

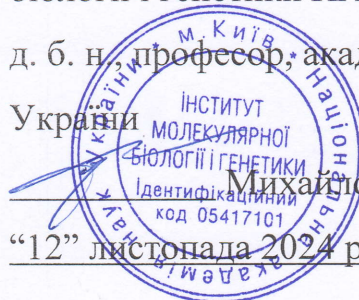
“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту молекулярної
біології і генетики НАН України,

д. б. н., професор, академік НАН
України

Михайло ТУКАЛО

“12” листопада 2024 р.



ВИСНОВОК

**про наукову новизну, теоретичне та практичне значення
результатів дисертації**

на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини»
на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 Біологія
за спеціальністю 091 Біологія та біохімія

ВИТЯГ

із протоколу засідання об'єднаного семінару відділу функціональної
геноміки, сигнальних систем клітини, молекулярної онкогенетики,
молекулярної генетики ІМБГ НАН України від “11” листопада 2024 р.

З метою надання висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне
значення результатів дисертації 11 листопада 2024 року на об'єднаному
семінарі наукових відділів ІМБГ НАН України – здобувач ступеня доктора
філософії Губернаторова Анастасія Олександрівна публічно презентувала
наукові результати дисертації на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної
залози людини».

Присутні. Головуючий на засіданні – д.б.н., проф., акад. НАН України, зав.
відділу сигнальних систем клітини Філоненко В.В., д.б.н., п.н.с. Геращенко
Г.В., д.б.н., проф., Телегеев Г.Д.

На засіданні були присутні 12 осіб, у тому числі 2 професори, 1 доктор біологічних наук та 6 кандидатів біологічних наук: д.б.н., проф. Філоненко В.В., д.б.н. Геращенко Г.В., д.б.н., проф. Телегєєв Г.Д., к.б.н. Кропивко С.В., к.б.н. Грязнова Т.А., к.б.н. Іродов Д.М., к.б.н. Гаріфулін О.М., к.б.н. Пальчевський С.С., к.б.н. Крупська І.В., м.н.с. Рискаль М.В., пров. інж. Лавриненко К.Д., м.н.с. Пікус П.О.

Порядок денний. Обговорення дисертаційного дослідження провідного інженера відділу функціональної геноміки Губернаторової Анастасії Олександрівни на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини», поданого на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

Дисертація виконувалася у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 11 від 24 вересня 2024 року).

Науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, т.в.о. завідувача відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Кропивко Сергій Вікторович.

З дисертаційною роботою попередньо ознайомилися доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України Телегєєв Г.Д. та доктор біологічних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України Геращенко Г.В.

Виступили.

Здобувач Губернаторова Анастасія Олександрівна представила презентацію за основними положеннями дисертації на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини», поданої на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

З відгуком на роботу виступили науковий керівник – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, т.в.о. завідувача відділу функціональної геноміки Кропивко С.В., та рецензенти - доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України Телегєєв Г.Д. та доктор біологічних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України Геращенко Г.В., які дали позитивну оцінку виконаній роботі, підкреслили її наукову новизну та актуальність, виокремили високий теоретичний та експериментальний рівень проведеного дослідження.

В обговоренні також взяли участь: д.б.н. Геращенко Г.В., д.б.н., проф. Телегєєв Г.Д. к.б.н., с.н.с. Гаріфулін О.М., д.б.н., проф. Філоненко В.В. та к.б.н., с.н.с Пальчевський С.С.

На засіданні обговорили проєкт висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації «доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики ІМБГ НАН України Телегєєв Г.Д. та доктор біологічних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики ІМБГ НАН України Геращенко Г.В.».

Актуальність теми. Рак молочної залози (РМЗ) являє собою одне із найпоширеніших у світі злоякісних новоутворень серед жінок: лише у 2022 році по всьому світу було 2,3 мільйона нових випадків та близько 685 000 смертей. В Україні, за даними Національного канцер-реєстру, РМЗ також займає провідне місце серед онкологічних захворювань у жінок: у 2023 році він складав 22,4% усіх злоякісних пухлин і займав перше місце у смертності від онкологічних захворювань серед жінок віком 30-74 роки. Ці цифри підкреслюють важливість підвищення обізнаності, покращення програм скринінгу та розширення можливостей лікування для зменшення впливу РМЗ як на окремих осіб, так і на цілі спільноти в усьому світі. Утворення метастазів є основною причиною асоційованої з раком смертності, оскільки призводить до рецидивів хвороби, порушення функцій віддалених органів і призводить до

смерті внаслідок органної недостатності. На клітинному рівні метастазування тісно пов'язано із реорганізацією цитоскелету, тому дослідження процесів, що могли б інгібувати експресію цитоскелет-асоційованих генів в малігнізованих клітинах є дуже актуальними як з фундаментальної, так і з практичної точки зору.

