

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.101>

УДК 577.112+577.218+616-006.66

**І.Р. Горак¹, Г.В. Пасічник¹, Д.С. Геращенко¹,
Л. Кнопфова², Л. Борсіг³, Л.Б. Дробот¹**

¹ Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

² Університет Масарика, Брно, Чехія

³ Цюрихський університет, Швейцарія

E-mail: iryna.horak@gmail.com

Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює прояв ознак ракових стовбурових клітин (CSCs) у клітинах аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1

Представлено академіком НАН України С.О. Костеріним

На моделі клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 оцінено його внесок до ступеня прояву основних ознак ракових стовбурових клітин (CSCs). Встановлено, що рівень експресії факторів репрограмування Klf4, Pou5f1/Oct4 та Nanog, а також поверхневих маркерів CSCs молочної залози Cd44 і Cd24 залежали від рівня експресії Ruk/CIN85: підвищувалися у разі up-регулювання й знижувалися у випадку down-регулювання цього адаптерного протеїну. Показано, що особливості змін транскриптому в субклонах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 корелювали з їх здатністю до формування мамосфер.

Ключові слова: ракові стовбурові клітини, репрограмування, сфероїди, адаптерний протеїн Ruk/CIN85, аденокарцинома молочної залози.

Лікування злоякісних новоутворень людини включає комбінацію хірургічних, хіміотерапевтичних, імунологічних та радіотерапевтичних підходів, особливості застосування яких визначаються типом пухлин, стадією пухлинного процесу та прогностичними маркерами. Однак у багатьох випадках, незважаючи на зменшення розміру пухлини, її хірургічне видалення (у випадку солідних пухлин) і подовження життя пацієнтів, мають місце як локальні повторні рецидиви, так і дистантні метастази.

Згідно із сучасними уявленнями про біологію пухлинного росту, пухлина є гетерогенною ієрархічною системою, до складу якої входять клітини різних субпопуляцій, що відрізняються за своїми біологічними властивостями. Однією з таких субпопуляцій є ракові стовбурові клітини (cancer stem cells (CSCs); інша назва — клітини, що ініціюють розвиток пухлини, англ. tumor initiating cells (TICs)) — невелика субпопуляція пухлинних клітин, здатних до самовідтворення. Крім цього, CSCs мають високий туморогенний і

© І.Р. Горак, Г.В. Пасічник, Д.С. Геращенко, Л. Кнопфова, Л. Борсіг, Л.Б. Дробот, 2018

метастатичний потенціал, а також дають початок клітинам-нащадкам з різним ступенем диференціювання. Для CSCs характерні такі властивості: експресія специфічних поверхневих маркерів (CD44, CD24, CD34, CD38, CD133 тощо), резистентність до радіо- та хіміотерапії, здатність формувати тривимірні структури (сфероїди) у неприкріпленому стані за умов клонального пропагування в безсироватковому детермінованому середовищі *in vitro*, а також активація низки сигнальних шляхів, таких як Notch, Wnt, Hedgehog, PI3K/Akt, NF- κ B, JAK/STAT [1]. Відомо, що прояв ознак CSCs тісно пов'язаний з явищем епітеліально-мезенхімального переходу (EMT), який є визначальним фактором для посилення інвазії та метастазування пухлинної клітини. Так, індукція EMT як у нормальних іморталізованих, так і в злоякісно трансформованих клітинах спричиняє зростання розмірів популяції CSCs та резистентність таких клітин до цитостатиків [2]. У зв'язку з підвищеною стійкістю ракових стовбурових клітин до дії протипухлинних препаратів існує нагальна потреба в з'ясуванні молекулярних механізмів, що забезпечують функціонування CSCs, та створенні новітніх протипухлинних препаратів, скерованих на знищення CSCs.

