

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ,
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГУБЕРНАТОРОВА АНАСТАСІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.21: 577.22

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ТРИСТЕТРАПРОЛІНУ В РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ
ЛЮДИНИ**

09 Біологія

091 Біологія та біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Губернаторова А.О.

Науковий керівник: Кропивко Сергій Вікторович, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Губернаторова А.О. Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія і біохімія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2024.

Тристетрапролін (tristetraprolin, TTP, ZFP36, що кодується геном *ZFP36*) являє собою РНК-зв'язувальний протеїн (РЗП), що бере участь у посттранскрипційній регуляції експресії шляхом деградації цільових мРНК та вважається одним з ключових регуляторів багатьох клітинних процесів, асоційованих із малігнізацією. У той час як в здорових клітинах оптимальний рівень експресії протоонкогенів підтримується за допомогою жорсткого транскрипційного та пост-транскрипційного контролю, в трансформованих клітинах велика кількість таких мРНК мають аномальну стабільність, що призводить до порушень клітинного циклу. Приблизно 15% мРНК мають AU-збагачені елементи (AU-rich repeats, ARE) в їх 3'-нетрансльованих ділянках (3'-НТД) і можуть підлягати регуляції з боку РНК-зв'язувальних протеїнів, одним з яких є ТТР. Показано, що експресія ТТР значно дисрегульована у багатьох типах раку, у тому числі у раку молочної залози (РМЗ), а також показано його участь у деградації мРНК, продукти яких асоційовані із міграцією та інвазією, проте на сьогоднішні дані щодо впливу ТТР та експресію цитоскелет-асоційованих генів недостатньо. **Метою** роботи було вивчення особливостей впливу надекспресії ТТР на експресію цитоскелет-асоційованих генів *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в контексті клітинної рухливості та інвазії на моделі тричі-негативного РМЗ, дослідити вплив доксорубіцину на експресію цих генів та клітинну рухливість, а також оцінити можливість використання ТТР як біомаркера в РМЗ.

В даній роботі було *in silico* проаналізовано 49 транскрипційних варіантів генів, продукти яких залучених до міграції та інвазії, та виявлено, що

24 з них містять у своїх 3'-НТД ARE. Також *in silico* було проаналізовано ймовірність зв'язування ТТР з мРНК генів цитоскелету *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* та виявлено, що вони із високою ймовірністю зв'язуватимуться з ТТР. Для дослідження впливу ТТР на експресію таргетних генів було створено лінію клітин MDA-MB-231, що відповідає тричі-негативному високоінвазивному субтипу РМЗ (ТНРМЗ), із конститутивною надекспресією *ZFP36* та за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі виявлено, що надекспресія *ZFP36* знижує рівень мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN* приблизно в 2 рази, та підвищує рівень мРНК *SH3PXD2B* приблизно в 1,4 рази. При цьому рівень експресії *WIPF1* та *WASL* статистично значуще не змінювався.

Подальші дослідження за допомогою конфокальної мікроскопії фіксованих зразків та машинного аналізу виявили, що модифіковані клітини MDA-MB-231 з надекспресією ТТР мали значно меншу площу, ніж клітини дикого типу, але при цьому їх форма не змінювалася. Також було виявлено, що модифіковані клітини мали більш короткі та широкі актинові філаменти та скупчення актину в кортикальній частині клітин, що в цілому може свідчити про порушення в організації філаментів. Крім того, попри вищу середню інтенсивність сигналу від F-актину у модифікованих клітинах, нормалізована інтенсивність сигналу в цих клітинах була нижчою за таку в клітинах дикого типу, що може як відображати зменшення розміру клітин, так і зниження здатності до полімеризації актину, що узгоджується із зниженням експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B* та *CTTN*. Також за допомогою конфокальної мікроскопії живих клітин було виявлено, що модифіковані клітини мали нижчу здатність до переміщення та направлених рухів, а також демонстрували низький інвазивний потенціал. З даних літератури відомо, що продукти генів *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B* та *CTTN*, а саме протеїни TKS5, TKS4 та кортактин, відповідно, необхідні не тільки для міграції, але і є одними з ключових компонентів інвадоподій, а отже отримані дані підтримують наявні дослідження та розширюють сьогоднішні уявлення про можливі шляхи прямої

або опосередкованої участі ТТР в інгібуванні метастазування.

За допомогою досліджень зразків пухлин РМЗ різних типів виявлено, що експресія *ZFP36* значно варіює в зразках пухлин різних молекулярних типів і значно відрізняється від його експресії в прилеглих тканинах. Так, рівень експресії *ZFP36* був значно вищим у пухлинах усіх типів порівняно із прилеглими тканинами. Також виявлено, що рівень *ZFP36* в пухлинах HER2-збагаченого типу значно вищий за такий, що спостерігався у інших типів. Також виявлено, що середня тривалість життя у когорті пацієнтів із люмінальним В субтипом РМЗ була значно вищою у групі високою експресією *ZFP36*, тоді як у когорті пацієнтів із HER+ субтипом спостерігалася протилежна кореляція. З даних літератури відомо, що високий рівень експресії *ZFP36* вважається позитивним прогностичним маркером у пацієнтів із різними типами раку, а також асоційований із позитивним прогнозом щодо виживання, відповіді на терапію та низького рівня метастазування. Отримані в цьому дослідженні дані свідчать про те, що ТТР не може бути використаний як суто позитивний прогностичний маркер для пацієнтів з РМЗ, оскільки його високий рівень корелює як із сприятливим, так і з несприятливим прогнозом.

В даному дослідженні також показано можливість індукції *ZFP36* клінічно релевантними концентраціями доксорубіцину (DXR) (0,1, 0,5 і 1,0 μM). Показано, що DXR індукує експресію *ZFP36* за дозо-залежним механізмом, а також дисрегулює експресію таргетних цитоскелет-асоційованих генів. При цьому, у лінії MCF7 максимальний рівень ТТР був у 2 рази вищий за такий в інтактних клітинах, а в лінії MDA-MB-231 – в 15 разів. Невідомо, чи таке різке і значне підвищення рівня ТТР має місце *in vivo*, тому необхідні подальші дослідження цього ефекту уже у клінічній площині. Також показано, що DXR знижує рухливість клітин лінії MDA-MB-231 за дозо-залежним механізмом та призводить до значних змін в їх площі, формі та організації актинових філаментів. DXR є одним з основних хіміотерапевтичних препаратів, що застосовуються в протоколах лікування

ТНРМЗ, а також є генотоксичним агентом та значно впливає на транскриптом клітини. Таким чином, отримані нами дані дозволяють поставити під сумнів використання ТТР як виключно позитивного прогностичного маркера для пацієнтів із РМЗ принаймні із тричі-негативним субтипом та розширюють сучасні уявлення щодо впливу доксорубіцину на цитоскелет.

Представлені результати розширюють уявлення про вплив ТТР на інвазивний потенціал клітин тричі-негативного РМЗ людини, розкривають нові потенційні аспекти його функціонування як регулятора морфології та рухливості цих клітин, характеризують зміни експресії асоційованих із цитоскелетом генів *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B* та *CTTN* під впливом конститутивної надекспресії ТТР в клітинах ТНРМЗ, а також під впливом DXR. Крім того, дане дослідження виявляє спірність застосування ТТР як суто позитивного прогностичного біомаркеру РМЗ.

Ключові слова: Рак молочної залози, карцинома, канцерогенез, метастази, інвазія, міграція, кортактин, галуження актину, тристетрапролін, ген-супресор пухлин, відносна експресія генів, прогноз, доксорубіцин, MCF7, MDA-MB-231

Список публікацій здобувача:

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 ТТР, обробка клітин, 3Т-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, 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: 3Т-кПІР, статистичний аналіз результатів, написання і підготовка статті до друку.*

6. Hubiernatorova, A.; Gerasymchuk, D.; Kropyvko, S. Investigation of posttranscriptional regulation of genes involved in cytoskeleton dynamics. All-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation 2021, 37, 185–244.

7. Hubiernatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O.; Lavrynenko, K.; Syvak, L.; Verovkina, N.; et al. Tristetraprolin In Cancer: Treat Or Trick? All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, 2022, 127.

8. Hubiernatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O. Tristetraprolin in breast cancer. Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023 2023, 39, 66.

9. Hubiernatorova, A.; Gerasymchuk, D. MicroRNA and RBP-based regulation of genes involved in the remodelling of actin cytoskeleton. In XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”; 2018; pp 77–84. doi:10.4324/9780429244506-9.

SUMMARY

Hubiernatorova A.O. Tristetraprolin in breast cancer. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (091 Biology). – Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

Tristetraprolin (tristetraprolin, TTP, ZFP36, encoded by the ZFP36 gene) is an RNA-binding protein (RBP) involved in post-transcriptional regulation of gene expression via degradation of target mRNAs. It is considered one of the key regulators of many cellular processes associated with malignancy. In healthy cells, the optimal expression level of proto-oncogenes is maintained through strict transcriptional and post-transcriptional control, while in malignant cells, many of these mRNAs exhibit abnormal stability, leading to disruptions in the cell cycle. Approximately 15% of mRNAs contain AU-rich elements (AREs) in their 3'-untranslated regions (3'-UTRs) and may be regulated by RNA-binding proteins, one of which is TTP. It has been shown that TTP expression is significantly dysregulated in various types of cancer, including breast cancer (BC), and its involvement in the degradation of mRNAs associated with migration and invasion has been demonstrated. However, there is insufficient data on the impact of TTP on the expression of cytoskeleton-associated genes.

The study aimed to investigate the effects of TTP overexpression on the expression of cytoskeleton-associated genes *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1*, and *WASL* in the context of cell motility and invasion in a triple-negative breast cancer (TNBC) model, investigate the effects of doxorubicin on the expression of these genes and cell mobility, and evaluate the potential use of TTP as a biomarker in BC.

In this study, 49 transcript variants of genes involved in migration and invasion were analyzed *in silico*, and it was found that 24 of them contain AREs in

their 3'-UTRs. Additionally, *in silico* analysis of the probability of TTP binding to mRNAs of *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1*, and *WASL* revealed a high probability of binding. To investigate the effect of TTP on the expression of target genes, a cell line MDA-MB-231, representing a highly invasive triple-negative breast cancer subtype (TNBC), with constitutive overexpression of *ZFP36* was generated. Real-time quantitative PCR revealed that *ZFP36* overexpression reduced *SH3PXD2A* and *CTTN* mRNA levels by approximately twofold, while *SH3PXD2B* mRNA levels increased by approximately 1.4-fold. The expression of *WIPF1* and *WASL* did not show statistically significant changes.

