту.

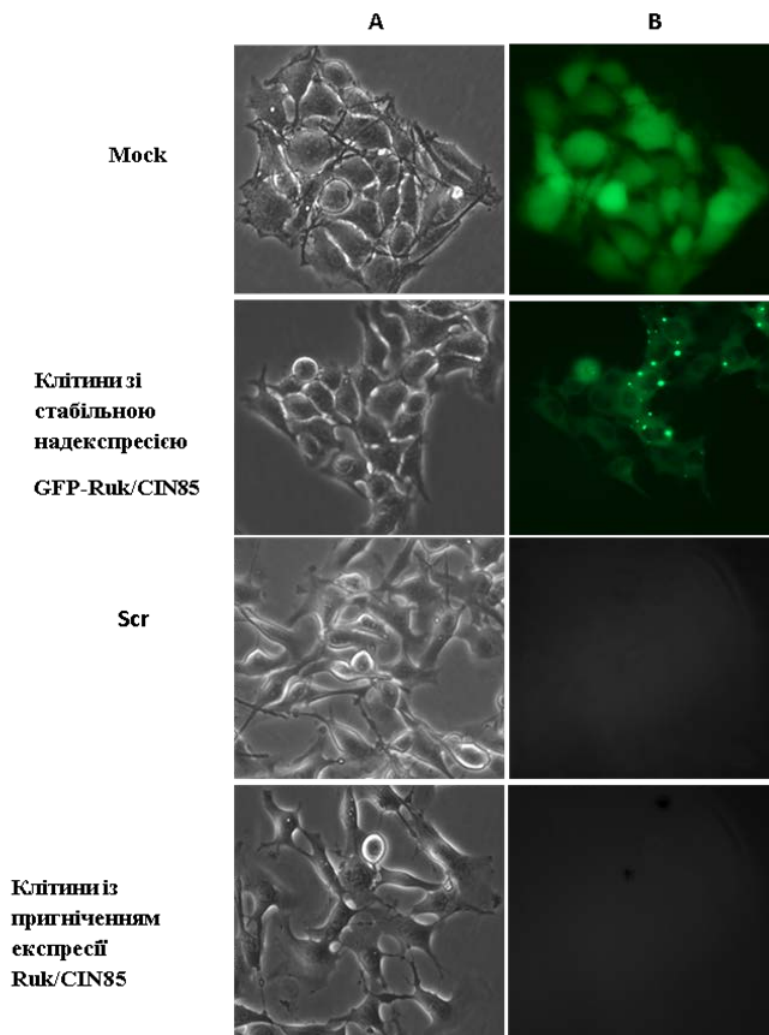


Рис. 2.1 - Флуоресцентні та фазово-контрастні зображення клітин B16-F10 меланому миші з підвищеним та пригніченим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Досліди проводились з використанням шести клітинних субліній:

- 1) Wild type
- 2) Mock
- 3) Scramble
- 4) Down (субклон з пониженим рівнем експресії досліджуваного протеїну)
- 5) Up7 (субклон з підвищеним рівнем експресії досліджуваного протеїну)

б) Up21 (субклон з підвищеним рівнем експресії досліджуваного протеїну)

Для того щоб підтвердити штучно підвищений та занижений вміст досліджуваного адаптерного протеїну у створених клітинних сублініях було проведено вестерн-блот аналіз з використанням моноклональних N-кінцевих антитіл до Ruk/CIN85 (Рис.2.2.). За результатами вестерн-блоту можемо спостерігати, що вміст Ruk/CIN85 в клітинах субклонів 21Up та 7Up зріс у 43,5 і 37 разів, відповідно. В контрольних клітинах Mock і Scr, так само як і в Down за використаних експериментальних умов позитивного сигналу не було виявлено.

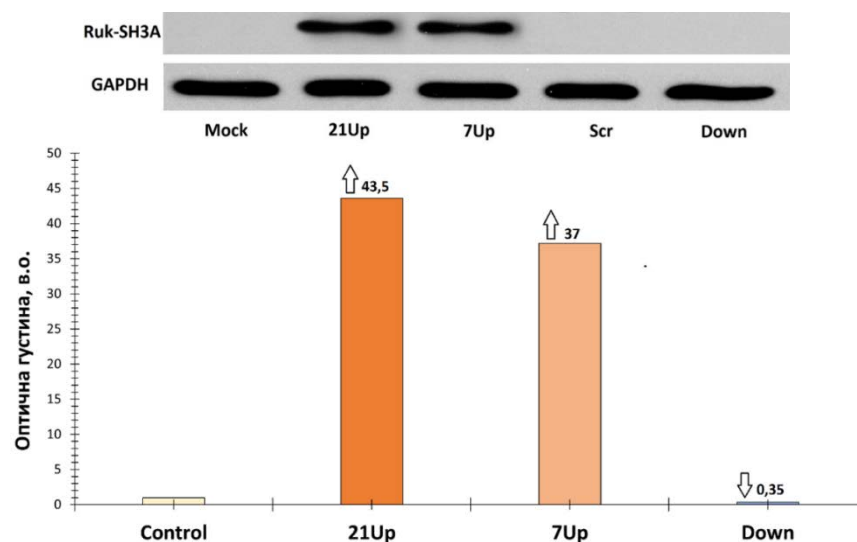


Рис.2.2 - Аналіз вмісту Ruk/CIN85 у субклонах клітин меланоми миші В16 з up/down-регулюванням досліджуваного адаптера. Вестерн-блот аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин отриманих субклонів.

2.2. Дослідження проліферативної активності клітин В16-F10

Проліферативну активність клітин В16-F10 оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Для цього використовували 96-лункові планшети, у які висівали

клітини V16-F10 ($1 \cdot 10^3$ на лунку).

Культивування клітин проводили впродовж 24-48 годин. Після культивування клітин до лунок додавали МТТ-реактив (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліумбромід) (0.4 мг/мл) з подальшою інкубацією впродовж 1 години при 37°C.

Наступний крок полягав у центрифугуванні планшетів при 4000 g. Середовище відбирали, а кристали, що утворились, розчиняли у ДМСО (диметилсульфоксид) з подальшою спектрофотометрією при довжині хвилі 570/610 нм на спектрофотометрі μ Quant (BioTEK, США). Результати МТТ-тесту представляли у відсотках відносно контролю.

2.3. Дослідження міграційного потенціалу клітин V16-F10

Міграційний потенціал досліджуваних клітинних ліній аналізували за допомогою тесту на «заростання подряпини» у клітинному моношарі. Клітини V16-F10 висівали в 6-лункові чашки Петрі і вирощували до 80% конфлюенту в середовищі RPMI 1640, що містило 10% FCS.

Подряпину робили вручну швидким проведенням по моношару носиком для автоматичних піпеток на 200 мкл. Контроль загоєння подряпини проводили через 24 та 48 годин за допомогою фазово-контрастної мікроскопії.

Відстань, на яку мігрували клітини, вимірювали за допомогою програмного забезпечення для обробки зображень (QuickPHOTO Camera 2.2).