Визначальними факторами, що зумовлюють виникнення і подальше функціонування CSCs, є генетично і епігенетично детерміновані порушення в регулюванні сигнальних мереж, залучених до контролю їх виживання і самовідтворення. Одними з основних регуляторних компонентів сигнальних мереж клітин є адаптерні (риштувальні) протеїни. Таким протеїном, зокрема, є Ruk/CIN85 (Ruk — Regulator for ubiquitous kinase, CIN85 — Cbl-interacting protein of 85K), повнорозмірна форма якого містить три SH3 домени (забезпечують взаємодію з пролінвмісними послідовностями інших протеїнів), збагачені на пролін райони (взаємодіють з SH3 доменами інших протеїнів), та надспіралізований домен, що бере участь у гомо- та гетеродимеризації. Завдяки взаємодії з численними зв'язувальними партнерами Ruk/CIN85 залучений до низки клітинних процесів, у тому числі ендцитозу активованих рецепторних тирозинкіназ, регулювання актинового цитоскелета, формування адгезивних контактів, інвазії та контролю апоптозу [3]. Результати попередніх експериментальних досліджень свідчать про значне підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в пухлинах різного походження, в тому числі карциномах молочної залози, товстої кишки, меланомах, у порівнянні з оточуючими умовно нормальними тканинами, причому найвищий вміст Ruk/CIN85 спостерігається саме в зонах інвазивного росту [4–6]. Беручи до уваги сказане, за мету дослідження ставилося оцінити вплив адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на прояв деяких ключових ознак CSCs молочної залози.

Матеріали і методи. *Культура клітин.* Сублінії клітин аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки, 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну, при температурі 37 °C і 5 % CO₂ у зволоженої атмосфері. Клітини пасажували у співвідношенні 1 : 4–1 : 6 кожні 2–3 доби при досягненні 70–80 % конфлюенту.

Одержання субліній клітин лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Сублінію клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 (RukUp) одержували шляхом кальцій-фосфатної трансфекції клітин дикого типу плазмідом pRc/CMV2-Ruk₁, яка кодує повнорозмірну форму Ruk/CIN85, з подальшою селекцією за наявності 1 мг/мл генетицину (G418). Для пригнічення експресії Ruk/CIN85 (сублінія

RukDown) клітини 4T1 інфікували лентівірусом, що кодує Ruk/CIN85-специфічну shRNA у складі конструкції pLKO.1-shRuk/CIN85. Селекцію стабільно інфікованих клітин проводили за наявності 10 мкг/мл пуроміцину з подальшим субклонуванням. Щоб отримати відповідні контролю, клітини дикого типу були трансфіковані/інфіковані плазмідом без вставки (сублінія Mock) або лентівірусом, що кодує shRNA, не специфічну до жодної послідовності геному ссавців (сублінія Scr).

Ізолювання тотальної РНК та синтез кДНК. Тотальну РНК ізолювали з $1 \cdot 10^6$ клітин колоночним методом, використовуючи комерційний набір innuPREP RNA mini Kit (Analytical Jena AG, Німеччина), відповідно до рекомендацій виробника. Якість отриманої РНК оцінювали за ступенем деградації смуг рибосомних РНК після електрофоретичного розділення в агарозному гелі, а також за співвідношенням поглинання при 260/230 нм і 260/280 нм. кДНК синтезували із 1–2 мкг РНК з використанням Oligo-dT праймера, користуючись комерційним набором RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США) відповідно до рекомендацій виробника.

Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (qRT-PCR). Для qRT-PCR використовували комерційний набір Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Підбір праймерів здійснювали за допомогою програми Oligo 7, послідовності праймерів наведені в таблиці. Як референтний ген використовували *Gapdh*, відносний рівень експресії оцінювали методом $\Delta\Delta C_t$. Для оцінки специфічності ампліфікації використовували криві плавлення.