Further investigation via confocal microscopy revealed that MDA-MB-231 cells with TTP overexpression had significantly reduced cell areas compared to wild-type cells, but their shape remained unchanged. Additionally, the cells exhibited shorter and wider actin filaments as well as increased cortical actin intensity, suggesting a dysregulation in filament organization. Despite a higher average F-actin intensity in TTP-overexpressing cells, the integrated F-actin intensity in these cells was lower than that in wild-type cells, which may reflect both reduced cell size and a decreased ability to polymerize actin. This is consistent with the observed reduction in *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, and *CTTN* expression. Moreover, time-lapse live-cell imaging revealed that modified cells had decreased motility and directed movement capacity and demonstrated reduced invasive potential. Literature suggests that the products of *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, and *CTTN* genes, encoding the proteins TKS5, TKS4, and cortactin, respectively, are essential for both migration and invadopodia formation. Therefore, the data presented support existing research and expand current knowledge about potential direct or indirect roles of TTP in inhibiting metastasis.

Analysis of breast cancer tissue samples of different types revealed that *ZFP36* expression significantly varied across samples of different molecular subtypes and differed considerably from its expression in adjacent tissues. *ZFP36* expression was found to be significantly higher in tumors of all types compared to adjacent tissues. Notably, *ZFP36* levels were significantly higher in HER2-enriched

tumors compared to other types. Additionally, the median survival in a cohort of patients with luminal B subtype breast cancer was significantly higher in the group with high *ZFP36* expression, while an opposite correlation was observed in the cohort of HER+ patients. Literature suggests that high *ZFP36* expression is considered a positive prognostic marker in patients with various cancer types, associated with positive survival prognosis, response to therapy, and low metastasis levels. The data obtained in this study indicate that TTP cannot be used as a purely positive prognostic marker for breast cancer patients, at least for those with the triple-negative subtype, as its high levels correlate with both favorable and unfavorable prognoses.

The study also demonstrated the possibility of inducing *ZFP36* expression with clinically relevant concentrations of doxorubicin (DXR) (0.1, 0.5, and 1.0 μ M). It was shown that DXR induces *ZFP36* expression in a dose-dependent manner and dysregulates the expression of target cytoskeleton-associated genes. In the MCF7 cell line, the maximum level of TTP was found to be twice as high as in intact cells, while in the MDA-MB-231 cell line, it was 15 times higher. Whether such a sharp and significant increase in TTP levels occurs in vivo remains unclear, and further research is needed to investigate this effect in clinical settings. Additionally, it was shown that DXR decreases the motility of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner and causes significant changes in their area, shape, and actin filament organization. Since DXR is one of the main chemotherapeutic agents used in treatment protocols for triple-negative breast cancer and is a genotoxic agent that significantly affects the cell transcriptome, the data obtained may limit the use of TTP as a purely positive prognostic marker for patients with breast cancer, particularly those with the triple-negative subtype, and expand current understanding of the effects of doxorubicin on the cytoskeleton.

The results presented in this study expand the understanding of the impact of TTP on the invasive potential of triple-negative breast cancer cells, uncover new potential aspects of its role as a regulator of morphology and motility in these cells, describe changes in the expression of cytoskeleton-associated genes *SH3PXD2A*,

SH3PXD2B, and *CTTN* under the influence of constitutive TTP overexpression in TNBC cells and DXR treatment, and highlight the controversial application of TTP as a purely positive prognostic biomarker in breast cancer.

Key words: Breast cancer, carcinoma, carcinogenesis, metastases, invasion, migration, cortactin, actin branching, tristetraprolin, tumor suppressor gene, relative gene expression, prognosis, doxorubicin, MCF7, MDA-MB-231.

List of publications on the topic of the dissertation

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.
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.
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.
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.
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 – in press.
6. Hubiernatorova, A.; Gerasymchuk, D.; Kropyvko, S. Investigation of posttranscriptional regulation of genes involved in cytoskeleton dynamics. All-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation 2021, 37, 185–244.
7. Hubiernatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O.; Lavrynenko, K.; Syvak, L.; Verovkina, N.; et al. TRISTETRAPROLIN IN CANCER: TREAT OR TRICK? All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, 2022, 127.

8. Hubiarnatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O. Tristetraprolin in breast cancer. Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023 2023, 39, 66.
9. Hubiarnatorova, A.; Gerasymchuk, D. MicroRNA and RBP-based regulation of genes involved in the remodelling of actin cytoskeleton. In XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”; 2018; pp 77–84. doi:10.4324/9780429244506-9.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ARE	– AU-rich repeats, AU-збагачені повтори
CTTN	– cortactin, кортактин
DMEM	– Dulbecco modified Eagle medium, модифіковане Дульбекко середовище Ігла
DXR	– doxorubicin, доксорубіцин
ER	– estrogen receptor, естрогеновий рецептор
FBS	– fetal bovine serum, ембріональна сироватка теляти
HER2	– human epidermal growth factor receptor 2, рецептор 2 людського епідермального фактора росту
NPF	– nucleation promoting factor, фактор нуклеації (актину)
N-WASP	– neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein, нейрональний протеїн, асоційований із синдромом Віскота-Олдріча
PBS	– phosphate buffered saline, натрій-фосфатний буфер
PR	– progesterone receptor, прогестеронової рецептор
TTP	– tristetraprolin, тристетрапролін
TKS4	– tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains, субстрат тирозинкінази з 4 SH3 доменами
TKS5	– tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains, субстрат тирозинкінази з 5 SH3 доменами
WIP	– WASP interacting protein, протеїн, що взаємодіє з WASP
АЗП	– ARE-зв'язувальні протеїни
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
екТТР	– MDA-MB-231-екТТР, модифікована лінія MDA-MB-231 із надекспресією ТТР
ЗТ-кПЛР	– кількісна ПЛР із зворотною транскрипцією
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
РЗП	– РНК-зв'язувальні протеїни

РМЗ	–	рак молочної залози
ТНРМЗ	–	тричі-негативний рак молочної залози
З`НТД	–	З`-нетрансльована ділянка

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Рак молочної залози: сучасний стан проблеми.....	29
1.2. Молекулярні механізми метастазування	34
1.2.1. Загальні відомості	34
1.2.2. Характеристика деяких протеїнів, що є ключовими компонентами міграції та інвазії.....	37
1.3. Посттранскрипційна регуляція експресії в контексті канцерогенезу ...	38
1.4. Регуляція експресії за участі РНК-зв'язувальних протеїнів при онкологічних процесах.....	41
1.5. Характеристика ТТР та його участь у різних процесах, пов'язаних з канцерогенезом	42
1.6. Загальні відомості про доксорубіцин та механізми його впливу на транскрипційний профіль клітин	48
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1. Матеріали	50
2.2. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей.....	52
2.3. Виділення геномної ДНК	52
2.4. Виділення тотальної РНК.....	53
2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі	53
2.6. Видалення геномної ДНК з препаратів тотальної РНК за допомогою ДНКазі І.....	54

2.7. Синтез кДНК з тотальної РНК.....	55
2.8. Реакції рестрикції та лігування	54
2.9. Аналіз експресії методом кількісної ПЛР в реальному часі	55
2.10. Обчислення результатів ПЛР в реальному часі	57
2.11. Приготування компетентних клітин	57
2.12. Культивування клітин ліній MDA-MB-231, MCF7 та MDA-MB-231 з ектопічною експресією ТТР.....	58
2.13. Трансфекція клітин лінії MDA-MB-231 плазмідною ДНК	59
2.14. Створення лінії MDA-MB-231 із стабільною надекспресією ТТР	59
2.15. Визначення зміни копійності гену ZFP36 у клітинах із стабільною експресією ТТР.....	60
2.16. Обробка клітин доксорубіцином.....	61
2.17. Визначення життєздатності клітин за допомогою ресазурину із спектрофотометричною детекцією	61
2.18. Конфокальна мікроскопія фіксованих препаратів клітин	62
2.19. Конфокальна мікроскопія живих препаратів клітин	63
2.20. Визначення здатності клітин до інвазії.....	64
2.21. Трансформація клітин <i>E.coli</i> плазмідною ДНК	65
2.22. Виділення плазмідної ДНК	66
2.23. Приготування лізатів клітин MCF7 та MDA-MB-231 для виділення тотального протеїну	67
2.24. Визначення концентрації протеїну в лізатах клітин MCF7 та MDA-MB-231	67
2.25. Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах.....	67
2.26. Вестерн-блот аналіз	68

2.27. Статистичний аналіз даних	69
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	70
3.1. Вивчення можливості впливу TTP на експресію <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i>	70
3.1.1. Пошук регуляторних елементів в мРНК генів, залучених до реорганізації цитоскелету	70
3.1.2. Характеристика клітинної лінії MDA-MB-231 з конститутивною ектопічною експресією TTP	77
3.1.3. Визначення впливу надекспресії TTP на рівні мРНК <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i>	79
3.2. Вивчення впливу TTP на морфологію, рухливість та інвазійний потенціал клітин лінії MDA-MB-231	82
3.2.1. Вивчення впливу TTP на морфологію клітин та актинові філаменти... ..	82
3.2.2. Вивчення впливу TTP на рухливість клітин	85
3.2.3. Дослідження впливу ектопічної експресії клітин на інвазійний потенціал клітин	87
3.3. Аналіз експресії <i>ZFP36</i> в зразках пухлин молочної залози людини різних типів та його використання в якості прогностичного маркеру	89
3.3.1. Підбір зразків пухлин молочної залози людини різних типів	89
3.3.2. Визначення профілю експресії <i>ZFP36</i> в зразках пухлин молочної залози людини різних типів	91
3.3.3. Аналіз виживаності пацієнтів з РМЗ різних субтипів у когортах з високим та низьким рівнями експресії <i>ZFP36</i>	96
3.4. Дослідження впливу DXR на рівні експресії мРНК <i>ZFP36</i> , <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i> на моделі люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози	100

3.4.1. Визначення цитотоксичності DXR для клітин ліній MCF7 та MDA-MB-231	101
3.4.2. Вивчення впливу клінічно релевантних концентрацій DXR на рівні ТТР в клітинах лінії MCF7 та MDA-MB-231	103
3.4.3. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i> в клітинах ліній MCF7 та MDA-MB-231	105
3.4.3.1. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i> в клітинах лінії MCF7	106
3.4.3.2. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК <i>SH3PXD2A</i> , <i>SH3PXD2B</i> , <i>CTTN</i> , <i>WIPF1</i> та <i>WASL</i> в клітинах лінії MDA-MB-231	108
3.5. Вивчення впливу DXR на морфологію та рухливість клітин лінії MDA-MB-231	113
3.5.1. Вивчення впливу DXR на морфологію клітин	113
3.5.2 Вивчення впливу DXR на рухливість клітин	116
 РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	119
ВИСНОВКИ.....	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	132
ДОДАТОК А.....	165

ВСТУП

Актуальність теми. Рак молочної залози (РМЗ) являє собою одне із найпоширеніших у світі злоякісних новоутворень серед жінок та досі залишається значною глобальною проблемою охорони здоров'я, оскільки щороку у світі діагностують мільйони нових випадків захворювання. У 2022 році РМЗ залишався значним навантаженням на систему охорони здоров'я, налічуючи 2,3 мільйона нових випадків та близько 685 000 смертей (1). 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 (2). 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 це призводить до рецидивів хвороби, порушення функцій віддалених органів і смертю внаслідок органної недостатності(3). Однією з ключових ознак метастазування є здатність малігнізованих клітин відділятися від первинної пухлини, мігрувати до прилеглих тканин через деградацію позаклітинного матриксу (ПКМ) та проникати в лімфатичні та/або кровоносні судини, надалі мігруючи до віддалених тканин з подальшим утворенням вторинних пухлин. Такий фенотип зазвичай реалізується за допомогою спеціалізованих актин-збагачених протрузій, так званих подосом та інвадоподій (4).