2.4. Екстрагування протеїну та підготовка зразків для Вестерн-блотингу

Клітини субліній В16 промивали буферним розчином PBS, після чого проводили лізування охолодженим 50 мМ Трис-НСl рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 % тритону X-100, що містив інгібітори протеаз/фосфатаз, 1 мМ ортованадат натрію, 50 мМ NaF, 2 мМ EDTA, впродовж 30 хв на льоду. Осад, осаджували за допомогою ультрацентрифугування при 10000 g впродовж 30 хв при 4° С. Далі, концентрацію протеїну в отриманих супернатантах визначали за допомогою комерційного набору для аналізу концентрації протеїну «Pierce™ BSA» («Pierce Biotechnology», Rockford, IL, США), BSA використовується як стандарт. Потім клітинні лізати «проварювали» при 95°С впродовж 5 хв з буферним розчином для зразків Леммлі (62,5 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 1 мМ EDTA, 2 % додецилсульфат натрію, 5 % β меркаптоетанолу, 10 % гліцерину, 0,4 % бромфенолу синього). Лізати в подальшому використовували для проведення електрофорезу протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналізу та зберігали при температурі не вище -70 °С.

2.5. Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз

Гель-електрофорез протеїнів проводили з використанням 10 % гелю для розділення протеїнів та 4,5 % гелю для концентрування відповідно. Для їх приготування використовували наступні реактиви: 30% акриламід та 0,8 % метиленбісакриламід розчин мономерів «АА», об'ємом 2 мл та 0,3 мл для розділяючого та концентруючого буферних розчинів, відповідно; 3 М Трис-НСl, рН 8,8 для розділяючого гелю, об'єм 0,75 мл; 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8, для концентруючого гелю, об'єм 0,5 мл; 10 % розчин ДСН, об'ємом 0,06 мл та 0,02 мл для розділяючого та концентруючого буферних розчинів, відповідно; 10 % розчин АПС (персульфату амонію), об'ємом 0,06 мл та 0,02 мл для розділяючого та концентруючого буферних розчинів, відповідно; ТЕМЕД (тетраметилетилендіамін) об'ємом 6 мкл для розділяючого та 2 мкл

для концентруючого буферних розчинів.

Внесення лізатів клітин на дно лунок у концентруючому гелі виконували з використанням мікрошприців. Електрофоретичне розділення протеїнів проводили за сили струму 15-25 мА.

Для подальшого аналізу, протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану з використанням буферного розчину для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, рН 8,3, 20 % метанол, 0,1 % ДСН) впродовж 90 хв із силою струму, що дорівнювала 250 мА.

Для блокування неспецифічних вільних центрів здійснювали інкубування мембрани у блокувальному розчині, 5% знежиреному молоці, впродовж 1 год при кімнатній температурі. Далі мембрану відмивали від молока, використовуючи PBST, після чого інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 12-16 год при 4°C. Відповідні вторинні козячі антитіла («Promega», США) після відмивки мембрани від первинних антитіл, додавали у розведенні 1:2000 у молоці, після чого інкубували впродовж 1 год за кімнатної температури.

Фінальну відмивку мембрани виконували, використовуючи PBST, після чого проводили детекцію імунореактивних смуг за допомогою комерційного набору для підсиленої хемілюмінесценції ECL («enhanced chemiluminescence kit» («Amersham Pharmacia Biotech», Велика Британія)). Мембрани експонували з рентгенівськими плівками, час експозиції визначали за інтенсивністю хемілюмінесценції тривалістю від 1 хв до 20 хв. Після цього, рентгенівську плівку проявляли у фенідон-гідрохіноновому проявнику, промивали у стічній воді та фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення «Gel-Pro Analyzer 3.0».

2.6. Статистична обробка результатів досліджень

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Origin та MS Excel. Експериментальні результати подано як середнє арифметичне та стандартне відхилення вибірки. Достовірність змін оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Вибірка кожного дослідження становила мінімум 3 повтори ($n=3$), для якої проводили обчислення середнього значення вибірки (M) та стандартного відхилення (σ). Різницю між отриманими групами вважали достовірною при $p < 0.05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Модулювання життєздатності клітин меланоми миші залежно від рівня експресії Ruk/CIN85

Згідно з даними, отриманими за допомогою МТТ тесту, на 24-у годину було виявлено суттєве зростання проліферативної активності субклонів з підвищеним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Up7 і Up21). Для субклову Up7 проліферативна активність зросла в 1,6 разів, а для субклову Up21 - у 1,8 разів порівняно з контролем Моск. Водночас, на 48-у годину з моменту початку експерименту, після досягнення клітинами конфлюенту, виявилось, що життєздатність клітин досліджуваних субліній майже не відрізнялась від контрольних значень (Рис.3.1).

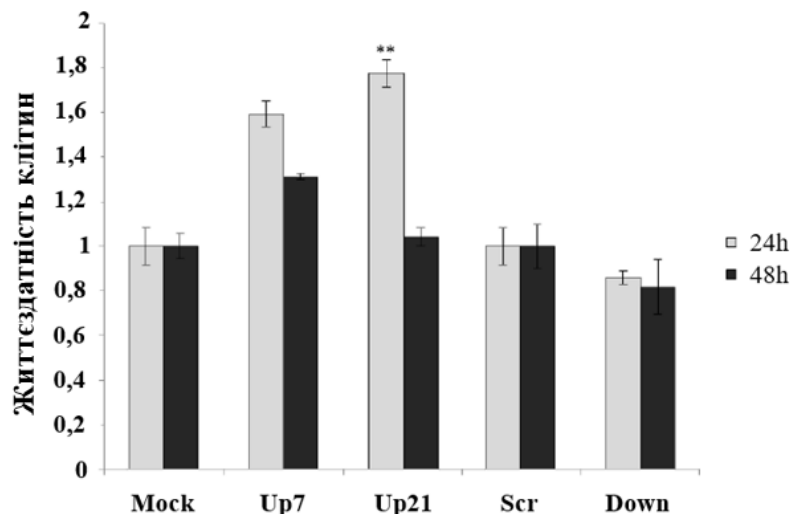


Рис. 3.1 Модулювання життєздатності клітин B16 меланоми миші залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. (Up7, Up21 – субклони клітин B16 із надмірною експресією Ruk/CIN85 та відповідні контрольні клітини Моск; Down – клітини B16 з пригніченим рівнем

експресії Ruk/CIN85 та відповідні контрольні клітини Scr)

При аналізі змін проліферативної активності сублінії зі зниженою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Down), статистично значущих змін у порівнянні з контролем Scr не було виявлено.

Наведені дані свідчать про можливий регуляторний вплив досліджуваного протеїну Ruk/CIN85 на життєздатність пухлинних клітин. Беручи до уваги той факт, що цей вплив може здійснюватися під час міграції пухлинних клітин до інших тканин організму – тобто метастазування клітин меланоми, можна припустити можливу роль Ruk/CIN85 у контролі епітелійно-мезенхімного переходу. Тобто підкріплюється гіпотеза, що роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 за умов надекспресії полягає саме у регулюванні сигнальних механізмів, що контролюють процес малігнізації пухлинних клітин шляхом регуляції ЕМП. Таким чином, проведені дослідження дають можливість розглядати досліджуваний адаптер як потенційну мішень для винайдення новітніх підходів до терапії меланоми на стадії метастазування.