Тест на сфероїдоутворення. Клітини висівали у 24-лунковий планшет (10^3 клітин/лунку) з низькоадгезивною поверхнею (Corning, США) у детерміноване середовище такого складу: середовище DMEM без індикатора та середовище F-12 у співвідношенні 1 : 1, з додаванням інсуліну (5 мкг/мл), гідрокортизону (0,5 мкг/мл), епідермального фактора росту (20 нг/мл), фактора росту фібробластів (20 нг/мл), гепарину (0,5 од/мл), добавки для культури клітин B27, бичачого сироваткового альбуміну (1 %), пеніциліну (100 од/мл), стрептоміцину (100 мкг/мл). Після 7 діб культивування кількість первинних мамосфер підраховували за допомогою інвертованого мікроскопа та збирали їх шляхом центрифугування при 1000 об/хв. Ефективність сфероїдоутворення визначали як відсоток загальної кількості сфероїдів до загальної кількості живих клітин, висіяних на лунку планшета. Для оцін-

Послідовності праймерів для кількісної ПЛР

Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер
<i>Cd24</i>	GCGAGCTTAGCAGATCTCCAC	CGGTGCAACAGATGTTTGGT
<i>Cd44</i>	AGAGCACCCAGAAAGCTAC	GTAGTTGCACTCGTTGTGGG
<i>Gapdh</i>	CATCGACGCACCATCCAACC	TGGAAGGGTAACCAGTTGGGG
<i>Klf4</i>	AACATGCCCGGACTTACAAA	TTCAAGGGAATCCTGGTCTTC
<i>Myc</i>	ТААСТСГАГГАГГАГСТГГА	GCCAAGGTTGTGAGGTTAGG
<i>Nanog</i>	TTGCTTACAAGGGTCTGCTACT	ACTGGTAGAAGAATCAGGGCT
<i>Pou5f1</i>	TAGGTGAGCCGCTTTCCAC	GCTTAGCCAGGTTCCAGGAT
<i>Sh3bp1</i>	CGCCAACTTTCACGCTGCTT	TGACCTCACCCACGCTGATT
<i>Sox2</i>	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAA	AATCCGGGTGCTCCTTCATGTG

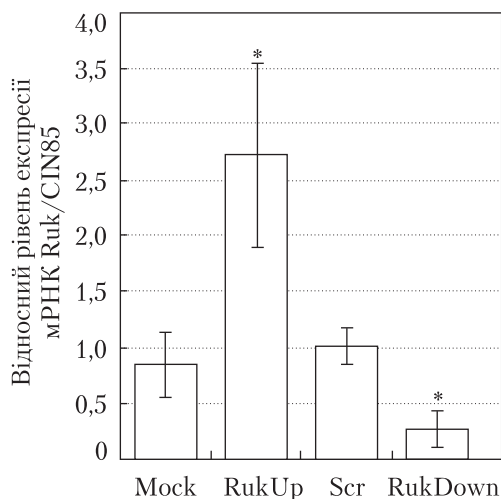


Рис. 1. Рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в одержаних сублініях клітин 4T1. * – $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем (RukUp порівнювали з контрольною сублінією Mock, RukDown – із сублінією Scr)

ки здатності ракових стовбурових клітин до тривалого самовідтворення *in vitro* проводили серійне пасажування за таких самих умов протягом ще трьох пасажів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica (StatSoft, <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>). Усі результати наведено у вигляді середнього значення та стандартної похибки щонайменше трьох незалежних дослідів. Попарні порівняння здійснювали за допомогою двовибіркового *t*-тесту Стьюдента для незалежних вибірок з нерівними дисперсіями. Різницю між групами вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Для дослідження внеску адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до прояву ознак ракових стовбурових клітин було обрано клітинну лінію 4T1 (ATCC CRL-2539). Клітини лінії 4T1 є високоінвазивними клітинами аденокарциноми молочної залози миші, які відповідають тваринній моделі раку молочної залози людини на IV стадії. Методом qRT-PCR встановлено, що рівень експресії повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 з up-регулюванням адаптерного протеїну (сублінія RukUp) був утричі вищим, ніж у контрольній сублінії Mock, тоді як у клітинах з down-регулюванням (сублінія RukDown) – у 3,5 раза нижчим, ніж у контрольній сублінії Scr (рис. 1).