Формування подосом і інвадоподій потребує реорганізації актинового цитоскелету, тонко координованого базового клітинного механізму, перебіг якого вимагає злагодженої роботи великої кількості різноманітних протеїнів, об'єднаних у супрамолекулярні комплекси. Ці протеїни можна поділити на кілька категорій: фактори, що стимулюють нуклеацію актину, фактори

полімеризації, стабілізації та дестабілізації філаментів, скафолдні протеїни, GTPази, кінази, протеази та інтегрини, які активують формування або дисоціацію подосом та інвадоподій, або ж утримують їх в стабільному стані (5,6). Здатність малігнізованих клітин долати жорсткий транскрипційний контроль експресії генів, що сприяють виживанню та інвазії, може реалізуватися (окрім інших механізмів) зміною стабільності певних мРНК. У здорових клітинах оптимальний рівень мРНК генів, залучених у виживання та проліферацію, підтримується через жорсткі транскрипційні та посттранскрипційні механізми, а в злоякісних клітинах мРНК багатьох категорій генів, в тому числі протоонкогенів, про-інвазивних генів та цитокінів, мають аномально високу стабільність, що призводить до порушення нормального клітинного циклу і впливає на загальну долю клітини. Значна кількість таких мРНК містить AU-збагачені елементи (AU-rich elements, ARE) в їх 3'-нетрансльованих ділянках (3'НТД) і може регулюватися специфічними РНК-зв'язувальними протеїнами (РЗП), такими як тристетрапролін (7).

Тристетрапролін (TTP, ZFP36, GOS24, GOS24, TIS11, NUP475, RNF162A) – це РНК-зв'язувальний протеїн, що належить до родини тристетрапролінів і кодується геном *ZFP36*. Його фізіологічна функція полягає в негативній регуляції таргетних транскриптів, що містять специфічні сайти зв'язування для TTP, до яких, зокрема, відносяться ARE (8,9). Ці транскрипти-мішені часто є компонентами прозапальних та протоонкогенних сигнальних шляхів, що дозволило розглядати TTP як потенційний супресор пухлин. Відомо, що експресія *ZFP36* значно знижена в багатьох видах раку, а також описано його інгібуючий вплив на міграцію та інвазію трансформованих клітин (7). Так, у сучасній літературі наявні дані про те, що TTP може зменшувати міграційний та інвазійний потенціали різних видів пухлин шляхом регулювання численних генів-мішеней. Проте, незважаючи на постійні дослідження даних для розуміння механізмів впливу TTP на ці властивості і досі недостатньо. Зокрема, на разі невідомо, чи може TTP впливати на міграцію та інвазію клітин шляхом регуляції експресії генів,

залучених до реорганізації цитоскелету. Оскільки міграція та інвазія клітин прямо залежить від успішного ремоделювання актинових філаментів, такі дослідження могли б розширити сучасне розуміння пост-транскрипційної регуляції цих процесів та використовуватися для подальших досліджень, направлених на розробку потенційних діагностичних маркерів та виявлення нових мішеней для таргетної терапії раку, зокрема, раку молочної залози.

Одним із не менш важливих аспектів у вивченні канцерогенезу є дослідження впливу хіміотерапевтичних препаратів на фізіологію трансформованих клітин. Подібні дослідження сприяють не тільки фундаментальному розумінню патофізіологічних процесів, що протікають під час хіміотерапії, але і дозволяють визначити механізми, завдяки яким певний терапевтичний агент реалізує свою дію. Крім того, такі дослідження допомагають оцінити гранично допустимі дози препаратів. Так, одним із основних препаратів у лікуванні РМЗ є доксорубіцин (DXR) – антибіотик антрациклінового ряду, що інтеркалює ДНК і призводить до генотоксичного стресу (10). Залежно від субтипу, в терапії РМЗ використовують декілька стратегій. Якщо позитивні за експресією гормональних рецепторів пухлини можна лікувати за допомогою гормональної терапії, то тричі-негативний рак молочної залози внаслідок нечутливості до останньої можливо лікувати лише за допомогою хіміотерапії. Однак, навіть пацієнти із рецептор-позитивними пухлинами часто додатково отримують хіміопрепарати, наприклад, DXR, оскільки ад'ювантна терапія використовується не тільки для пригнічення прогресування пухлини, але й для запобігання метастазам.

У даній праці дослідження проводили як на клітинних лініях MCF7 та MDA-MB-231, які відповідають найменш агресивному, але найпоширенішому люмінальному А субтипу та найбільш гетерогенному тричі-негативному субтипу РМЗ, відповідно, так і на зразках, отриманих безпосередньо від пацієнтів.

Мета і завдання дослідження. Метою даного дисертаційного дослідження є вивчення особливостей впливу ТТР 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, а також вивчення впливу DXR на експресію *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, морфологію і рухливість клітин, а також можливість його застосування як біомаркера РМЗ.

Відповідно до мети роботи було поставлено 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 ТТР з мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, що кодують цитоскелет-асоційовані протеїни TKS5, TKS4, CTTN, WIP та N-WASP, відповідно.
3. Вивчити вплив конститутивної надекспресії *ZFP36* на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* та вплив конститутивної надекспресії *ZFP36* на морфологію, організацію актинових філаментів та рухливість клітин лінії MDA-MB-231 із його стабільною надекспресією.
4. Визначити рівень експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних субтипів та оцінити можливість його використання як біомаркеру певних субтипів пухлин молочної залози людини.
5. Вивчити вплив DXR на експресію *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MCF7 та MDA-MB-231, та 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 TTP на морфологічні характеристики клітин моделі РМЗ, їх рухливість та здатність до інвазії, а також доцільність використання TTP 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-екTTP, трансфекція клітин MDA-MB-231, створення клітинної лінії із стабільною надекспресією TTP, визначення інвазивності клітин за методом Бойдена, визначення метаболічної активності клітин за допомогою ресазурину, трансформація бактеріальних клітин, імуноцитохімічні методи, конфокальна мікроскопія препаратів живих і фіксованих клітин, статистичні методи обробки даних та ін.

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 TTP значно знижує рівень мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, а також значно підвищує рівень мРНК *SH3PXD2B* на моделі ТНРМЗ людини. Вперше за допомогою конфокальної мікроскопії живих клітин безпосередньо показано інгібуючий вплив надекспресії TTP на рухливість клітин та їх здатність до направленого руху. Описано вплив надекспресії TTP 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 DXR значно підвищують рівень мРНК та протеїну TTP на моделі раку молочної залози людини, а також змінюють профіль експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2* та *CTTN*. Показано, що DXR 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 отриманих результатів. Отримані дані розширюють уявлення про роль ТТР у канцерогенезі. Представлені дослідження вказують на те, що описаний інгібуючий вплив ТТР 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 DXR на рівні як мРНК, так і білкового продукту ТТР вказують на те, що необхідні подальші дослідження щодо використання його як біомаркера принаймні в тричі-негативному та люмінальному А субтипах РМЗ. Високий рівень ТТР вважається позитивним прогностичним маркером, але якщо підвищення його експресії має місце *in vivo* у пацієнтів, що отримували DXR в якості терапії, то в такому випадку неможливо сказати, чи високий рівень ТТР є показником сприятливого фізіологічного стану пацієнта, чи є транзитним станом, викликаним терапією. Окрім того, наші дослідження показують, що профіль експресії ТТР 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 (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).

Дисертантка висловлює щире подяку керівнику відділу проф. Риндич А.В, науковому керівнику к.б.н. Кропивко С.В., а також д-ру З. Годному та д-ру Й. Новаку (Інститут молекулярної генетики Чеської Академії Наук) за надану допомогу з планування та проведення експериментальних досліджень, обговорення отриманих результатів та підготовку результатів до публікації. Також авторка висловлює щире подяку М. Вашковічовій та Д. Секачу (Інститут фізіології та генетики тварин Чеської Академії Наук) за допомогу у використанні необхідного обладнання.

Апробація результатів дисертації. 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).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 4 статті у наукових фахових журналах, 1 стаття знаходиться у друці, та 6 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 277 найменувань. Дисертація викладена на 166 сторінках стандартного машинопису і містить 26 рисунків та 5 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рак молочної залози: сучасний стан проблеми

Рак молочної залози (РМЗ) є однією з найактуальніших проблем сучасної онкології та головною причиною смертності від онкологічних захворювань серед жінок у світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у 2022 році було зафіксовано понад 2,3 мільйона нових випадків РМЗ, що становить приблизно 24,5% усіх злоякісних пухлин у жінок (1). В Україні, за даними Національного канцер-реєстру, РМЗ 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 (2). Хоча історично вважається, що РМЗ є хворобою переважно розвинених країн, у 2020 році більше половини діагностованих випадків та дві третини смертей, пов'язаних із РМЗ, припали на менш розвинені регіони світу (11).

Незважаючи на прогрес у діагностиці та лікуванні, РМЗ залишається терапевтично складним через свою гетерогенність. Клінічні прояви та молекулярні особливості пухлин суттєво відрізняються у різних пацієнтів, що ускладнює вибір найбільш ефективної терапії. Традиційно РМЗ класифікують на 4 основні субтипи на основі статусу рецепторів до прогестерону (progesterone receptor, PR), естрогену (estrogen receptor, ER) та рецептора 2 людського епідермального фактору росту (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) та наявності або відсутності інших молекулярних маркерів (детальну інформацію представлено в таблиці 1.1). Люмінальний А є PR, ER-позитивним, HER2-негативним, і як правило характеризується низькою агресивністю; люмінальний В також є PR, ER-позитивним, але з

характеризується вищим за люмінальний А рівнем маркерів проліферації та/або надекспресією HER2; HER2-збагачений субтип характеризується надмірною експресією або ампліфікацією HER2, є більш агресивним за два попередні і вимагає таргетної терапії; і, нарешті, тричі-негативний субтип, що є найбільш гетерогенним з усіх та характеризується відсутністю експресії всіх трьох рецепторів, високою агресивністю та обмеженими можливостями лікування (12). Окрім цього, кожен субтип характеризується експресією специфічних маркерних генів, кількість яких рік від року зростає, а отже важливим є дослідження як самих генів-кандидатів, так і їх надійності в якості маркерних молекул в контексті прикладних клінічних аспектів (13–15).

Таблиця 1.1

Класифікація пухлин молочної залози: маркери і прогнози (16).