Одним із шляхів регуляції експресії є регуляція на пост-транскрипційному рівні, і одним із механізмів є регуляція стабільності мРНК за допомогою РНК-зв'язувальних протеїнів (РЗП). Тристетрапролін є одним із РЗП, що призводить до деградації мРНК. Показано, що він медіює деградацію багатьох протоонкогенних мРНК, а його рівні значно знижені у багатьох типах раку, в тому числі в РМЗ. Також відомо, що ТТР бере участь в інгібуванні експресії генів, асоційованих з інвазією, проте невідомо, чи може ТТР прямо або опосередковано брати участь у регуляції експресії генів-компонентів ремоделювання актинових філаментів.

Зважаючи на це, мета дисертаційної роботи, яка полягала у вивченні впливу надекспресії ТТР на характеристики актинових філаментів, рухливість та здатність до інвазії клітин моделі тричі-негативного раку молочної залози, а також оцінці можливості використання його як біомаркера РМЗ, є дуже актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та виконувалась як в рамках бюджетної тематики відділу №: 2.2.4.2 «Роль комплексів скафолдних протеїнів родин TKS та ITSN в регуляції нормальних і патологічних процесів клітини», державний реєстраційний номер роботи 0121U110628, так і в рамках вітчизняних та міжнародних проектів НФДУ «Молекулярні компоненти інвадоподій як прогностичні фактори злоякісних пухлин грудної залози людини. № 2020.01/0021», European Regional Development Fund, CZ.02.01.01/00/22_008/0004562 “Excellence in

Regenerative Medicine та Grant Agency of the Czech Republic, Project 24-11357S. Крім того, Анастасія отримала особистий грант Чеської академії наук “Researchers at risk” на проведення в Чеській Республіці деяких досліджень, висвітлених у її дисертаційній роботі.

Мета і завдання роботи. Мета роботи - вивчення особливостей впливу TTP на експресію *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, морфологію, рухливість та інвазивність клітин на моделі раку молочної залози людини, профіль його експресії в різних субтипах пухлин молочної залози людини і можливість його застосування як біомаркера РМЗ, а також вивчення впливу доксорубіцину на експресію *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, морфологію і рухливість клітин,

Відповідно до мети роботи було визначено наступні **завдання**:

1. Виконати пошук регуляторних елементів в 3'-нетрансльованих ділянках мРНК генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелету, та визначити спільні регуляторні елементи.
2. Проаналізувати ймовірність зв'язування TTP з мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, що кодують цитоскелет-асоційовані протеїни TKS5, TKS4, CTTN, WIP та N-WASP, відповідно.
3. Вивчити вплив надекспресії *ZFP36* на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*.
4. Вивчити вплив надекспресії *ZFP36* на морфологію, організацію актинових філаментів та рухливість клітин лінії MDA-MB-231 із його стабільною надекспресією.
5. Визначити рівень експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних субтипів та оцінити можливість його використання як біомаркера певних субтипів пухлин молочної залози людини.
6. Вивчити вплив доксорубіцину на експресію *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MCF7 та MDA-MB-231.
7. Вивчити вплив доксорубіцину на морфологію, організацію актинових філаментів та рухливість клітин MDA-MB-231.

Об’єкт дослідження. Роль ТТР в міграції, інвазії та морфології клітин, а також його використання як потенційного біомаркеру раку молочної залози людини.

Предмет дослідження. Вплив надекспресії ТТР на морфологічні характеристики клітин моделі РМЗ, їх рухливість та здатність до інвазії, а також доцільність використання ТТР як маркера РМЗ.