Одним із ймовірних шляхів походження ракових стовбурових клітин є дедиференціювання та репрограмування клітин-попередників. Рівень експресії генів, пов'язаних із репрограмуванням, зокрема транскрипційних факторів (ТФ) *Klf4*, *Pou5f1/Oct4*, *Sox2*, *Myc*, а також *Nanog*, оцінювали за допомогою qRT-PCR. Показано, що в результаті надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 достовірно зростає рівень експресії ТФ *Klf4* і *Nanog*, а у разі пригнічення експресії Ruk/CIN85 достовірно знижується рівень експресії ТФ *Pou5f1/Oct4* (рис. 2, а). Транскрипційні фактори KLF4, Myc, Oct4 і Sox2, «Фактори Яманаки», були вперше використані Сінья Яманакою для одержання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин із дорослих фібробластів миші [7]. Показано, що KLF4 необхідний для підтримання популяції CSCs, міграції та інвазії клітин раку молочної залози людини ліній MCF-7 та MDA-MB231 [8]. Також на моделі клітин раку молочної залози миші лінії 4T1 показано, що клітини 4T1 з високим рівнем експресії Oct4 характеризуються експресією специфічних маркерів CSCs, здатністю до формування мамосфер та значним туморогенним потенціалом *in vivo*, і навпаки [9]. ТФ Nanog контролює підтримання плюрипотентного стану клітин та їх здатність до самовідтворення, а високий рівень експресії цього ТФ стимулює ріст пухлин та метастазування клітин раку молочної залози [10]. Отримані результати свідчать про те, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 перебувають у дедиференційованому стані і, ймовірно, матимуть підвищений метастатичний потенціал *in vivo*.

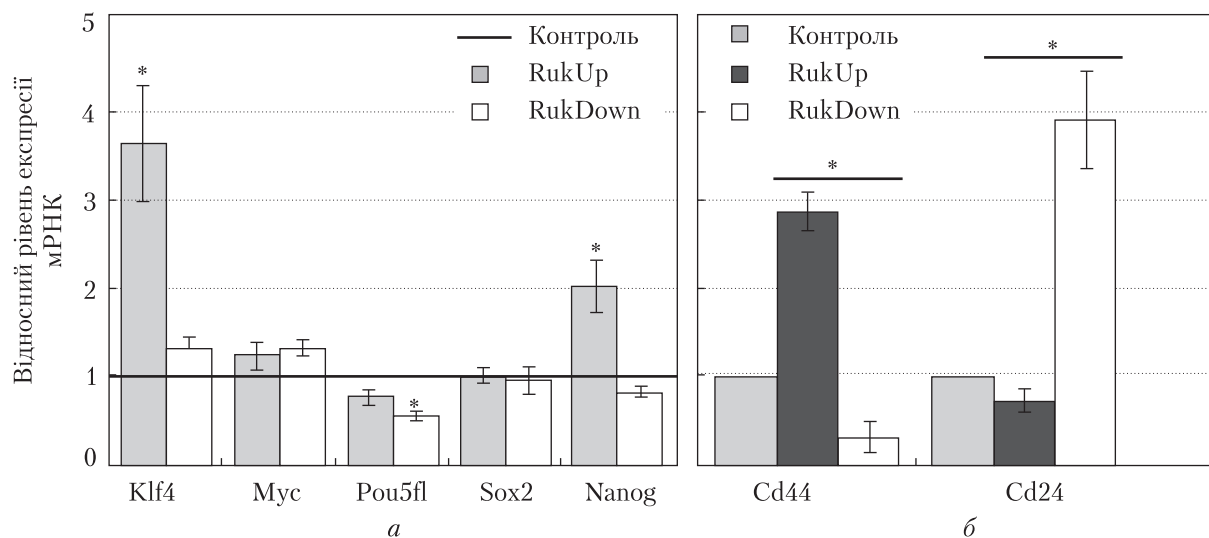


Рис. 2. Рівень експресії генів, залучених до репрограмування (а), та поверхневих маркерів CSCs (б) у сублініях клітин 4Т1 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. * – $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем

Для CSCs властива наявність специфічних поверхневих маркерів. Зокрема, CSCs молочної залози мають фенотип $CD44^+/CD24^{-/low}$. CD44 – це поверхневий глікопротеїн, рецептор гіалуронової кислоти, залучений до диференціювання, міграції, ангіогенезу, регулювання проліферації та виживаності. Сигналювання, що залежить від поверхневого глікопротеїну CD24, контролює процеси проліферації, диференціювання та апоптозу. Високий коефіцієнт відношення CD44/CD24 вважається надійною характеристикою CSCs раку молочної залози і є індикатором їх високого туморогенного потенціалу [11]. За результатами qRT-PCR нами встановлено, що рівень експресії *Cd44* достовірно зростає в клітинах сублінії RukUp і знижується у клітинах сублінії RukDown. Для гена *Cd24* виявлено зворотну залежність із рівнем експресії Ruk/CIN85 (див. рис. 2, б). Результати проведених досліджень дають підставу зробити висновок, що у разі надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах 4Т1 зростає розмір субпопуляції клітин $CD44^+/CD24^{-/low}$, які проявляють ознаки CSCs, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжується зниженням кількості таких клітин. Поряд із співвідношенням експресії CD44/CD24 для характеристики CSCs раку молочної залози використовують такий показник, як рівень активності ензиму детоксикації альдегіддегідрогенази (ALDH), яку пов'язують із міграцією та метастазуванням пухлинних клітин. У попередніх дослідженнях на моделі аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 нами було виявлено, що активність ALDH зростає у разі надекспресії Ruk/CIN85 [12], що свідчить про залучення адаптерного протеїну до регулювання експресії й активності основних маркерів ракових стовбурових клітин.

Однією з ключових властивостей CSCs є їх здатність до самовідтворення та стійкість до апоптозу, що є передумовою підвищеної туморогенності. Тому на наступному етапі досліджено здатність субліній клітин 4Т1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 до формування сфероїдів (мамосфер) у разі культивування на низькоадгезивному пластику за детермінованих умов. Виявлено, що клітини усіх досліджуваних субліній мають здатність ут-