Тип	Підтип	Додаткові генетичні маркери		Прогноз
Люмінальний А ER ⁺ PR ⁺ HER2/ neu ⁻ ≈40-60%*		Низький Ki-67	CK8/18 ⁺ , FOXA1 ⁺ , ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1, CK5/6 ⁻ , EGFR ⁻	Сприятливий

Продовж. табл.1.1

Люмінальний В ER ⁺ PR ⁺ HER2/ neu ^{+/-} ≈6-20%*	Люмінальний В HER2 ⁻ ER ⁺ PR ⁺ HER2/n eu ⁻ ≈15-20%*	Високий Ki-67	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4 B, CK5/6 ⁻ , EGFR ⁻ , TP53 ⁻	Проміжний
	Люмінальний В HER2 ⁺ ER ⁺ PR ⁺ HER2/n eu ⁺ ≈6%*			Негативний / Проміжний
HER2- збагачений ER ⁻ PR ⁻ HER2/neu ⁺ ≈10-20%*			CK5/6 ⁺ GRB7 ⁺ , ERBB2, EGFR ^{+/-} TP53 ⁻	Негативний
Тричі негативний ER ⁻ PR ⁻ HER2/neu ⁻ ≈5-25%*	Аденоїдно- кістозна карцинома ≈1%*	MYB-NFIB (злиття генів)	EGFR ⁺ , CK5/6 ⁺ , CK14 ⁺ , CK17 ⁺	Сприятливий
	Медулярна карцинома ≈2%*		HER1 ⁺ , Cyclin E ⁺ , CDKN2A	Сприятливий
	BRCA1- асоційований	ID4 ⁺	⁺ , KRT5, CDH3,	Негативний
	Базальний ≈10-25%*	BRCA1 ⁻ , TP53 ⁻ ,	ID4, FABP7,	Негативний

		CDKN2A ⁺ , RB1, FGFR2, маркери стовбурових клітин ⁺ , CK5/6 ⁺ , EGFR ⁺	KRT17, TRIM29, LAMC2, ITGB4	
	Низькоклаудин овий ≈7-14%*	GATA3 регулятори ⁻ , гени клітинної адгезії, CDH1 ⁻ , клаудин ⁻ , CK5/6 ^{+/-} , EGFR ^{+/-} CD44 ⁺ , SNAI3 ⁺		Негативний
	Метапластич- на карцинома ≈1%*	GATA3 регулятори ⁻ , гени клітинної адгезії, PIK3CA ⁻ , AKT ⁻ або KRAS ⁻ , EMT ⁺ , маркери		Проміжний

		стовбурових клітин ⁺		
	Апокринна карцинома			Проміжний
	Інтерферон- збагачений ≈10%*	STAT1 ⁺ , SP110 ⁺ , інтерферон- регулювальні гени ⁺		Проміжний

Дослідження механізмів розвитку та прогресії РМЗ є вкрай важливим не лише через високу захворюваність, але й через потребу в нових біомаркерах для точнішої діагностики та розробки персоналізованих підходів до лікування. Висока гетерогенність РМЗ потребує якнайбільш тонкої діагностики, оскільки навіть один і той самий субтип може поділятися на декілька інших залежно від статусу певних маркерних молекул та мати різний прогноз (17–21). Наприклад, для люмінального Б типу при прогнозуванні та підборі терапевтичної стратегії враховують наявність або відсутність експресії HER2, оскільки показано, що у випадку використання неоад'ювантної терапії кращий клінічний результат демонструють HER2-негативні пацієнти, тоді як при відсутності неоад'ювантної терапії – HER2-позитивні пацієнти (22).

Як видно з таблиці 1.1, лише на сьогодні тричі-негативний РМЗ має 8 підтипів, з яких 2 мають сприятливий прогноз, 3 – несприятливий, та 3 – проміжний (23). Наведені дані підкреслюють нагальну потребу у проведенні досліджень, спрямованих на розробку більш точних методів діагностики, які б дозволяли не лише максимально точно визначати тип РМЗ у кожного конкретного пацієнта, але й забезпечували більш обґрунтований прогноз щодо агресивності пухлини та виживаності. Крім того, необхідне також і провадження досліджень щодо надійності використання тих чи інших маркерних молекул в клінічній практиці, оскільки часто власне маркерами

виступають зміни рівнів експресії певних генів. Пацієнти із онкологічними захворюваннями отримують достатньо жорстку терапію, що в тому числі може впливати на профілі експресії маркерних генів, таким чином нівелюючи їх діагностичну цінність. Отже, дослідження цих аспектів є важливим і перспективним напрямом, що сприятиме розробці більш точних і надійних підходів у персоналізованій медицині.

1.2. Молекулярні механізми метастазування

1.2.1. Загальні відомості. Утворення метастазів є основною причиною асоційованої з раком смертності (3). Однією з ключових ознак метастазування є здатність малігнізованих клітин відділятися від первинної пухлини, мігрувати до прилеглих тканин через деградацію позаклітинного матриксу та проникати в лімфатичні та/або кровоносні судини, надалі мігруючи до віддалених тканин з подальшим утворенням вторинних пухлин (24). Коли малігнізовані клітини з током лімфи або крові потрапляють в лімфатичні вузли або віддалені органи, вони можуть як на певний час стати сплячими (англ. *senescent*), що в майбутньому може призвести до рецидиву хвороби, так і негайно дати початок вторинній пухлині, що врешті-решт зруйнує орган і призведе до смерті внаслідок органної недостатності (25,26). Крім того, принаймні в РМЗ показано також дисемінацію клітин не лише від первинної пухлини, а і від метастазів в легенях, що підкреслює важливість досліджень механізмів інвазії (27).

Хоча метастатична поведінка клітин реалізується за допомогою численних сигнальних каскадів, кожен з них врешті призводить до реорганізації цитоскелету – базової системи клітини, необхідної для здійснення будь-яких рухів. Здатність клітини до направлених рухів реалізується за допомогою динамічної реорганізації актинових філаментів, а саме завдяки утворенням специфічних актин-збагачених протрузій

плазматичної мембрани – подосом, або «клітинних ніжок» (28–30). У злоякісно перероджених клітинах аналогом подосом є інвадоподії (рис. 1.1), які можуть руйнувати позаклітинний матрикс, що призводить до набуття такими клітинами здатності проникати в судинне русло шляхом екстравазації і, як наслідок, мігрувати у віддалені органи і тканини (31). Інвадоподії відрізняються від звичайних подосом наявністю специфічних маркерних білків, морфологією, часом життя та низкою інших характеристик (5).

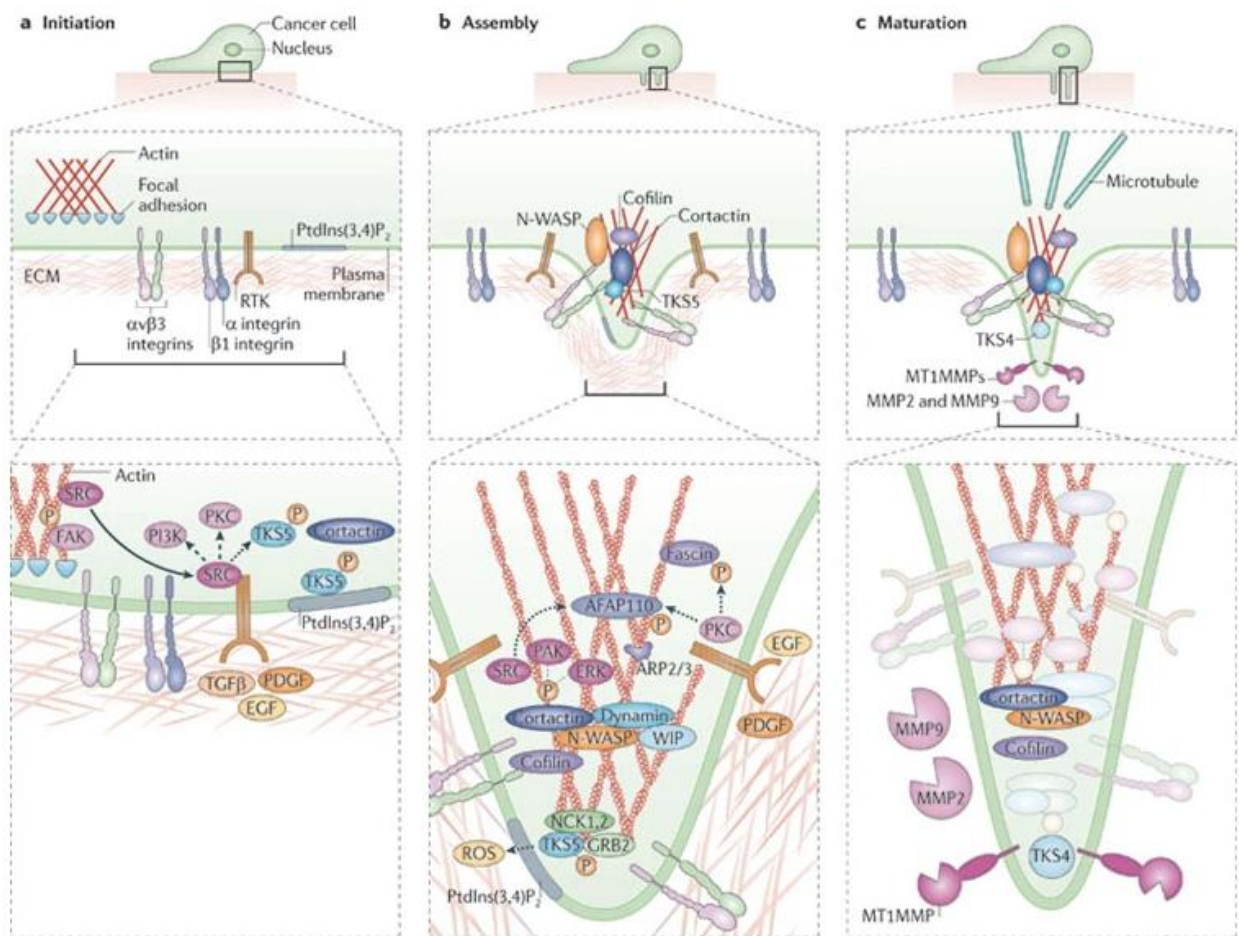


Рис. 1.1. Схематичне зображення етапів формування інвадоподій та деякі протеїни, залучені в цьому процесі (адаптовано з Murphy and Courtneidge 2011 (5))

Цитоскелет являє собою одну з найбільш мобільних та складних клітинних структур. За його участі відбуваються такі життєво необхідні

процеси, як клітинний транспорт, ділення, набуття і підтримання клітиною певної морфології, ендо- та екзоцитоз, міграція, інвазія, відповідь на внутрішні та зовнішні стимули та інші важливі процеси (32). Їх реалізація прямо залежить від точної, проте елегантно регульованої реорганізації компонентів цитоскелета, до яких відносять мікротрубочки, актинові та проміжні філаменти. Ці структури утворені великою кількістю різноманітних протеїнів різних класів, що формують тісний інтерактом та виконують свою функцію шляхом полімеризації/деполімеризації філаментів (33). Такі процеси потребують не лише власне протеїнів, що формують філаменти, але і великої кількості допоміжних факторів, таких як: фактори нуклеації та полімеризації, що сприяють утворенню первинних філаментів; фактори кепування, що попереджують їх ріст, або, навпаки, фактори деполімеризації; фактори полімеризації, що підтримують ріст філаментів та можуть виступати каталізатором цього процесу; крослінкери та фактори стабілізації для організації та побудови більш складних структур; а також адаптерні протеїни, що полегшують формування мультипротеїнових комплексів на кожному з етапів, кінази, які активують багато вищеописаних компонентів, та інші (34).