Методи дослідження. *In silico* пошук регуляторних елементів в 3’НТД мРНК та аналіз протеїн-мРНК взаємодій, виділення протеїнів та нуклеїнових кислот, електрофорез протеїнів та нуклеїнових кислот, вестерн-блот аналіз, кількісна ПЛР в реальному часі та звичайна ПЛР, рестрикційний аналіз, культивування клітин ліній MDA-MB-231, MCF7 та MDA-MB-231-екТТР, трансфекція клітин MDA-MB-231, створення клітинної лінії із стабільною надекспресією ТТР, визначення інвазивності клітин за методом Бойдена, визначення метаболічної активності клітин за допомогою ресазурину із спектрофотометричною детекцією, трансформація бактеріальних клітин, імуноцитохімічні методи, конфокальна мікроскопія препаратів живих і фіксованих клітин, статистичні методи обробки даних та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна отриманих результатів. Виконано пошук регуляторних елементів в 3’-НТД мРНК вибраних генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелету, та знайдено спільні: сайти зв’язування для РЗП родини Musashi, K-box та AU-збагачені елементи (ARE). Вперше виявлено, що надекспресія ТТР значно знижує рівень мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, а також значно підвищує рівень мРНК *SH3PXD2B* на моделі тричі-негативного раку молочної залози людини. Вперше за допомогою конфокальної мікроскопії живих клітин безпосередньо показано інгібуючий вплив надекспресії ТТР на рухливість клітин та їх здатність до направленого руху. Описано вплив надекспресії ТТР на морфологію клітин, а також показано, що вона призводить до зменшення кількості актинових філаментів і значно знижує здатність клітин до інвазії.

Вперше показано, що клінічно релевантні концентрації доксорубіцину значно підвищують рівень мРНК та протеїну TTP на моделі раку молочної залози людини, а також змінюють профіль експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2* та *CTTN*. Показано, що доксорубіцин знижує рухливість та значно впливає на морфологію клітин моделі тричі-негативного раку молочної залози людини. Вперше детально вивчено профіль експресії *ZFP36* у зразках пухлин молочної залози людини різних субтипів та виявлено, що висока експресія *ZFP36* не може бути використана як суто позитивний прогностичний маркер, оскільки значно варіює між різними субтипами РМЗ і корелює як із сприятливим, так і несприятливим прогнозом залежно від субтипу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані розширюють уявлення про роль TTP у канцерогенезі. Представлені дослідження вказують на те, що описаний інгібуючий вплив TTP на міграцію та інвазію клітин реалізується, зокрема, впливом на фундаментальні функції клітин, а саме на рухливість і здатність до направлених рухів, що відбуваються завдяки цитоскелет-асоційованим протеїнам. Ці дані сприяють кращому розумінню молекулярних механізмів, які залучені до захисних функцій клітин, що стоять на шляху злоякісного переродження.

Вивчення впливу доксорубіцину на рівні як мРНК, так і білкового продукту TTP вказують на те, що необхідні подальші дослідження щодо використання його як біомаркера принаймні в тричі-негативному та люмінальному А субтипах РМЗ. Високий рівень TTP вважається позитивним прогностичним маркером, але якщо підвищення його експресії має місце *in vivo* у пацієнтів, що отримували доксорубіцин в якості терапії, то в такому випадку неможливо сказати, чи високий рівень TTP є показником сприятливого фізіологічного стану пацієнта, чи є транзитним станом, викликаним терапією. Окрім того, наші дослідження показують, що профіль експресії TTP значно варіює в різних субтипах пухлин молочної залози

людини, що також накладає обмеження на його використання як позитивного прогностичного маркера.

Матеріали дисертації можуть бути використані як з метою оптимізації підходів до персоналізованої медицини та розробки лікарських засобів, спрямованих на таргетну терапію раку, так і для підготовки лекційних та практичних занять для студентів.