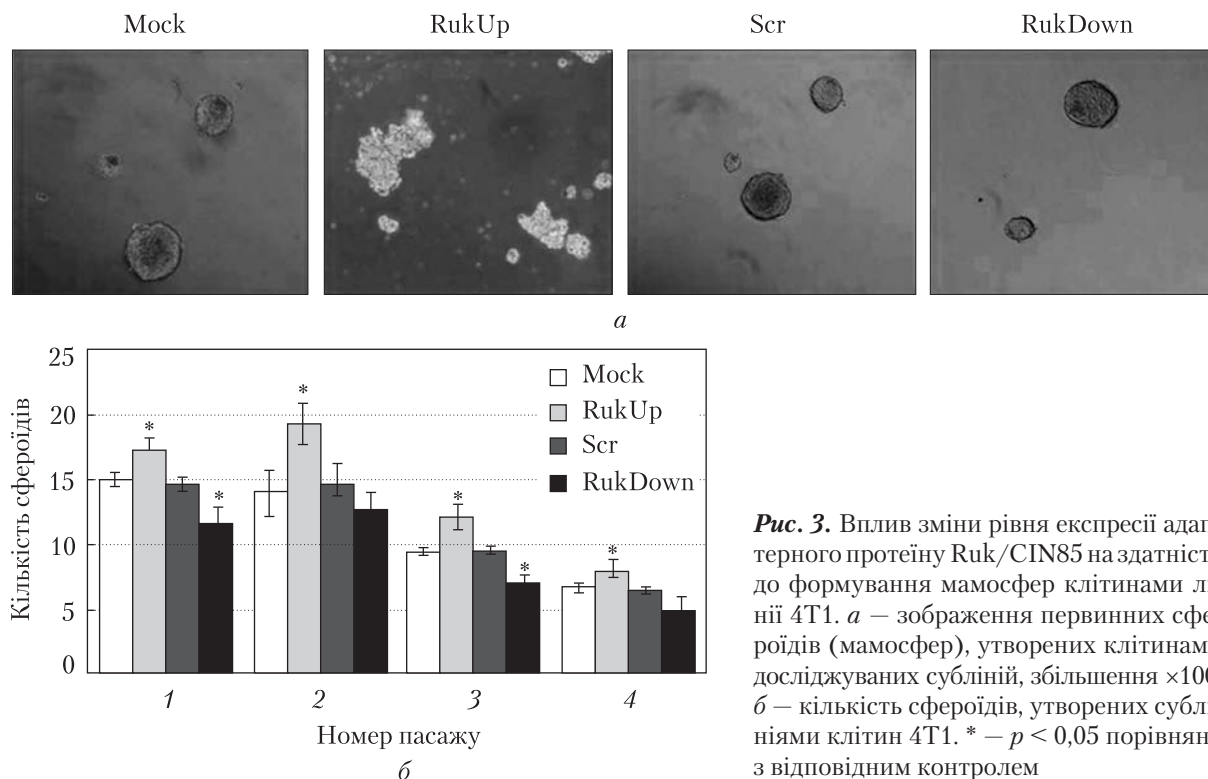


Рис. 3. Вплив зміни рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на здатність до формування мамосфер клітинами лінії 4T1. *а* – зображення первинних сфероїдів (мамосфер), утворених клітинами досліджуваних субліній, збільшення $\times 100$. *б* – кількість сфероїдів, утворених сублініями клітин 4T1. * – $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем

ворювати мамосфери, проте їх кількість та морфологія змінюється залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Контрольні клітини Mock та Scr, як і клітини сублінії RukDown, формують компактні, зі щільними міжклітинними контактами сфероїди правильної форми, тоді як сфероїди, утворені клітинами сублінії RukUp, мають неправильну форму і нерівні краї, що корелює зі зниженням міжклітинної адгезії і підвищенням міграційного потенціалу (рис. 3, *а*). Також встановлено, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 формують достовірно більшу кількість сфероїдів порівняно з відповідним контролем, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується зниженням їх здатності формувати сфероїди. У результаті серійного пасажування виявлено, що на кожному з наступних трьох пасажів клітини з надекспресією Ruk/CIN85 формують достовірно більшу кількість сфероїдів, ніж відповідні контрольні клітини (див. рис. 3, *б*), причому морфологія сфероїдів зберігається. З даних літератури відомо, що клітини раку молочної залози людини, здатні до формування сфероїдів, характеризуються також й іншими ознаками CSCs, такими як експресія поверхневих маркерів $CD44^+/CD24^{-/low}$, індукція генів, залучених до репрограмування і підтримання дедиференційованого стану, резистентність до дії хіміотерапевтичних препаратів [13]. У попередніх дослідженнях нами показано, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зумовлює зростання їх резистентності до дії доксорубіцину [14], тоді як клітини MCF-7 з надекспресією адаптерного протеїну характеризуються підвищенням резистентності до етопозиду та цисплатину, що корелює з активацією мембранних ABC транспортерів, ALDH [12], а також зі зниженням їх проліферативного потенціалу [5].

Таким чином, надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози миші лінії 4T1 спричиняє посилення прояву ознак ракових стовбурових клітин, а саме: індукції транскрипційних факторів, які підтримують недиференційований стан стовбурових клітин, та поверхневих маркерів, характерних для CSCs молочної залози, а також до зростання здатності формувати мамосфери. Водночас пригнічення експресії Ruk/CIN85 зумовлює як втрату молекулярних маркерів CSCs, так і пригнічення сфероїдоутворення. Отримані результати свідчать про потенційну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі прояву ознак ракових стовбурових клітин.