Утворення актинових фібрил *de novo* вимагає тримеризації G-актину, що надалі стає ядром полімеризації. Проте, формування такого тримеру потребує певного часу і без прискорення реакції неможлива швидка реорганізація, що спостерігається *in vivo* (35–37). Прискорення тримеризації актину відбувається завдяки протеїновим партнерам (так званим факторам нуклеації актину, *actin nucleation promoting factors*, NPFs), зокрема, комплексу Arp2/3 (*actin-related proteins 2/3 complex*, комплекс актин-споріднених протеїнів 2/3) (38). Крім того, Arp2/3 також зв'язується з вже сформованими актиновими фібрилами, які завдяки цьому утворюють стабільні сітчасті структури мембранних протрузій і забезпечують міграцію клітин, проте сам по собі комплекс Arp2/3 є слабким нуклеатором, а тому потребує допоміжних NPF (39).

1.2.2. Характеристика деяких протеїнів, що є ключовими компонентами міграції та інвазії. Додаткові NPFs необхідні для стимуляції галуження актинових філаментів комплексом Arp2/3, та представлені двома класами: NPFs класу I, що діють в безпосередній близькості від Arp2/3 та актинових фібрил, та NPF класу II, що можуть прямо взаємодіяти з Arp2/3 та фібрилами (40–42). Суперродина протеїнів WASP є добре вивченими нуклеаторами I класу, що сприяє швидкій полімеризації філаментів під клітинною мембраною – важливого кроку в реалізації різноманітних фізіологічних та патофізіологічних процесів, в тому числі інвазії. Один з членів цієї родини – N-WASP (neurol Wiskott-Aldrich associated protein, нейрональний білок, асоційований із синдромом Віскотта-Олдріча), що кодується геном *WASL* – рекрутує мономери актину до Arp2/3, стимулюючи його здатність до формування стабільного ядра полімеризації (43,44). Інший член родини, WIP (WASP-interacting protein, протеїн, що взаємодіє з WIP, кодується геном *WIPF*) взаємодіє з N-WASP та регулює його локалізацію, стабільність та активність (45,46). Разом ці протеїни беруть участь в формуванні та ефективній реорганізації інвадоподій та подосом, і дисрегуляція їх активності або експресії відповідних генів асоційована із прогресуванням пухлин та метастазуванням деяких пухлин, в тому числі пухлин молочної залози (47). Інший фактор нуклеації, кортактин, кодується геном *CTTN* належить до NPF II класу. Кортактин необхідний для формування розгалужених філаментів і разом із WIP та N-WASP є одним із ключових компонентів інвадоподій (47–49). Показано, що кортактин посилює здатність N-WASP до активації Arp2/3 та інгібує деградацію гілок у розгалужених філаментах, сприяючи таким чином рухливості клітин (40,50).

Іншим ключовим компонентом інвадоподій є протеїн TKS5 (tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains, кодується геном *SH3PXD2A*). TKS5 являє собою великий скафолдний протеїн, що взаємодіє із кортактином та N-WASP, сприяє реорганізації філаментів в подосомах та інвадоподіях та локалізується специфічно в цих структурах (51,52). Разом із кортактином та ще одним

протеїном родини TKS, TKS4 (tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains, кодується геном *SH3PXD2B*) він залучений до сигнальної трансдукції через EGFR (рецептор епідермального фактору росту, epidermal growth factor receptor), слугуючи платформою для машинерії, необхідної для міграції та розпластування клітин (53–55). EGF-активовані клітини характеризуються підвищеним рівнем фосфатидилінозитолтрифосфату (PI(3,4,5)P₃), і його дефосфорилування призводить до утворення фосфатидилінозитолдифосфату (PI(3,4)P₂), що в свою чергу рекрутує TKS5 до плазматичної мембрани та призводить до ініціації інвадоподій та подосом(56). Показано, що TKS5 сприяє міграції та інвазії малігнізованих клітин *in vitro* та *in vivo*, а його надекспресія корелює з підвищеною частотою формування інвадоподій, деградацією ПКМ та метастазуванню на різних малігнізованих клітинних лініях та тваринних моделях (57,58). Зниження рівня TKS5 може призводити до безуспішного формування комплексів, необхідних для формування інвадоподій та подосом, що в свою чергу може призводити до зниження міграції та інвазії клітин, а також інгібувати сигнальні каскади, пов'язані з EGFR (59).

1.3. Посттранскрипційна регуляція експресії в контексті канцерогенезу

Останніми роками одним із найбільш перспективних аспектів для досліджень механізмів реорганізації цитоскелета є вивчення шляхів пост-транскрипційної регуляції його компонентів під час патологічних станів, зокрема, при раку та запаленнях (60–68). Так, під час злоякісного переродження клітин клітинний цикл, морфогенез і здатність клітин до міграції та інвазії зазнають суттєвих змін, в тому числі через зміну рівнів експресії допоміжних факторів реорганізації цитоскелета (69). Було показано, що деякі РНК-зв'язувальні протеїни (РЗП), асоційовані з мікротрубочками, локалізуються в актин-збагачених мембранних виростах злоякісних клітин, де вони координують локальну трансляцію генів, асоційованих із утворенням

інвадоподій (70,71). Також відомо, що деякі транскрипційні фактори, фактори нуклеації та полімеризації актину, а також деякі Rho-ГТФази, що залучені до процесів інвазії та епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), значно дисрегульовані як під час первинної малігнізації, так і під час експансії злоякісно перероджених клітин (72). Крім того, в контексті малігнізації досліджують велику кількість протеїнів, що прямо не залучені до перелічених процесів, але є обов'язковими їх учасниками, як-от матричні металопротеїнази або інші протеїни, прямо залучені до ЕМП (73,74).

Генна експресія жорстко контролюється у всіх організмах, від *E. coli* до людини, як на рівні транскрипції, так і на пост-транскрипційному, трансляційному та пост-трансляційному рівнях (75–77). Один з етапів регуляції – на транскрипційному рівні – здійснюється за допомогою транскрипційних факторів, що впливають на експресію у відповідь на внутрішні або зовнішні стимули, і тонко регулюється усіх етапах синтезу і дозрівання мРНК (78–80). Так само відбувається регуляція експресії на рівні трансляції (81,82). Також відома регуляція на білковому рівні шляхом посттрансляційних модифікацій новосинтезованого поліпептидного ланцюга (наприклад, фосфорилювання/ дефосфорилювання, ацетилювання/деацетилювання, убіквітинілювання та ін.), що впливає на доступність функціональних білків в клітині (83,84).

У той час як регуляція синтезу РНК через РНК-полімерази, фактори транскрипції та модифікації гістонів є добре вивченою (85–87), механізми посттранскрипційної регуляції експресії, що включають в себе, в тому числі, регуляцію стабільності і доступності мРНК для синтезу, досі є недостатньо дослідженими. Одними з факторів, що впливають на стабільність, локалізацію та трансляцію мРНК є РЗП (88,89). Порушення експресії генів багатьох РЗП пов'язане із зростанням метастатичного потенціалу клітин (90–94). Посттранскрипційна регуляція може здійснюватися двома шляхами: модулюванням стабільності транскрипту (його стабілізація/дестабілізація або деградація), що здійснюються і мікроРНК, і РЗП, або перешкоджанням його

трансляції шляхом просторово-часової репресії трансляції, що залежить від РЗП (95,96). Вивчення механізмів просторово-часової регуляції трансляції вкрай необхідне для розуміння перебігу клітинних процесів, адже її порушення корелює з розвитком різноманітних патологічних станів, зокрема, із злоякісною трансформацією клітин (97).

РЗП виконують свою функцію через зв'язування з цільовою РНК і формування рибонуклеопротейдних комплексів (РНП) – динамічних структур, здатних до асоціації/дисоціації з багатьма різноманітними РЗП, регулюючи таким чином різні етапи метаболізму РНК. Відомо, що деякі РЗП, асоційовані з РНП, залишаються зв'язаними з цільовим транскриптом протягом всіх етапів процесингу РНК, починаючи від сплайсингу і аж до трансляції (наприклад, фактор сплайсингу SF2/ASF впливає на сплайсинг, експорт та ініціацію трансляції таргетної мРНК) (98,99).

Шляхи посттранскрипційної регуляції експресії із залученням РЗП. РЗП беруть участь у регуляції експресії за допомогою рекрутування ферментативної машинерії, що призводить до зміни стабільності або доступності мРНК за декількома механізмами (100–103):

1. Деградація мРНК, що залежить від деаденілювання.
2. Деградація мРНК, що не залежить від деаденілювання.
3. Контроль трансляції (циркуляризація мРНК, інгібування ініціації трансляції, тощо) (104).

Так, одним з перших описаних і добре вивчених прикладів РЗП-індукованого рекрутування деаденілази є деаденілювання і деградація мРНК, що містять ARE (AU-rich elements, АУ-збагачені ділянки). Це один з найбільш розповсюджених консервативних мотивів 3'-НТД мРНК ссавців (105). Вперше відкриті в мРНК цитокінів, ARE широко представлені в транскриптах факторів росту, протоонкогенів та регуляторів клітинного циклу (106). Розрізняють декілька класів ARE в залежності від наявності розділених (І клас) або суміжних (ІІ клас) повторів AUUUA. Також виділяють ІІІ клас, що характеризується хоча і відсутністю пентаметрів AUUUA, але високим АУ-

вмістом. Існує велика родина ARE-зв'язувальних протеїнів (ARE-Binding Proteins, ARE-BPs, АЗП), що індукує широкий діапазон можливих змін мРНК (107). Так, наприклад, один з найкраще вивчених АЗП ТТР (tristetraprolin, тристетрапролін) при зв'язуванні з цільовою мРНК рекрутує деаденілази, індукуючи деградацію мРНК (108,109). На противагу, показано, що білок HuR при зв'язуванні з ARE перешкоджає деградації цільового транскрипту і підвищує його стабільність (110).

1.4. Регуляція експресії за участі РНК-зв'язувальних протеїнів при онкологічних процесах

Пухлини представляють собою складне гетерогенне патофізіологічне явище, етіологію і патогенез якого достатньо складно визначити. Малігнізація завжди супроводжується мутаціями, які порушують гомеостаз та/або онкосупресивні сигнальні шляхи (111). РНК-зв'язувальні протеїни мають достатню структурну і функціональну різноманітність, необхідну для регуляції багатьох клітинних процесів, таких як, наприклад, сплайсинг мРНК, її модифікація, транспорт, локалізація, стабільність, деградація та трансляція (112). Деякі РЗП експресуються повсюдно і є еволюційно консервативними, підтримуючи базові клітинні функції, а порушення в їх експресії або функціонуванні можуть призводити до виникнення різноманітних патологічних станів, в тому числі до малігнізації (113). Цільовими транскриптами РЗП можуть бути не лише інтрони, екзони та 3'-нетрансльовані ділянки незрілих та зрілих мРНК, а і некодуючі РНК: microРНК, tРНК, siРНК, snРНК, а також snoРНК: такі РНК формують специфічні вторинні структури, що дозволяють їм зв'язуватися з РЗП і здійснювати регуляцію сплайсингу, модифікації РНК, регулювати локалізацію та секрецію протеїнів а також залучатися до ремоделювання хромосом (114).