3.2. Модулювання міграційного потенціалу клітин меланоми миші залежно від рівня експресії Ruk/CIN85

Рухливість клітин B16 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 оцінювали за швидкістю заростання «подряпини» у клітинному моношарі *in vitro*. Виявлено, що клітини B16 субклонів Up7 і Up21 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються зростанням коефіцієнта міграції майже вдвічі, порівняно з контролем (Рис. 3.2). Цікаво, що клітини RukUp заповнювали «подряпину» у дисперсний спосіб, тоді як клітини Mock мали тенденцію заповнювати її неперервним фронтом, що корелює з морфологічними особливостями цих субклонів. У той же час, нокдаун Ruk/CIN85 у клітинах

B16 призвів до зниження їх міграційної активності приблизно на 30% (Рис. 3.2). Таким чином, ці дані вказують на те, що Ruk/CIN85 може контролювати механізми, які регулюють міграцію клітин меланоми шкіри.

Отже, у цьому дослідженні було показано, що за умов високих рівнів експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах меланоми миші лінії B16 спостерігається посилення ознак малігнізації, а саме, підвищення проліферативної активності та міграційного потенціалу, що корелює з їх потенційною здатністю до метастазування. Також це може свідчити про потенційну роль досліджуваного адаптера у розвитку резистентності клітин раку шкіри до дії терапевтичних препаратів.

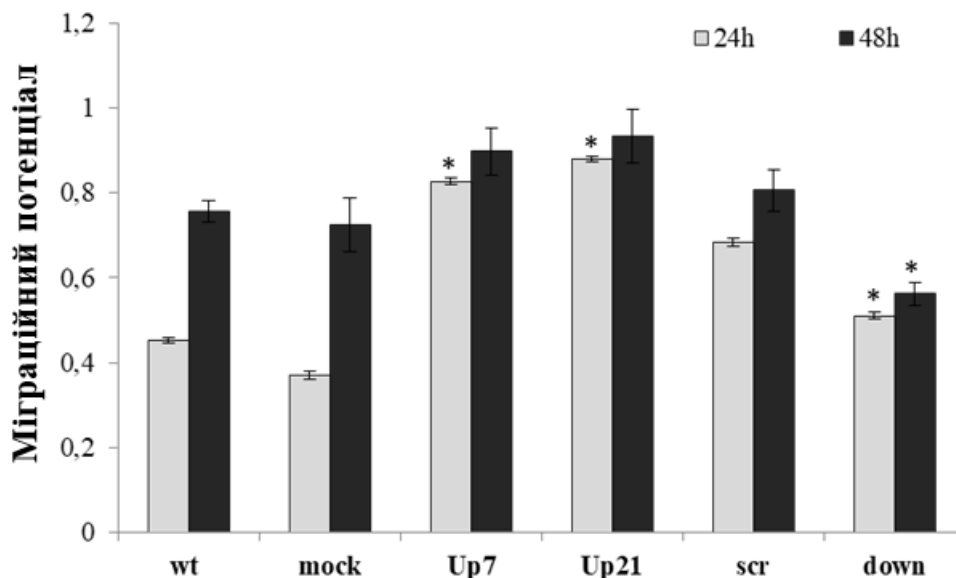


Рис. 3.2 Модулювання міграційного потенціалу клітин меланоми B16 миші залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. (Up7, Up21 – субклони клітин B16 з підвищеною експресією Ruk/CIN85 та відповідні контрольні клітини Mock; Down – клітини B16 з пригніченим рівнем експресії Ruk/CIN85 та відповідні контрольні клітини Scr

Отримані дані свідчать про те, що надекспресія Ruk/CIN85 робить клітини B16 більш інвазивними, змінюючи їх фенотип на більш агресивний,

що є однією з основних характеристик перемикання клітинного фенотипу з епітелійного на мезенхімний під час ЕПМ. Тому можна зробити припущення, що цей протеїн бере участь у регулюванні епітелійно-мезенхімного переходу. Але, не зважаючи на це, конкретна участь Ruk/CIN85 у процесі онкогенезу поки залишається все ж недостатньо з'ясованою. Результати представленого дослідження також підтверджують попередні спостереження щодо того, що первинні меланоми шкіри на стадіях прогресії пухлинного росту зазвичай експресують великі кількості Ruk/CIN85 [97]. Також, вплив down-регулювання цього адаптеру на зниження міграційної активності клітин меланоми дає нам ще одну причину розглядати його як потенційну мішень для досліджень у сфері розробки ліків.

3.3 Дослідження стану активності й вмісту ключових ланок сигнальних мереж клітин меланоми миші B16, залучених до контролю міграційної активності й інвазивного потенціалу, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

В процесі роботи були проаналізовані такі компоненти сигнальних мереж:

- Рівні активних фосфорильованих форм ERK1/2 кіназ, Jnk/SAPK кінази, АКТ та mTOR кіназ;
- Маркери ЕМП, такі як протеїни віментин, плакофілін, Ras та фосфорильована форма транскрипційного фактора STAT3.

3.3.1. Зміни внутрішньоклітинного вмісту активних форм сигнальних протеїнів в клітинах меланоми миші лінії B16 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Спершу було проведено аналіз вмісту фосфорильованих форм кінази ERK1/2 (Рис. 3.3. (А)). Було встановлено, що сублінія 7Up характеризуються незначним (в приблизно 0.6 рази) зменшеним внутрішньоклітинним вмістом фосфорильованої форми ERK у порівнянні з контрольною сублінією. Для іншої сублінії 21Up – теж спостерігали невелике зменшення вмісту кіназних фосфоформ. В той же час для сублінії зі зниженою експресією досліджуваного адаптера не виявлявлено суттєвих змін вмісту фосфорильованої форми ERK кінази.

Перспективними є результати для активної фосфорильованої форми Jnk/SAPK кінази (Рис.3.3. (Б)): її вміст зростав у сублініях 21Up та 7Up у 11 і 6 разів, відповідно. Альтернативно - у клітинах сублінії з пониженою експресією Ruk/CIN85 (Down) вміст фосфорильованої форми досліджуваної кінази падає до рівня 0,7 порівняно з контролем.

Отже, адаптерний протеїн Ruk/CIN85 може бути залученим до контролю внутрішньоклітинної сигналізації через модуляцію гіперактивації протеїнів, залучених до MAP-кіназного каскаду JNK/SAPK. Як вже зазначалось у літературному огляді, згаданий сигнальний шлях відіграє ключову роль у контролі таких клітинних процесів як підвищення виживання, трансформація та диференціація. Це підкріплює наведені вище результати МТТ-тесту та тесту на інвазію.