Особистий внесок здобувача. Всі представлені експерименти було виконано особисто дисертанткою або за її безпосередньої участі. Більшість проведених експериментів, обробка та аналіз отриманих результатів виконувались особисто дисертанткою. Аналіз рухливості та морфології клітин було виконано у співпраці із д-ром Й. Новаком (J. Novak) з Інституту молекулярної генетики Чеської Академії Наук (м. Прага, Чехія). Вивчення профілю експресії *ZFP36* у пухлинах молочної залози людини було виконано у співпраці із С. В. Кропивко (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 4 статті у наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus, три з яких – у закордонних виданнях, одна належить до українських фахових видань категорії А, і ще одна стаття на разі знаходиться у друці також українського фахового видання категорії А:

1. Hubiernatorova, A.; Novak, J.; Vaskovicova, M.; Sekac, D.; Kropyvko, S.; Hodny, Z. Tristetraprolin affects invasion-associated genes expression and cell motility in triple-negative breast cancer model. Cytoskeleton (Hoboken, N.J.) 2024. doi:10.1002/cm.21934. *Особистий внесок здобувача: комп'ютерний аналіз мРНК таргетних транскриптів та РНК-протеїнових взаємодій, створення клітинної лінії із стабільною експресією TTP, обробка клітин, ЗТ-кПЛР, вестерн-блот аналіз, визначення життєздатності, рухливості, інвазії та морфології клітин (окрім аналізу зображень), статистичний аналіз результатів, написання і підготовка статті до друку.*

2. Kropyvko, S.; Hubiernatorova, A.; Mankovska, O.; Lavrynenko, K.; Syvak, L.; Verovkina, N.; et al. Tristetraprolin expression levels and methylation status in breast cancer. *Gene Reports* 2023, 30 (November 2022), 101718. doi:10.1016/j.genrep.2022.101718. *Особистий внесок здобувача: обробка клітин, ЗТ-кПЛР, статистичний аналіз результатів, написання і підготовка статті до друку.*
3. Hubiernatorova, A. O.; Kropyvko, S. V. Doxorubicin affects expression of the ZFP36 and CTTN genes in MCF7 cell line. *Biopolymers and Cell* 2024, 40(2), 127–135. doi:10.7124/bc.000AB3. *Особистий внесок здобувача: обробка клітин, статистичний аналіз результатів, написання і підготовка статті до друку.*
4. Gerasymchuk, D.; Hubiernatorova, A.; Domanskyi, A. MicroRNAs Regulating Cytoskeleton Dynamics, Endocytosis, and Cell Motility-A Link Between Neurodegeneration and Cancer? *Frontiers in neurology* 2020, 11, 549006. doi:10.3389/fneur.2020.549006. *Особистий внесок здобувача: написання частини про роль мікроРНК в регуляції цитоскелету та метаболізму при онкологічних процесах.*
5. Hubiernatorova, A.O., Syvak, L.A., Verovkina, N.O., Kropyvko, S.V. ZFP36 expression profiles in breast tumors of different stages and hormonal receptor status. *Biopolymers and Cell* 2024 – у друці. *Особистий внесок здобувача: ЗТ-кПЛР, статистичний аналіз результатів, написання і підготовка статті до друку*

Апробація результатів дослідження. Основні положення дисертації доповідались на поточних наукових семінарах відділів функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, а також на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях: Minisymposium BIOCEV Regeneration III (Прага, Чехія, 28.11.2023), Конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 21.02.2023), All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (Київ, Україна, 15–17.06.2022), XV Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 26–27.05.2021), XIV Всеукраїнська

конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 27–28.05.2020), XI Parnas Conference: Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Київ, Україна, 2018). рт».

УХВАЛИЛИ:

1. Дисертаційна робота Губернаторової Анастасії Олександрівни на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини» є завершеною науково-дослідною роботою та відповідає всім вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

2. Затвердити висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертаційної роботи Губернаторової Анастасії Олександрівни на тему «Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини».

3. Рекомендувати вченій раді Інституту молекулярної біології і генетики НАН України затвердити склад разової спеціалізованої вченої ради:

Голова ради:

Філоненко Валерій Вікторович доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, завідувач відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Рецензенти:

Геращенко Ганна Володимирівна доктор біологічних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Телегєєв Геннадій Дмитрович доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Опоненти:

Гарманчук Людмила Василівна, доктор біологічних наук, професор кафедри екології та зоології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Задворний Тарас Володимирович кандидат біологічних наук, науковий співробітник лабораторії механізмів медикаментозної резистентності Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Голова об'єднаного семінару
доктор біологічних наук,
професор, академік
НАН України, завідувач відділу
сигнальних систем клітини
ІМБГ НАН України

Валерій ФІЛОНЕНКО

Підпис Валерія Філоненка
посвідчується