Наприклад, експресія довгої некодуючої РНК (long non-coding RNA (lncRNA), днРНК) NEAT1 підвищується при колоректальному раку людини

асоційована з несприятливим прогнозом для пацієнтів. Вона взаємодіє з РЗП DDX5 і підвищує свою стабільність з подальшою активацією Wnt/ β -катенін сигнального шляху, що призводить до посилення канцерогенезу (115). Інший РЗП, TRBP, є молекулярним шапероном, необхідним для функціонування протеїну DICER – основного компоненту для біогенезу мікроРНК. Мутації TRBP призводять до значних змін в рівнях експресії мікроРНК, і, як наслідок, до проліферації та диференціації малігнізованих клітин (116).

РЗП HnRNPL є ще одним з представників мультифункціональних РЗП, що взаємодіють з днРНК в різноманітних типах раку. Він в основному має ядерну локалізацію, проте також може мати вплив на процеси, що відбуваються в цитоплазмі шляхом пост-транскрипційної регуляції експресії днРНК (117,118).

1.5. Характеристика TTP та його участь у різних процесах, пов'язаних з канцерогенезом

Родина РНК-зв'язувальних протеїнів тристетрапролінів представлена протеїнами ZFP36, що краще відомий як TTP, ZFP36L1 та ZFP36L2 (119). Крім того, ще один член цієї родини, ZFP36L3, характерний лише для гризунів та експресується в їх плаценті. Ортологи цих протеїнів зустрічаються у багатьох хребетних, за виключенням птахів (120). Тристетрапроліни відіграють ключову роль під час пост-транскрипційної регуляції експресії таргетних генів шляхом специфічного зв'язування з AU-збагаченими елементами їх мРНК: Ці протеїни вважаються ключовими регуляторами багатьох клітинних процесів, пов'язаних з малігнізацією, а їх експресія є дисрегульованою в багатьох типах раку, в тому числі у людини (рис. 1.2.). Ці РЗП часто мають пригнічуючий вплив на пухлини, а також асоційовані з прогнозом виживаності для пацієнтів, метастазуванням та резистентністю до хіміотерапії (119).

В здорових клітинах оптимальний рівень експресії мРНК генів, асоційованих з сигнальними каскадами виживання, підтримується через

жорсткі транскрипційні та пост-транскрипційні механізми. На противагу, в малігнізованих клітинах мРНК багатьох категорій генів, що сприяють виживанню, в тому числі протоонкогенів, супресорів пухлин та цитокінів, є аномально стабільними, що призводить до порушення нормального клітинного циклу та впливає на долю клітини в цілому. Велика кількість таких мРНК містять AU-збагачені елементи в своїх 3'-НТД і можуть регулюватися специфічними РНК-зв'язувальними протеїнами (7).

Тристетрапроліни характеризуються наявністю одного або більше СССН-доменів (цинкові пальці), що містить три залишки цистеїну та один залишок гістидину. Ці домени є високо консервативними і зв'язуються з цільовими транскриптами. Таке зв'язування є сиквенс- та структуро-специфічним і, зокрема, каталізує гідроліз полі-А послідовності мРНК, що призводить до її деградації (рис. 1.2).

Консенсусна послідовність AU-збагачених елементів має вигляд UUAUUUAUU, хоча на сьогодні описані також її варіації, що призводять до зв'язування з не меншою афінністю (121). Всі тристетрапроліни ссавців мають один і той самий механізм дії в біохімічних дослідженнях щодо зв'язування і деградації мРНК. Цікаво, що миші, нокаутні за різними з представників тристетрапролінів (в ембріональному періоді), мали різні фенотипи: нокаут ZFP36L1 був летальним ще під час ембріонального розвитку, а нокаут ZFP36L2 призводив до пост-натальної летальності в межах двох тижнів після народження внаслідок дефектів гемопоезу (121–124). Ці дані свідчать про те, що тристетрапроліни можуть мати різну специфічність щодо таргетних транскриптів та клітин або тканин, в яких вони експресуються. Більше того, тристетрапроліни можуть експресуватися у різні періоди пре- та пост-натального розвитку (125).

Хоча тристетрапроліни були відкриті більше 20 років тому, більшість досліджень, присвячених їх ролі у малігнізації, було представлено в останні 10 років. Тристетрапроліни демонструють антионкогенні властивості, що прямо пов'язані із їх здатністю призводити до деградації мРНК. Наприклад, мРНК

таких онкогенів, як NOTCH1, MYC, BCL-2, та COX-2 містять AU-збагачені елементи та являють собою безпосередні мішені TTP (125–128). При цьому, експресія самого TTP також прямо негативно регулюється деякими онкогенами (129). Також показано, що він може доповнювати дію онкосупресорів, наприклад, p53, шляхом супресії протоонкогенів, так як фактично експресія TTP індукується самим p53 в малігнізованих пухлинах (129). Цікаво, що в деяких рідкісних випадках тристетрапроліни можуть також знижувати рівень експресії генів-супресорів пухлин. Так, показано, що TTP негативно регулює експресію онкосупресора LATS2 (130).

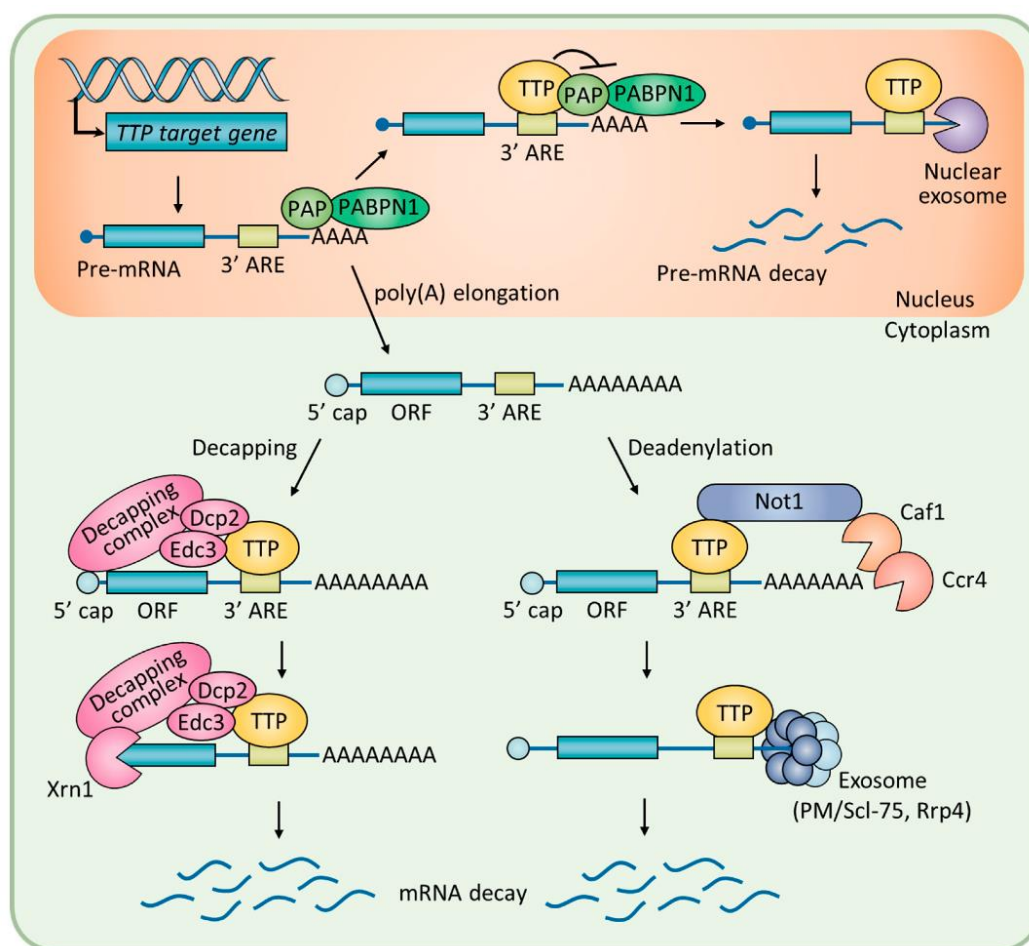


Рис. 1.2. Механізми TTP-опосередкованого гідролізу мРНК (адаптовано з J. Park, T. Lee та T. Kang, (9))

Порушення експресії або активності тристетрапролінів асоційоване з багатьма видами раку, крім того, деякі з них можуть характеризуватися повною втратою експресії тристетрапролінів (131). Вважається, що втрата або зниження їх експресії призводить до підвищення стабільності їх таргетних транскриптів, основна відома маса яких належить до протоонкогенів. На разі відомо про три різні механізми, що призводять до втрати активності або експресії ТТР (132–138):

- Мікро-РНК залежна регуляція
- Епігенетичний сайленсинг шляхом метилювання промотора
- Зміни активності протеїну внаслідок пост-трансляційних модифікацій, а саме – фосфорилування.

Незалежно від механізму, втрата функції ТТР може індукувати значні зміни в транскриптомі клітини і призводити до малігнізації (7).

ТТР негативно регулює експресію великої кількості онкогенів і теоретично є перспективним біомаркером, оскільки рівень його експресії значно варіює в багатьох видах раку і часто асоційований з клінічними характеристиками та прогнозами для пацієнтів (139). За даними репозиторію GEPHA, рівень його експресії знижений майже в усіх видах раку порівняно із нормальними тканинами (140,141). Більше того, він може модулювати взаємодії між злоякісними та імунними клітинами, що викликає великий інтерес в сучасних умовах (9,142). Наприклад, у пацієнтів з метастазуючим раком простати спостерігали нижчий рівень експресії ТТР порівняно з пацієнтами з локалізованими пухлинами (143), а у пацієнтів з радикальною простатектомією у виділених пухлинах з низьким рівнем експресії ТТР спостерігали більш короткий період ремісії (до біохімічного рецидиву) або виявлення метастазів порівняно з тими пацієнтами, в пухлинах яких спостерігали вищий рівень експресії ТТР (143,144).

Рівні експресії ТТР (як на рівні протеїну, так і на рівні мРНК) у пацієнтів з раком сечового міхура також були знижені, а пацієнти, у яких спостерігали високий рівень експресії таргетних транскриптів ТТР, включаючи регулятори

клітинного циклу, генів ЕМП і компонентів Wnt-сигналіngu, мали менш сприятливий прогноз та більш активну проліферацію пухлин порівняно з тими пацієнтами, що мали нижчий рівень експресії таргетних транскриптів ТТР. Цікаво, що авторами цього дослідження вперше було виявлено дволанцюгову РНК dsTTP-973, що може підвищувати рівень експресії ТТР та знижувати агресивність пухлини як *in vitro*, так і *in vivo* (145).