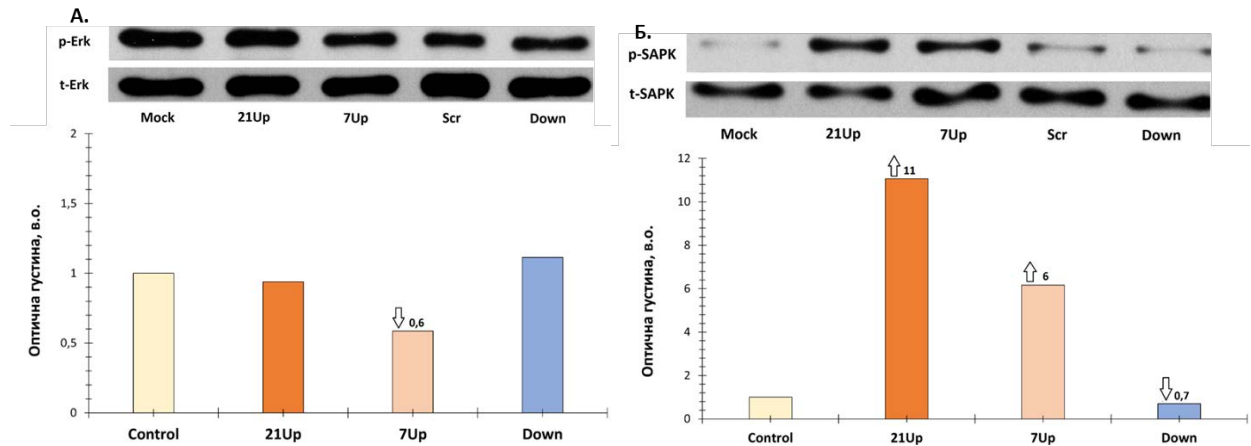


Рис. 3.3 Вестерн-блот аналіз вмісту фосфорильованих активних форм форм Erk1/2 кіназ (А) та Jnk/SAPK кінази (Б)

Також у роботі було проаналізовано вміст інших важливих компонентів сигнальних шляхів, залучених до контролю прогресування меланоми: фосфорильованих форм АКТ та mTOR кіназ (Рис. 3.4. (А та Б відповідно)). Аналізуючи дані вестерн-блотингу можна спостерігати незначні зміни вмісту активних форм цих кіназ, що є аналогічними до такої для ERK1/2: вміст р-Акт знижується у 0.75 рази для 21Up, порівняно з контролем, в той час як у клітинах сублінії Down спостерігається слабке зростання вмісту досліджуваних кіназних форм у 1.27 рази. Вміст mTOR кінази у клітинній сублінії 7Up знижується у 0.7 рази порівняно з контролем. Водночас, клітинах сублінії з пониженою експресією досліджуваного адаптера – зростає у 1.3 рази.

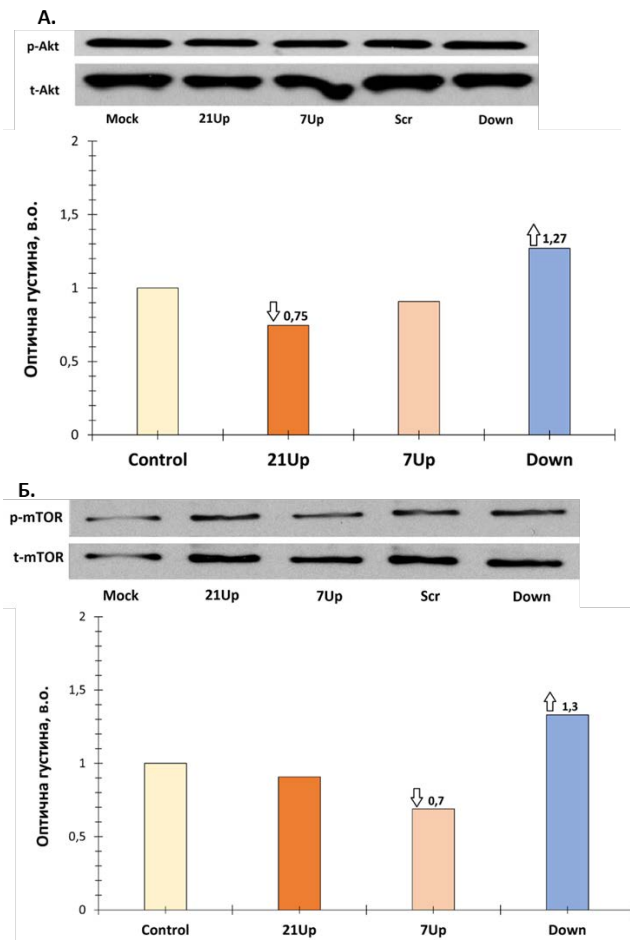


Рис. 3.4 Вестерн-блот аналіз вмісту фосфорильованих активних форм Акт кінази (А) та mTOR кінази (Б)

3.3.2. Експресія молекулярних маркерів ЕМТ в клітинах меланому миші лінії В16 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Вміст молекулярних маркерів епітелійно-мезенхімного переходу було охарактеризовано за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням антитіл проти основних маркерів цього процесу: віментину, плакофіліну, Rac та pSTAT3.

Було показано, що сублінії клітин меланому миші лінії В16 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються зростанням внутрішньоклітинного вмісту молекулярних маркерів ЕМП:

- віментину – зростання у 1.9 та 2.1 рази для 21Up та 7Up відповідно (Рис.3.5. (А));
- плакофіліну - зростання у 1.4 та 1.75 рази для 21Up та 7Up, зниження до 0.7 для Down (Рис.3.5. (Б));
- Rac - зростання у 1.9 та 1.3 рази для 21Up та 7Up, зниження до 0.17 для Down (Рис. 3.6. (А));
- pSTAT3 (зростання у 1.9 та 2.1 рази рази для 21Up та 7Up, зниження до 0.65 для Down). (Рис. 3.6. (Б)).

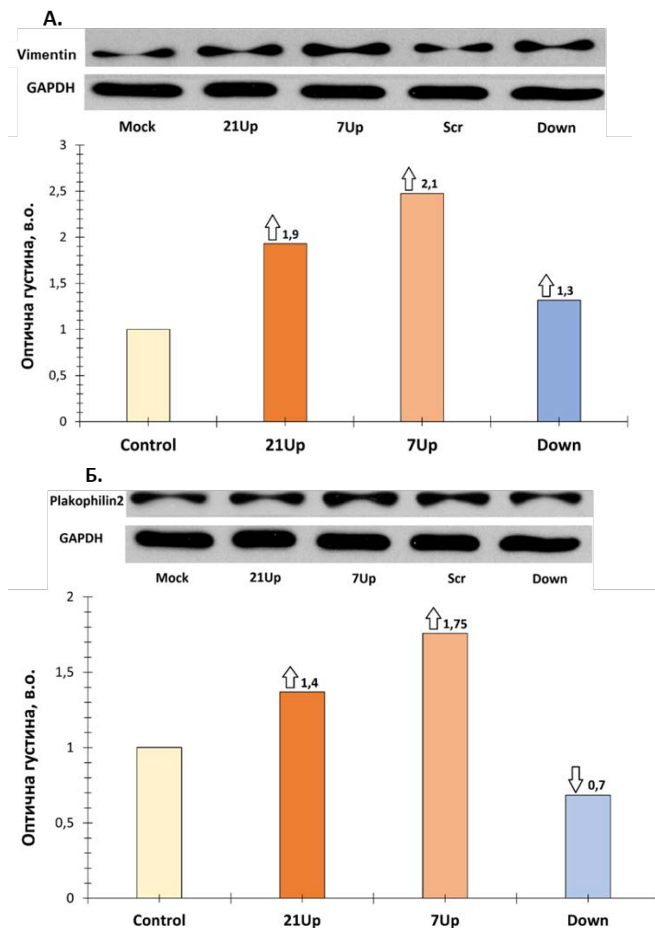


Рис. 3.5 Вестерн-блот аналіз вмісту маркерів ЕМТ: Vimentin (А) та Plakophilin (Б)