Публікація містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Державного фонду фундаментальних досліджень за конкурсним проектом Ф83, Національної наукової фундації Швейцарії в рамках наукової кооперації між Східною Європою та Швейцарією SCOPES, № IZ73ZO, та Українського науково-технологічного центру.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Cojoc M., Mäbert K., Muders M.H., Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* 2015. **31**. P. 16–27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.004>
2. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008. **133**. P. 704–715. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
3. Havrylov S., Redowicz M.J., Buchman V. L. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic.* 2010. **11**. P. 721–731. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01061.x>
4. Cascio S., Farkas A.M., Hughey R.P., Finn O.J. Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: the role of this novel complex in cancer cell invasion and migration. *Oncotarget.* 2013. **4**, № 10. P. 1686–1697. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1265>
5. Samoylenko A., Vynnytska-Myronovska B., Byts N., Kozlova N., Basaraba O., Pasichnyk G., Palyvoda K., Bobak Y., Barska M., Mayevska O., Rzhpetsky 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**. P. 1976–1984. doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs228>
6. Cascio S., Finn O. J. Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in colon cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel).* 2015. **7**, № 1. P. 342–352. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers7010342>
7. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006. **126**, № 4. P. 663–676. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
8. Yu F., Li J., Chen H., Fu J., Ray S., Huang S. & Ai W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene.* 2011. **30**, № 18. P. 2161–2172. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.591>
9. Kim R.-J., Nam J.-S. OCT4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. *Lab. Anim. Res.* 2011. **27**, № 2. P. 147–152. doi: <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.2.147>
10. Lu X., Mazur S.J., Lin T., Appella E., Xu Y. The pluripotency factor Nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2014. **33**, № 20. P. 2655–2664. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.209>
11. Li W., Ma H., Zhang J., Zhu L., Wang C., Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* 2017. **7**. 13856. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>
12. Пасічник Г.В., Поворознюк О.О., Горак І.Р., Герашенко Д.С., Пономаренко О.В., Самойленко А.А., Биць Н.В., Дробот Л.Б. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в аденокарциномних клітинах

молочної залози людини лінії MCF-7 супроводжується підвищенням їх хіміорезистентності. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2013. № 12. С. 149–156.

13. Ji P., Zhang Y., Wang S.J., Ge H.L., Zhao G.P., Xu Y.C., Wang Y. CD44hiCD24lo mammosphere-forming cells from primary breast cancer display resistance to multiple chemotherapeutic drugs. *Oncol. Rep.* 2016. **35**, № 6. P. 3293–3302. doi: <https://doi.org/10.3892/or.2016.4739>
14. Horak I., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.* 2018. **90**, № 3. P. 94–100. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj90.03.094>

Надійшло до редакції 23.10.2018

REFERENCES

1. Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M.H. & Dubrovskaya, A. (2015). A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.*, 31, pp. 16-27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.06.004>
2. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C. & Shihpitsin, M. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, pp. 704-715. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
3. Havrylov, S., Redowicz, M.J. & Buchman, V.L. (2010). Emerging roles of ruk/cin85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic*, 11, pp. 721-731. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01061.x>
4. Cascio, S., Farkas, A.M., Hughey, R.P. & Finn, O.J. (2013). Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: the role of this novel complex in cancer cell invasion and migration. *Oncotarget*, 4, No. 10, pp. 1686-1697. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1265>
5. Samoylenko, A., Vynnytska-Myronovska, B., Byts, N., Kozlova, N., Basaraba, O., Pasichnyk, G., Palyvoda, K., Bobak, Y., Barska, M., Mayevska, O., Rzhpetsky, Y., Shuvayeva, H., Lyzogubov, V., Usenko, V., Savran, V., Volodko, N., Buchman, V., Kietzmann, T. & Drobot, L. (2012). Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis*, 33, pp. 1976-1984. doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs228>
6. Cascio, S. & Finn, O. J. (2015). Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in colon cancer progression and metastasis. *Cancers (Basel)*, 7, No. 1, pp. 342-352. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers7010342>
7. Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, No. 4, pp. 663-676. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
8. Yu, F., Li, J., Chen, H., Fu, J., Ray, S., Huang, S. & Ai, W. (2011). Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*, 30, No. 18, pp. 2161-2172. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.591>
9. Kim, R.-J. & Nam, J.-S. (2011). OCT4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. *Lab. Anim. Res.*, 27, No. 2, pp. 147-152. doi: <https://doi.org/10.5625/lar.2011.27.2.147>
10. Lu, X., Mazur, S.J., Lin, T., Appella, E. & Xu, Y. (2014). The pluripotency factor Nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*, 33, No. 20, pp. 2655-2664. doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.209>
11. Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C. & Yang, Y. (2017). Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.*, 7, 13856. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14364-2>
12. Pasichnyk, G.V., Povorozniuk, O.O., Horak, I.R., Gerashchenko, D.S., Ponomarenko, O.V., Samoylenko, A.A., Byts, N.V. & Drobot, L.B. (2013). Overexpression of adaptor protein Rukl/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, № 12, pp. 149-156 (in Ukrainian).
13. Ji, P., Zhang, Y., Wang, S.J., Ge, H.L., Zhao, G.P., Xu, Y.C. & Wang, Y. (2016). CD44hiCD24lo mammosphere-forming cells from primary breast cancer display resistance to multiple chemotherapeutic drugs. *Oncol. Rep.*, 35, No. 6, pp. 3293-3302. doi: <https://doi.org/10.3892/or.2016.4739>
14. Horak, I. & Drobot, L. (2018). Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.*, 90, No. 3, pp. 94-100. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj90.03.094>