Множинні дослідження вивчають роль тристетрапроліну під час розвитку раку молочної залози (146–161), але не лише в контексті регуляції таргетних мРНК. Так, в одному із досліджень було виявлено, що рівень експресії ТТР має значущий вплив на активність естрогенового рецептора ER α в клітинах лінії MCF-7, пригнічуючи ефект SRC-1 на активацію ER α . При цьому взаємодія між ТТР та ER α в цих самих клітинах *in vivo* пригнічує трансактивацію ER α без змін в рівні експресії його власної мРНК, що вказує на те, що репресія трансактивації досягається саме шляхом протеїн-протеїнових взаємодій (156).

Показано, що рівень експресії ТТР значно знижений в гепатоцелюлярній карциномі та внутрішньопечінковій холангіокарциномі людини, і асоційований з дедиференціацією гепатоцитів та корелює з отриманням несприятливого прогнозу. Цікаво, що в тому ж дослідженні автори показали, що незважаючи на загальновідомий «класичний» антионкогенний вплив ТТР також виявляє канцерогенний ефект і сприяє формуванню первинних пухлин на ранніх стадіях *in vivo* на мишачій моделі. Ці результати дають основу для припущення про дуальний вплив тристетрапроліну в процесі малігнізації залежно від стадії формування пухлини і відкривають нове поле для досліджень (162).

ТТР і метастазування. З літературних джерел відомо, що метастазування являє собою основну причину смерті серед пацієнтів, хворих на рак (163–167). Активатор плазміногену uPA та його рецептор uPAR є одними з ключових факторів інвазії (146,168). Показано, що ТТР може інгібувати інвазивну здатність малігнізованих клітин через пряме зв'язування з 3'-НТД їх мРНК,

зменшуючи таким чином здатність клітин до експресії uPA та uPAR у достатній для ефективної інвазії кількості (4).

IL-13 залучений до регуляції проліферації, інвазії та метастазування малігнізованих клітин через активацію сигнального шляху PI3K/Akt/mTOR (169,170). TTP може інгібувати цей сигнальний каскад через пригнічення експресії IL-13. У клітинах раку шлунку підвищення рівня експресії TTP інгібувало проліферацію, інвазію і міграцію і негативно корелювало з рівнем експресії IL-33 (171–173). PIM2, кіназа, що широко розповсюджена серед малігнізованих клітин різних типів, фосфорилує велику кількість протеїнів, необхідних для канцерогенезу (174). При цьому великий інтерес представляють дані про те, що зв'язуючись з цинковими пальцями TTP PIM2 не тільки сприяє деградації TTP убіквітин-залежним шляхом протеасомної деградації, але і інгібує проліферацію та міграцію клітин раку молочної залози (147).

Показано, що швидкість утворення метастазів залежить від динамічної рівноваги між зв'язуванням протеїнами TTP та HuR їх таргетних мРНК: обидва мають одні і ті самі сайти зв'язування з багатьма протоонкогенними мРНК, при цьому, якщо TTP викликає деградацію цільових транскриптів, то HuR навпаки їх стабілізує і сприяє їх трансляції. (175). Порушення рівноваги цих антагоністів може призвести до підвищення рівнів експресії протоонкогенів і, як наслідок, до малігнізації (176). Збільшення експресії протеїнів HMGB1 (high mobility group box 1) часто асоційоване з раком шлунку (177), а HuR, що також надекспресований при цій патології, підвищує рівень експресії HMGB1 на рівні трансляції. Після цього TTP може знижувати здатність малігнізованих клітин до інвазії та міграції через пригнічення експресії HuR (178).

1.6. Загальні відомості про доксорубіцин та механізми його впливу на транскрипційний профіль клітин

Доксорубіцин — це хіміотерапевтичний препарат, що належить до антинеопластичних препаратів і широко використовується для лікування різних типів раку, таких як рак молочної залози, простати, матки, яєчників, жовчних шляхів, стравоходу, печінки та інших (179–185). Головний механізм його дії полягає в тому, що він інтеркалює ДНК та інгібує активність топоізомерази II, що призводить до розкручування подвійної спіралі, подальшого пригнічення синтезу ДНК, РНК та білків, а також до загибелі клітин, які швидко діляться (186). Він також є одним із найбільш поширених препаратів, що використовується при лікуванні РМЗ, і вважається одним із найважливіших для пацієнтів з тричі негативним РМЗ, що не піддається гормональній терапії (10,187).

Останнім часом доксорубіцин інтенсивно досліджують у контексті змін експресії генів, пов'язаних з його кардіотоксичністю та механізмами резистентності. Проте мало відомо про те, як доксорубіцин впливає на експресію генів, пов'язаних із цитоскелетом. Пошкодження ДНК, спричинене доксорубіцином, призводить до активації АТМ-кінази, яка має численні мішені, і змін в транскрипційному профілі клітин. Крім того, ефект доксорубіцину може суттєво варіювати залежно від статусу p53 і призводити до активації TNF α -індукованого NF- κ B (188). Наприклад, обробка p53-мутантних клітин MDA-MB-231 активувала NF- κ B-залежну транскрипцію генів, пов'язаних з інвазією, метастазуванням та резистентністю до хіміотерапевтичних агентів. Подібний ефект також спостерігався в інших клітинних лініях та первинних пухлинах РМЗ; а відновлення p53 дикого типу у цих клітинах пригнічувало індуковану доксорубіцином NF- κ B-залежну транскрипцію (189). Також є докази того, що доксорубіцин-індукований NF- κ B сприяє міграції та метастазуванню клітин РМЗ через індукцію CXCR4 (190). З іншого боку, є дослідження, яке показує, що, хоча доксорубіцин

індукує сигнальні шляхи NF- κ B і продукує активні комплекси NF- κ B, ці комплекси є дефектними за своєю здатністю до фосфорилування та ацетилювання, що призводить до пригнічення конститутивної та індукованої цитокінами NF- κ B-залежної транскрипції.(191)

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

В роботі використовували органічні та неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній «Fluka» (США), «Merck» (США), «Sigma Aldrich» (США), «BioRad» (США), «Amersham Pharmacia Biotech» (Великобританія), «Thermo Fisher Scientific» (США) або вітчизняні реактиви кваліфікації «хч» і «осч». Також використовували ферменти компанії «Thermo Fisher Scientific» (США): ендонуклеази рестрикції; інгібітор РНКаз RiboLock; ДНКазу I; зворотня транскриптаза RevertAid H Minus; РНКазу А та High Fidelity PCR Enzyme Mix. Суміш dNTP для проведення ПЛР було придбано у компанії «Thermo Fisher Scientific» (США). Для кількісної ПЛР в реальному часі було використано DreamTaq полімерази виробництва «Thermo Fisher Scientific» (США), або готову суміш реагентів LUNA Universal One-step RT-qPCR mix виробництва «New England Biolabs» (США).

Для виділення тотальної РНК з зразків пухлин молочної залози людини використовували реагенти innuSOLV[®] виробництва «Analytik Jena» (Німеччина), RNA Go виробництва «BioLabTech» (Україна) та набір реагентів RNeasy mini Plus kit виробництва «Qiagen» (Німеччина), а геномну ДНК виділяли за допомогою набору реагентів DNeasy Blood & Tissue Kit («Qiagen»). Використовували суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз Halt виробництва «Thermo Fisher Scientific» (США) або «Complete protease inhibitor» та «PhosSTOP», відповідно виробництва «Roche» (Швейцарія). Набір для виділення ДНК із гелю «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» було придбано у компанії «Thermo Fisher Scientific» (США). Середовище для культивування ліній клітин ссавців (DMEM), ембріональну сироватку

теляти (FBS) та поліетиленімін (PEI) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (США). Трансфекційний агент «Lipofectamine 3000» та позаклітинний матрикс Geltrex® було придбано в «Thermo Fisher Scientific» (США). Напівпроникні полікарбонатні мембрани з розміром пор 8 μm було придбано в «Corning», (США). Флуоресцентні барвники Phalloidin-iFluor 488, Phalloidin-iFluor 647 та середовище для монтування із вмістом DAPI «Aqueous Mounting Medium Fluoroshield» було придбано в компанії «Abcam» (Англія), а флуоресцентні барвники SiR-DNA (Spirochrome, 251SC007) та SPY555-actin було придбано в компанії «Spirochrome» (США). AlamarBlue (ресазурин) було придбано в «Thermo Fisher Scientific» (США). Середовище для монтування із вмістом DAPI було придбано в «Spirochrome» (США).

В роботі використовували первинні антитіла: моноклональні антитіла анти-TTP виробництва Cell Signalling (США) та анти- β -тубулін виробництва Sigma (США). Кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла проти імуноглобулінів миші та кроля було придбано в компанії «Jackson ImmunoResearch» (США).

У роботі було використано наступний біологічний матеріал: клінічні зразки пухлин раку молочної залози та тканини пухлинного оточення були отримані в Національному інституті раку. Всі суб'єкти надали свою інформовану добровільну згоду. Також використовували клітини людини ліній MCF-7 (неінвазивні клітини аденокарциноми молочної залози людини, що відповідають люмінальному А типу), MDA-MB-231 (інвазивні клітини раку молочної залози людини, що відповідають тричі-негативному типу) та бактеріальні клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) «Novagen» (США) і XL1-Blue^{tet} «Stratagen» (США).

2.2. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей

Всі нуклеотидні та амінокислотні послідовності були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації. Аналіз послідовностей нуклеїнових кислот, отриманих за допомогою секвенування проводили за допомогою програми Chromas 1.55 («Technelysium LTD»). Аналіз послідовностей нуклеїнових кислот, проводили за допомогою пакетів програм Vector NTI 10 та DNASTar (DNASTar Inc). Дизайн праймерів проводили за допомогою програми Oligo 7 («Molecular Biology Insights, Inc.»).

Перевірку 3'-НТД різних транскрипційних ізоформ одного гена на гомологічність проводили інструментів Needle та ClustalO Європейського інституту біоінформатики. Пошук потенційних сайтів зв'язування для РНК-зв'язувальних протеїнів в 3'-НТД основних транскрипційних варіантів цих генів було виконано за допомогою біоінформатичних онлайн-ресурсів RegRNA 2.0. та Scan For Motifs.

Для пошуку AU-збагачених ділянок в 3'НТД основних транскрипційних ізоформ *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* використовували онлайн-ресурс AREScore <http://arescore.dkfz.de/arescore.pl>. Для оцінки ймовірності зв'язування ТТР з основними транскрипційними ізоформами *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* використовували онлайн-ресурси RPISeq <http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/> та omiXcore <http://crg-webservice.s3.amazonaws.com/>. Для створення плазмідних конструкцій *in silico* використовували онлайн-ресурс Benchling <https://www.benchling.com/>.

Підбір праймерів та визначення їх специфічності проводили за допомогою бази даних NCBI Blast.