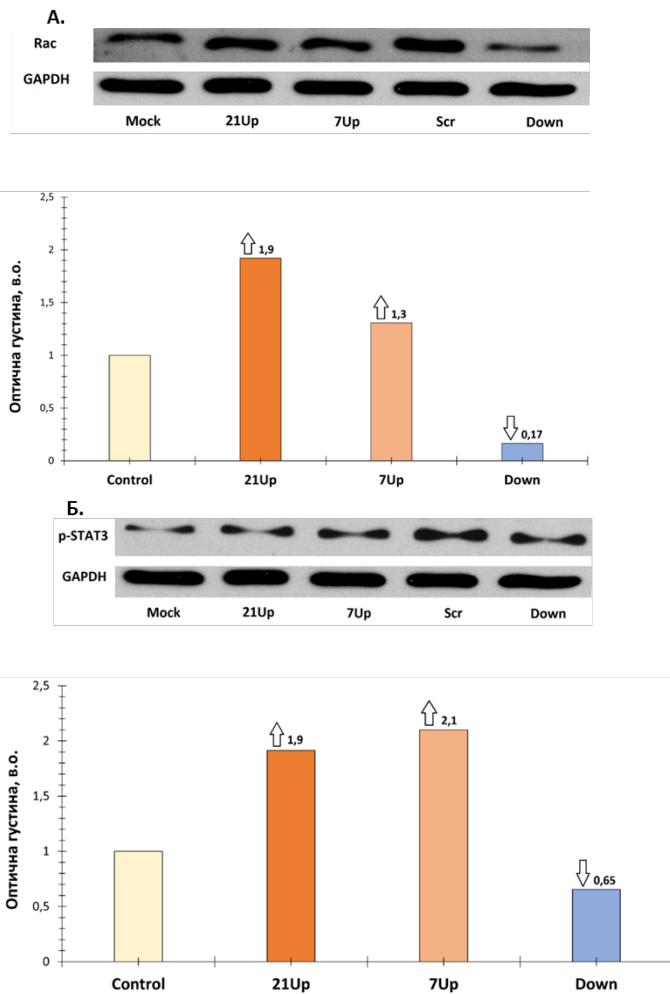


Рис. 3.6 Вестерн-блот аналіз вмісту маркерів ЕМП: Rac (**A**) та pSTAT3 (**B**)

Як вже зазначалося в огляді літератури, клітинний профіль, за якого відбувається зростання вмісту аналізованих факторів ЕМП, асоціюється з агресивним фенотипом пухлинних клітин. Зокрема індукування ЕМП, що є обов'язковою передумовою для посилення міграції та метастазування ракових клітин епітелійного походження корелює з поганим прогнозом видужування хворих. Тому, регуляторна взаємозалежність між рівнем експресії Ruk/CIN85 та ЕМП може відігравати ключову роль у перемиканні профілю ракових клітин з проліферативного на інвазійний.

Таким чином можна стверджувати, що підвищений рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 може стимулювати ЕМП у клітинах меланоми миші лінії B16, оскільки він корелює з посиленням експресії ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу, що забезпечують

ремоделювання пухлинної клітини з набуттям рухливості та інвазивності.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 призводить до збільшення проліферативної активності клітин меланоми у порівнянні з контрольними сублініями клітин.
2. Встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 зумовлює суттєве підвищення міграційної активності клітин B16 меланоми шкіри, тоді як пригнічення експресії цього протеїну призводить до протилежних результатів.
3. Доведено, що посилення експресії ключових маркерів ЕМП корелює з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах меланоми миші лінії B16. Водночас, була показана чітка взаємозалежність між змінами вмісту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та важливих компонентів сигнальних шляхів, що залучені до регулювання ЕМП у клітинах меланоми. Ця залежність підкріплює результати попередніх експериментів аналізу життєздатності та міграційного потенціалу досліджуваних клітинних ліній.

Отримані результати підтверджують запропоновану гіпотезу про регуляторний вплив експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на малігнізацію та набуття інвазивності клітинами меланоми шляхом керування процесом епітелійно-мезенхімного переходу. Це дозволяє розглядати досліджуваний адаптер як одну з потенційних мішеней для розробки нових лікарських препаратів таргетної терапії меланоми у майбутньому.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25220842.
2. Langeberg LK, Scott JD. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Apr;16(4):232-44. doi: 10.1038/nrm3966. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25785716; PMCID: PMC4722875.
3. Mayevska O, Shuvayeva H, Igumentseva N, Havrylov S, Basaraba O, Bobak Y, Barska M, Volod'ko N, Baranska J, Buchman V, Drobot L. Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma. *Exp Oncol*. 2006 Dec;28(4):275-81. PMID: 17285110.
4. Thomas NE, Berwick M, Cordeiro-Stone M. Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *J Invest Dermatol*. 2006 Aug;126(8):1693-6. doi: 10.1038/sj.jid.5700458. PMID: 16845408.
5. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009 Aug;20 Suppl 6(Suppl 6):vi1-7. doi: 10.1093/annonc/mdp252. PMID: 19617292; PMCID: PMC2712590.
6. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*. 1997 Oct 9;73(2):198-203. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19971009)73:2<198::aid-ijc6>3.0.co;2-r. PMID: 9335442.
7. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):45-60. doi: 10.1016/j.ejca.2004.10.016. PMID: 15617990.
8. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with

cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer*. 2007 Mar 1;120(5):1116-22. doi: 10.1002/ijc.22453. Erratum in: *Int J Cancer*. 2007 Jun 1;120(11):2526. PMID: 17131335.

9. Stern RS; PUVA Follow up Study. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*. 2001 May;44(5):755-61. doi: 10.1067/mjd.2001.114576. PMID: 11312420.

10. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 2003 Dec;139(12):1620-4; discussion 1624. doi: 10.1001/archderm.139.12.1620. PMID: 14676081.

11. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1987 Sep;17(3):459-68. doi: 10.1016/s0190-9622(87)70230-8. PMID: 3655025.

12. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005 Jan;41(1):28-44. doi: 10.1016/j.ejca.2004.10.015. PMID: 15617989.

13. Watt AJ, Kotsis SV, Chung KC. Risk of melanoma arising in large congenital melanocytic nevi: a systematic review. *Plast Reconstr Surg*. 2004 Jun;113(7):1968-74. doi: 10.1097/01.prs.0000122209.10277.2a. PMID: 15253185.

14. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Feb;52(2):197-203. doi: 10.1016/j.jaad.2004.07.020. PMID: 15692463.

15. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagebiel RW, Guerry D 4th, Clark WH Jr. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*. 1997 May 14;277(18):1439-44. PMID: 9145715.

16. Tsao H, Niendorf K. Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Nov;51(5):803-8. doi: 10.1016/j.jaad.2004.04.045. PMID:

15523363.

17. Stam-Posthuma JJ, van Duinen C, Scheffer E, Vink J, Bergman W. Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Jan;44(1):22-7. doi: 10.1067/mjd.2001.110878. PMID: 11148472.

18. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams RR, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET; Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2007 Mar;82(3):364-80. doi: 10.4065/82.3.364. PMID: 17352373.

19. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer*. 2005 Aug 10;116(1):144-9. doi: 10.1002/ijc.21001. PMID: 15761869.

20. Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):501-13, ix. doi: 10.1016/j.hoc.2009.03.013. PMID: 19464599.

21. Mann GJ, Pupo GM, Campain AE, Carter CD, Schramm SJ, Pianova S, Gerega SK, De Silva C, Lai K, Wilmott JS, Synnott M, Hersey P, Kefford RF, Thompson JF, Yang YH, Scolyer RA. BRAF mutation, NRAS mutation, and the absence of an immune-related expressed gene profile predict poor outcome in patients with stage III melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013 Feb;133(2):509-17. doi: 10.1038/jid.2012.283. Epub 2012 Aug 30. PMID: 22931913.

22. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1239-46. doi: 10.1200/JCO.2010.32.4327. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21343559.

23. Nassar KW, Tan AC. The mutational landscape of mucosal melanoma. *Semin Cancer Biol*. 2020 Apr;61:139-148. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.013.

Epub 2019 Oct 23. PMID: 31655118; PMCID: PMC7078020.

24. Yeh I, Jorgenson E, Shen L, Xu M, North JP, Shain AH, Reuss D, Wu H, Robinson WA, Olshen A, von Deimling A, Kwok PY, Bastian BC, Asgari MM. Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Oct 1;111(10):1068-1077. doi: 10.1093/jnci/djz005. PMID: 30657954; PMCID: PMC6792090.

25. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain.* 2005 Mar;114(1-2):149-59. doi: 10.1016/j.pain.2004.12.022. Epub 2005 Jan 26. PMID: 15733640.

26. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 2003 Feb 15;63(4):756-9. PMID: 12591721.

27. Alexaki VI, Javelaud D, Mauviel A. JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Aug;21(4):429-38. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00466.x. Epub 2008 Jun 6. PMID: 18541008.

28. Gao W, Sun W, Qu B, Cardona CJ, Powell K, Wegner M, Shi Y, Xing Z. Distinct regulation of host responses by ERK and JNK MAP kinases in swine macrophages infected with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *PLoS One.* 2012;7(1):e30328. doi: 10.1371/journal.pone.0030328. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22279582; PMCID: PMC3261190.

29. Kim JW, Kim MJ, Kim KJ, Yun HJ, Chae JS, Hwang SG, Chang TS, Park HS, Lee KW, Han PL, Cho SG, Kim TW, Choi EJ. Notch interferes with the scaffold function of JNK-interacting protein 1 to inhibit the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 4;102(40):14308-13. doi: 10.1073/pnas.0501600102. Epub 2005 Sep 22. PMID: 16179393; PMCID: PMC1242280.

30. Stark M, Hayward N. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2632-42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4152. PMID: 17363583.
31. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Jun;24(2):273-85. doi: 10.1007/s10555-005-1577-9. PMID: 15986137.
32. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7002-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1399. PMID: 15466193.
33. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* 2008 Sep;32(9):1291-8. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181658c14. PMID: 18636017.
34. Graf SA, Busch C, Bosserhoff AK, Besch R, Berking C. SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *J Invest Dermatol.* 2014 Aug;134(8):2212-2220. doi: 10.1038/jid.2014.128. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24608986.
35. Han S, Ren Y, He W, Liu H, Zhi Z, Zhu X, Yang T, Rong Y, Ma B, Purwin TJ, Ouyang Z, Li C, Wang X, Wang X, Yang H, Zheng Y, Aplin AE, Liu J, Shao Y. ERK-mediated phosphorylation regulates SOX10 sumoylation and targets expression in mutant BRAF melanoma. *Nat Commun.* 2018 Jan 2;9(1):28. doi: 10.1038/s41467-017-02354-x. Erratum in: *Nat Commun.* 2018 Apr 6;9(1):1404. PMID: 29295999; PMCID: PMC5750221.
36. Goding CR, Arnheiter H. MITF-the first 25 years. *Genes Dev.* 2019 Aug 1;33(15-16):983-1007. doi: 10.1101/gad.324657.119. Epub 2019 May 23. PMID: 31123060; PMCID: PMC6672050.
37. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, Testori A, Larue L, Goding CR. Mitf regulation of Dial controls melanoma

proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3426-39. doi: 10.1101/gad.406406. PMID: 17182868; PMCID: PMC1698449.

38. Asnaghi L, Ebrahimi KB, Schreck KC, Bar EE, Coonfield ML, Bell WR, Handa J, Merbs SL, Harbour JW, Eberhart CG. Notch signaling promotes growth and invasion in uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012 Feb 1;18(3):654-65. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1406. Epub 2012 Jan 6. PMID: 22228632; PMCID: PMC4648284.

39. Pinnix CC, Lee JT, Liu ZJ, McDaid R, Balint K, Beverly LJ, Brafford PA, Xiao M, Himes B, Zabierowski SE, Yashiro-Ohtani Y, Nathanson KL, Bengston A, Pollock PM, Weeraratna AT, Nickoloff BJ, Pear WS, Capobianco AJ, Herlyn M. Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5312-20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3767. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19549918; PMCID: PMC2755513.

40. Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3660-70. doi: 10.1172/JCI36157. Epub 2008 Oct 16. PMID: 18924608; PMCID: PMC2567838.

41. Murtas D, Piras F, Minerba L, Maxia C, Ferreli C, Demurtas P, Lai S, Mura E, Corrias M, Sirigu P, Perra MT. Activated Notch1 expression is associated with angiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Exp Med.* 2015 Aug;15(3):351-60. doi: 10.1007/s10238-014-0300-y. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25034654.

42. Howard JD, Moriarty WF, Park J, Riedy K, Panova IP, Chung CH, Suh KY, Levchenko A, Alani RM. Notch signaling mediates melanoma-endothelial cell communication and melanoma cell migration. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Sep;26(5):697-707. doi: 10.1111/pcmr.12131. Epub 2013 Jul 19. PMID: 23773728.

43. Porcelli L, Mazzotta A, Garofoli M, Di Fonte R, Guida G, Guida M, Tommasi S, Azzariti A. Active notch protects MAPK activated melanoma cell lines from MEK inhibitor cobimetinib. *Biomed Pharmacother.* 2021

Jan;133:111006. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111006. Epub 2020 Nov 14. PMID: 33202284.

44. Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature*. 1997 Oct 30;389(6654):966-70. doi: 10.1038/40146. PMID: 9353119.

45. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev*. 2010 Nov 15;24(22):2517-30. doi: 10.1101/gad.1957710. PMID: 21078818; PMCID: PMC2975928.