Received 23.10.2018

И.Р. Горак¹, Г.В. Пасечник¹, Д.С. Геращенко¹,
Л. Кнопфова², Л. Борсиг³, Л.Б. Дробот¹

¹ Інститут біохімії ім. А.В. Палладина НАН України, Київ

² Университет Масарика, Брно, Чехія

³ Цюрихський університет, Швейцарія

E-mail: iryna.horak@gmail.com

АДАПТЕРНИЙ БЕЛОК Ruk/CIN85 МОДУЛИРУЕТ ПРОЯВЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ РАКОВЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК (CSCs) В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ ЛИНИИ 4T1

На модели клеток аденокарциномы молочной железы мыши линии 4T1 со стабильной сверхэкспрессией и подавленной экспрессией адаптерного белка Ruk/CIN85 проведена оценка его вклада в степень проявления основных признаков раковых стволовых клеток (CSCs). Установлено, что уровень экспрессии факторов репрограммирования Klf4, Pou5f1/Oct4 и Nanog, а также поверхностных маркеров CSCs молочной железы Cd44 и Cd24 зависели от уровня экспрессии Ruk/CIN85: повышались при up-регуляции и снижались при down-регуляции адаптерного белка. Показано, что особенности изменений транскриптома в субклонах 4T1 с различным уровнем экспрессии Ruk/CIN85 коррелировали с их способностью к формированию маммосфер.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, репрограммирование, сфероиды, адаптерный белок Ruk/CIN85, аденокарцинома молочной железы.

I.R. Horak¹, G.V. Pasichnyk¹, D.S. Gerashchenko¹,
L. Knopfova², L. Borsig³, L.B. Drobot¹

¹ Palladin Institute of Biochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

² Masaryk University, Brno, Czech Republic;

³ Zurich University, Switzerland.

E-mail: iryna.horak@gmail.com

ADAPTOR PROTEIN Ruk/CIN85 MODULATES MANIFESTATION OF CANCER STEM CELLS (CSCs) FEATURES IN MOUSE BREAST ADENOCARCINOMA 4T1 CELLS

Using mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells with stable overexpression or knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85, its contribution to the manifestation of cancer stem cells features was estimated. It was demonstrated that the expression levels of reprogramming factors Klf4, Pou5f1/Oct4 and Nanog, as well as CSCs surface markers Cd44 and Cd24, depended on Ruk/CIN85 expression level: increased in the case of up-regulation and decreased in the case of down-regulation. It was found that the transcriptome patterns in 4T1 subclones with different expression levels of Ruk/CIN85 correlated with their ability to form mammospheres.

Keywords: cancer stem cells, reprogramming, spheroids, adaptor protein Ruk/CIN85, breast adenocarcinoma.