46. Uka R, Britschgi C, Krättli A, Matter C, Mihic D, Okoniewski MJ, Gualandi M, Stupp R, Cinelli P, Dummer R, Levesque MP, Shakhova O. Temporal activation of WNT/ β -catenin signaling is sufficient to inhibit SOX10 expression and block melanoma growth. *Oncogene*. 2020 May;39(20):4132-4154. doi: 10.1038/s41388-020-1267-7. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32238882; PMCID: PMC8076051.

47. Moran B, Silva R, Perry AS, Gallagher WM. Epigenetics of malignant melanoma. *Semin Cancer Biol*. 2018 Aug;51:80-88. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.10.006. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29074395.

48. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009 May 15;324(5929):930-5. doi: 10.1126/science.1170116. Epub 2009 Apr 16. PMID: 19372391; PMCID: PMC2715015.

49. Bennett RL, Licht JD. Targeting Epigenetics in Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2018 Jan 6;58:187-207. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-105106. Epub 2017 Oct 6. PMID: 28992434; PMCID: PMC5800772.

50. Woods DM, Sodr  AL, Villagra A, Sarnaik A, Sotomayor EM, Weber J. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments

Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res.* 2015 Dec;3(12):1375-85. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0077-T. Epub 2015 Aug 21. PMID: 26297712; PMCID: PMC4674300.

51. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics.* 2010 Oct;2(5):657-69. doi: 10.2217/epi.10.44. PMID: 21339843; PMCID: PMC3039846.

52. Orouji E, Federico A, Larribère L, Novak D, Lipka DB, Assenov Y, Sachindra S, Hüser L, Granados K, Gebhardt C, Plass C, Umansky V, Utikal J. Histone methyltransferase SETDB1 contributes to melanoma tumorigenesis and serves as a new potential therapeutic target. *Int J Cancer.* 2019 Dec 15;145(12):3462-3477. doi: 10.1002/ijc.32432. Epub 2019 Jun 9. PMID: 31131878.

53. Shi X, Tasdogan A, Huang F, Hu Z, Morrison SJ, DeBerardinis RJ. The abundance of metabolites related to protein methylation correlates with the metastatic capacity of human melanoma xenografts. *Sci Adv.* 2017 Nov 1;3(11):eaao5268. doi: 10.1126/sciadv.aao5268. PMID: 29109980; PMCID: PMC5665593.

54. Zhu B, Chen S, Wang H, Yin C, Han C, Peng C, Liu Z, Wan L, Zhang X, Zhang J, Lian CG, Ma P, Xu ZX, Prince S, Wang T, Gao X, Shi Y, Liu D, Liu M, Wei W, Wei Z, Pan J, Wang Y, Xuan Z, Hess J, Hayward NK, Goding CR, Chen X, Zhou J, Cui R. The protective role of DOT1L in UV-induced melanomagenesis. *Nat Commun.* 2018 Jan 17;9(1):259. doi: 10.1038/s41467-017-02687-7. PMID: 29343685; PMCID: PMC5772495.

55. Zingg D, Debbache J, Schaefer SM, Tuncer E, Frommel SC, Cheng P, Arenas-Ramirez N, Haeusel J, Zhang Y, Bonalli M, McCabe MT, Creasy CL, Levesque MP, Boyman O, Santoro R, Shakhova O, Dummer R, Sommer L. The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat Commun.* 2015 Jan 22;6:6051. doi: 10.1038/ncomms7051. PMID: 25609585.

56. Ju H, Zhang L, Mao L, Liu S, Xia W, Hu J, Ruan M, Ren G. Altered expression pattern of circular RNAs in metastatic oral mucosal melanoma. *Am J Cancer Res.* 2018 Sep 1;8(9):1788-1800. PMID: 30323971; PMCID: PMC6176177.

57. Gilot D, Migault M, Bachelot L, Journé F, Rogiers A, Donnou-Fournet E, Mogha A, Mouchet N, Pinel-Marie ML, Mari B, Montier T, Corre S, Gautron A, Rambow F, El Hajj P, Ben Jouira R, Tartare-Deckert S, Marine JC, Felden B, Ghanem G, Galibert MD. A non-coding function of TYRP1 mRNA promotes melanoma growth. *Nat Cell Biol.* 2017 Nov;19(11):1348-1357. doi: 10.1038/ncb3623. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28991221.

58. Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, Laurette P, Fiers M, Wouters J, Radaelli E, Eyckerman S, Leonelli C, Vanderheyden K, Rogiers A, Hermans E, Baatsen P, Aerts S, Amant F, Van Aelst S, van den Oord J, de Strooper B, Davidson I, Lafontaine DL, Gevaert K, Vandesompele J, Mestdagh P, Marine JC. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature.* 2016 Mar 24;531(7595):518-22. doi: 10.1038/nature17161. PMID: 27008969.

59. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, Wargo JA, Song JS, Fisher DE, Arany Z, Widlund HR. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell.* 2013 Mar 18;23(3):302-15. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.003. Epub 2013 Mar 7. PMID: 23477830; PMCID: PMC3635826.

60. Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, Clish CB, Granter SR, Widlund HR, Spiegelman BM, Puigserver P. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell.* 2013 Mar 18;23(3):287-301. doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.020. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23416000; PMCID: PMC3708305.

61. Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the Wheels of

the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metab.* 2020 Jan 7;31(1):62-76. doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.010. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31813823.

62. Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cadwell K, Cecconi F, Choi AMK, Choi ME, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Deretic V, Dikic I, Elazar Z, Eskelinen EL, Fimia GM, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Jäättelä M, Johansen T, Juhász G, Karantza V, Kraft C, Kroemer G, Ktistakis NT, Kumar S, Lopez-Otin C, Macleod KF, Madeo F, Martinez J, Meléndez A, Mizushima N, Münz C, Penninger JM, Perera RM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Santambrogio L, Scorrano L, Simon HU, Simon AK, Simonsen A, Stolz A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Galluzzi L, Pietrocola F. Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 2021 Oct 1;40(19):e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34459017; PMCID: PMC8488577.

63. Liu H, He Z, Simon HU. Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence. *Autophagy.* 2014 Feb;10(2):372-3. doi: 10.4161/auto.27163. Epub 2013 Nov 26. PMID: 24300435; PMCID: PMC5396100.

64. Qiang L, He YY. Autophagy deficiency stabilizes TWIST1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *Autophagy.* 2014 Oct 1;10(10):1864-5. doi: 10.4161/auto.32171. Epub 2014 Aug 13. PMID: 25126736; PMCID: PMC4198370.

65. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhim R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet.* 2011 Jul 31;43(9):869-74. doi:

10.1038/ng.890. PMID: 21804546; PMCID: PMC3677549.

66. Sullivan MR, Mattaini KR, Dennstedt EA, Nguyen AA, Sivanand S, Reilly MF, Meeth K, Muir A, Darnell AM, Bosenberg MW, Lewis CA, Vander Heiden MG. Increased Serine Synthesis Provides an Advantage for Tumors Arising in Tissues Where Serine Levels Are Limiting. *Cell Metab.* 2019 Jun 4;29(6):1410-1421.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.015. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30905671; PMCID: PMC6551255.

67. Truong A, Yoo JH, Scherzer MT, Sanchez JMS, Dale KJ, Kinsey CG, Richards JR, Shin D, Ghazi PC, Onken MD, Blumer KJ, Odelberg SJ, McMahon M. Chloroquine Sensitizes *GNAQ/11*-mutated Melanoma to MEK1/2 Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2020 Dec 1;26(23):6374-6386. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1675. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32933997; PMCID: PMC7710560.

68. Lim JH, Luo C, Vazquez F, Puigserver P. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. *Cancer Res.* 2014 Jul 1;74(13):3535-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2893-T. Epub 2014 May 8. PMID: 24812272.

69. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020 Feb;100(1):1-12. doi: 10.1016/j.suc.2019.09.005. Epub 2019 Nov 4. PMID: 31753105.

70. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):670-691. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.037. PMID: 28187288; PMCID: PMC5308465.

71. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Mar 12;5(1):28. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x. PMID: 32296047; PMCID: PMC7067809.

72. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Palacios J, Pollán M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sánchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. A high-throughput study in melanoma

identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3450-60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3481. PMID: 17409456.

73. Rébé C, Ghiringhelli F. STAT3, a Master Regulator of Anti-Tumor Immune Response. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 30;11(9):1280. doi: 10.3390/cancers11091280. PMID: 31480382; PMCID: PMC6770459.

74. Wang B, Liu T, Wu JC, Luo SZ, Chen R, Lu LG, Xu MY. STAT3 aggravates TGF- β 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Biomed Pharmacother.* 2018 Feb;98:214-221. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.035. Epub 2017 Dec 27. PMID: 29268242.

75. Kulesza DW, Przanowski P, Kaminska B. Knockdown of STAT3 targets a subpopulation of invasive melanoma stem-like cells. *Cell Biol Int.* 2019 Jun;43(6):613-622. doi: 10.1002/cbin.11134. Epub 2019 Apr 30. PMID: 30958597.

76. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 5;20(11):2767. doi: 10.3390/ijms20112767. PMID: 31195692; PMCID: PMC6600375.

77. Wang HZ, Wang F, Chen PF, Zhang M, Yu MX, Wang HL, Zhao Q, Liu J. Coexpression network analysis identified that plakophilin 1 is associated with the metastasis in human melanoma. *Biomed Pharmacother.* 2019 Mar;111:1234-1242. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.135. Epub 2019 Jan 15. PMID: 30841437.

78. Paolillo M, Schinelli S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 7;20(19):4947. doi: 10.3390/ijms20194947. PMID: 31591367; PMCID: PMC6802000.

79. Ungefroren H, Witte D, Lehnert H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn.* 2018 Mar;247(3):451-461. doi: 10.1002/dvdy.24505. Epub 2017 May 30. PMID: 28390160.

80. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal

transduction proteins. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):237-48. doi: 10.1016/0092-8674(95)90406-9. PMID: 7834743.

81. Dangelmaier E, Lal A. Adaptor proteins in long noncoding RNA biology. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*. 2020 Apr;1863(4):194370. doi: 10.1016/j.bbagr.2019.03.003. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30951902.

82. Saini P, Courtneidge SA. Tks adaptor proteins at a glance. *J Cell Sci*. 2018 Jan 8;131(1):jcs203661. doi: 10.1242/jcs.203661. PMID: 29311151; PMCID: PMC5818055.

83. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 1997 Dec 19;278(5346):2075-80. doi: 10.1126/science.278.5346.2075. PMID: 9405336.

84. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z. Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*. 2001;19(1):26-59. doi: 10.1016/s1093-3263(00)00138-8. PMID: 11381529.

85. Brown CJ, Takayama S, Campen AM, Vise P, Marshall TW, Oldfield CJ, Williams CJ, Dunker AK. Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long disordered regions. *J Mol Evol*. 2002 Jul;55(1):104-10. doi: 10.1007/s00239-001-2309-6. PMID: 12165847.

86. Ren S, Uversky VN, Chen Z, Dunker AK, Obradovic Z. Short Linear Motifs recognized by SH2, SH3 and Ser/Thr Kinase domains are conserved in disordered protein regions. *BMC Genomics*. 2008 Sep 16;9 Suppl 2(Suppl 2):S26. doi: 10.1186/1471-2164-9-S2-S26. PMID: 18831792; PMCID: PMC2559891.

87. Tibaldi EV, Reinherz EL. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol*. 2003;15:313–329.

88. Narita T, Ando A, Mikami Y, Taniyama T. Overexpression of CIN85 suppresses the growth of herpes simplex virus in HeLa cells. *Exp Cell Res*.

2005;311:265–271.

89. Zhang J, Zheng X, Yang X, Liao K. CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Res.* 2009;19:733–746.

90. Gaidos G, Soni S, Oswald DJ, Toselli PA, Kirsch KH. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin- bundling properties and heterotypic-complex formation. *J Cell Sci.* 2007;120:2366–2377.

91. Bogler O, Furnari FB, Kindler-Roehrborn A, Sykes VW, Yung R, Huang HJ, Cavenee WK. SETA: a novel SH3 domain-containing adapter molecule associated with malignancy in astrocytes. *Neuro Oncol.* 2000;2:6–15.

92. Nam JM, Onodera Y, Mazaki Y, Miyoshi H, Hashimoto S, Sabe H. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J.* 2007;26:647–656.

93. Horak, Iryna & Shytikov, Dmytro & L., Knopfova & L., Borsig & Drobot, Liudmyla. (2017). Adaptor protein ruk/cin85 is involved in emt/met of breast cancer cells. 10.13140/RG.2.2.31361.51042.

94. Kardinal C, Konkol B, Schulz A, Posern G, Lin H, Adermann K, Eulitz M, Estrov Z, Talpaz M, Arlinghaus RB, Feller SM. Cell- penetrating SH3 domain blocker peptides inhibit proliferation of primary blast cells from CML patients. *FASEB J.* 2000;14:1529–1538.

95. Gril B, Vidal M, Assayag F, Poupon MF, Liu WQ, Garbay C. Grb2-SH3 ligand inhibits the growth of HER2+ cancer cells and has antitumor effects in human cancer xenografts alone and in combination with docetaxel. *Int J Cancer.* 2007;121:407–415.

96. Samoylenko A, Vynnytska-Myronovska B, Byts N, Kozlova N, Basaraba O, Pasichnyk G, Palyvoda K, Bobak Y, Barska M, Mayevska O, Rzhepetsky Y, Shuvayeva H, Lyzogubov V, Usenko V, Savran V, Volodko N, Buchman V, Kietzmann T, Drobot L. Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis.* 2012; 33(10): 1976-1984.

97. Mayevska O, Shuvayeva H, Igumentseva N, Havrylov S, Basaraba O,

Bobak Y, Barska M, Volod'ko N, Baranska J, Buchman V, Drobot L. Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma. *Exp Oncol.* 2006;28(4):275-81.

98. Havrylov S, Redowicz MJ, Buchman VL. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic.* 2010;11(6):721-731.