2.3. Виділення геномної ДНК

Геномну ДНК виділяли за допомогою набору реагентів DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagene) відповідно до рекомендацій виробника. Концентрацію,

чистоту та цілісність виділеної ДНК оцінювали спектрофотометрично при $\lambda=260$ нм і $\lambda=280$ нм та електрофоретично фарбуванням етидій бромідом.

2.4. Виділення тотальної РНК

Тотальну РНК із зразків пухлин молочної залози людини ізолювали з 0.2-1.5 г тканини гуанідин-ізотіоціонатним методом за допомогою реагенту innuSOLV (Analytik Jena) або RNA Go (BioLabTech) відповідно до рекомендацій виробника. Зразки заморожували в рідкому азоті одразу після резекції і зберігали за температури -80°C . Тотальну РНК із клітин ссавців виділяли за допомогою набору реагентів RNeasy mini Plus kit (Qiagen) відповідно до рекомендацій виробника. Клітини попередньо трипсинізували, двічі відмивали холодним фосфатно-сольовим буфером, після чого знову осаджували центрифугуванням. Після відмивок осад ділили на дві частини і переносили до мікроцентрифужних пробірок. Одну з частин використовували для виділення тотальної РНК. Концентрацію, чистоту та цілісність виділеної РНК оцінювали спектрофотометрично при $\lambda=260$ нм і $\lambda=280$ нм та електрофоретично фарбуванням етидій бромідом.

2.5. Електрофорез нуклеїнових кислот в агарозному гелі

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот проводили в 1,5% агарозному гелі за напруги 5-10 В/см, використовуючи 1xTAE буфер (40мМ трис-ацетат, рН 8,3 та 1мМ EDTA), етидій бромід в якості барвника для візуалізації нуклеїнових кислот та гліцериновий буферний розчин для нанесення зразків. Гель аналізували під ультрафіолетовим опроміненням за допомогою приладу ChemiDoc XRS+ («BioRad» США).

2.6. Видалення геномної ДНК із препаратів тотальної РНК за допомогою ДНКазі I

Для остаточного видалення геномної ДНК, препарати тотальної РНК обробляли ДНКазою I («Fermentas»). 15 мкл реакційної суміші, яка містила 1-5 мкг тотальної РНК, 1,5 мкл 10х буфера, 0,5 мкл інгібітора РНКазі RiboLock (40 од./мкл) та 3 мкл ДНКазі I (1 од./мкл) інкубували протягом 60 хв при +37°C. Потім проводили інактивацію ДНКазі I – додавали 1,5 мкл 50мМ ЕДТА та інкубували при +65°C протягом 10 хв. Отриманий препарат РНК відразу використовували для синтезу кДНК.

2.7. Синтез кДНК з тотальної РНК

Для отримання кДНК використовували метод зворотної транскрипції на препаратах тотальної РНК із пухлин молочної залози людини. Для цього в реакційну суміш, загальним об'ємом 20 мкл, вносили 1-5 мкг тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою I, праймер (Oligo dT₁₅) в кількості 100 мкМ, 4 мкл 5х буфера, 2 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл інгібітора РНКазі RiboLock (40 од./мкл) та 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (50 од./мкл). Для денатурації РНК та приєднання до мРНК праймера Oligo dT₁₅ проводили інкубацію препарату РНК з Oligo dT₁₅ окремо від інших компонентів суміші при +65°C протягом 10 хв. Потім додавали решту компонентів суміші та проводили синтез при +42°C протягом 1-2 годин. Інактивацію ферментів проводили при +65°C протягом 10 хв. Отриману кДНК розводили в два рази додаванням 20 мкл H₂O та зберігали при –20°C.

2.8. Реакції рестрикції та лігування

Реакції рестрикції проводили ендонуклеазами рестрикції («Thermo Scientific», США) згідно рекомендацій виробника. Реакцію лігування

здійснювали при 22°C протягом 2 год за допомогою ДНК-лігази фага T4 в концентрації 1 од. Вейса на 10 мкл реакційної суміші («Thermo Scientific», США).

2.9. Аналіз експресії методом кількісної ПЛР в реальному часі

Кількісну ПЛР (кПЛР) на зразках, отриманих з пухлин молочної залози людини, виконували з використанням праймерів та флуоресцентно мічених Taq-Man-зондів. кПЛР проводили в 25 мкл суміші, яка містила 0,2 мкМ кожного специфічного праймера, 0,1 мкМ Taq-Man зонду, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 2,5 од. DreamTaq ДНК-полімерази («Fermentas») та відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – +95⁰С, 20 сек (в першому циклі – 2 хв); температура реасоціації праймерів – +60⁰С, час реасоціації праймерів та синтезу об'єднували – 1 хв, протягом 50 циклів.

ПЛР проводили в термоциклері CFX96 («Bio Rad»). ПЛР на зразках, отриманих з клітинних ліній, проводили за допомогою набору реагентів LUNA Universal One-step RT-qPCR mix виробництва «New England Biolabs» (США). Для цього однакову кількість (20 нг) тотальної РНК, попередньо обробленої ДНКазою I вносили у підготовлену реакційну суміш та інкубували в термоциклері відповідно до рекомендацій виробника.

Праймери та зонди, які використовували для кПЛР, а також їх ефективності наведено в таблиці 2.1. Для всіх зразків проводили аналіз кривих плавлення.

У випадку ЗТ-кПЛР мРНК із зразків пухлин в якості референсного гена використовували *TBP* (192), у випадку використання мРНК, виділеної із клітинних ліній – *GAPDH* (193).

Таблиця 2.1

Праймери та зонди, використані для кПЛР

Праймери	Послідовність (5'-3')	Ефективність
For-TBP Probe Rev-TBP	GTGCCCCGAAACGCCGAATATA (BHQ1)ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGGT(FAM) CCGTGGTTCGTGGCTCTCTTA	94.4%
For-ZFP36 Probe Rev-ZFP36	CATGGATCTGACTGCCATCTAC (FAM)AGCCCTGACGTGCCCCGTGCC(BHQ1) CTGGAGTCGGAGGGGCTCA	98.6%
For-2ZFP36 Rev-2ZFP36	TCTTCGAGGCGGTTTTT TGCGATTGAAGATGGGGAGTC	93.5%
For-SH3PXD2A Rev-SH3PXD2A	CGAACCTACGGACAAGACCTC CGTGGCTTTGGCAGTTGGAA	93.78%
For-SH3PXD2B Rev-SH3PXD2B	GGCTGTCAAACGCCTGATAC GGTTTGGTCACCCCCAGATTT	100.82%
For-WIPF1 Rev-WIPF1	ACGGCCAACAGGGATAATGAT GGTTTCGCAGATGTGGATCTT	102.13%
For-WASL Rev-WASL	GAACGAGTCCCTCTTCACTTT TTCCGATCTGCTGCATATAACT	105.8%
For-CTTN Rev-CTTN	GCTTTGAGTATCAAGGCAAAACG CCAACGGCACATTTGTCTTGT	90.13%
For-GAPDH Rev- GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	101.3%

2.10. Обчислення результатів ПЛР в реальному часі

Обчислення результатів ПЛР виконували за методом Пфаффеля (194) та використовували формулу:

$$Exp = (E_{GOI})^{\Delta Ct(GOI)} / (E_{HKG})^{\Delta Ct(HKG)}$$

де E_{GOI} – ефективність ПЛР досліджуваного гена, E_{HKG} – ефективність ПЛР референсного гена, $\Delta Ct^{(GOI)}$ – ΔCt досліджуваного гена, $\Delta Ct^{(HKG)}$ – ΔCt референсного гена. Ефективність ПЛР визначали за допомогою методу серійних розведень. Для цього готували серію 10-кратних розведень (1:1-1:10000) кДНК, отримували значення Ct для кожного з них та будували калібрувальну криву. Всі вимірювання проводили в двох технічних повторях. На вісі абсцис відкладали логарифм ступеню розведення, на вісі ординат – середнє значення Ct . Після цього обраховували нахил кривої. Далі обчислювали ефективність ПЛР за формулою

$$E = (10^{\frac{1}{S}} - 1) * 100$$

де E – ефективність ПЛР, S – нахил кривої. Отримані значення ефективності підставляли у формулу обчислення результатів ПЛР в реальному часі. Значення циклів досліджуваного та референсного генів визначали за точкою перетину кривими їх ампліфікації порогового рівню флуоресценції (threshold), вище якого значення флуоресценції вважаються статистично значущими. Пороговий рівень встановлювали для всіх експериментів однаковим, на рівні 100 RFU.

2.11. Приготування компетентних клітин *E. coli*

Для отримання компетентних клітин *E. coli* штамів XL1-Blue^{tet}, BL21(DE3) та TOP10 використовували наступному методику. Отримували 5

мл нічної культури на середовищі LB (на 1 л: бакто-триптон – 10 г, бакто-дріжджовий екстракт – 5 г, NaCl – 10 г, pH 7,2-7,4). Інокулювали 0,5 мл нічної культури у 100 мл свіжого середовища LB в 500 мл колбі та інкубували при 195 об/хв і +37°C до $OD_{540} = 0,3$ (5×10^7 клітин/мл). Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі Ultrospec 1000 фірми “Amersham Pharmacia Biotech” при довжині хвилі 540 нм. Культуру охолоджували протягом 5-7 хв на льоду та осаджували за допомогою центрифуги “Joan” при 3000 об/хв, 7 хв при +4°C. Після видалення надосадової рідини осад клітин обережно ресуспендували в 0,5 мл охолодженого середовища А. Додавали 2 мл 2×TSS (LB, ПЕГ–20%, $MgSO_4$ – 50 мМ) та 1 мл 80% гліцерину. Отриману суспензію клітин розливали по 200 мкл в мікропробірки та зберігали при –70 °C. Після заморожування кількість компетентних клітин в аліквоті оцінювали за стандартною методикою. Отримані клітини використовували для трансформації препаратами плазмідної ДНК або лігазною сумішшю.

2.12. Культивування клітин ліній MDA-MB-231, MCF7 та лінії MDA-MB-231 з ектопічною експресією TTP

Клітини ліній MCF7, MDA-MB-231 та MDA-MB-231 з ектопічною експресією TTP культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), яке містило 10% ембріональну сироватку теляти (FBS), 4.6 г/л глюкози, 10 мкг/мл пеніциліну та 0.25 мкг/мл стрептоміцину, при +37°C та вмісті 5% CO₂. При досягненні клітинами 70-80% стану конфлюентності їх пересівали у нові культуральні чашки. Пасирування клітин проводили за допомогою 0.05% трипсину з 0.053 мМ ЕДТА протягом 3-10 хв та переносили у нове середовище відповідно до рекомендацій банку клітинних ліній ATCC.

2.13. Трансфекція клітин лінії MDA-MB-231 плазмідною ДНК

Трансфекцію еукаріотичних клітин проводили за допомогою поліетиленіміну (PEI) або Lipofectamin[®] 3000 виробництва «Sigma» та «Thermo Fisher Scientific» відповідно. Плазмідну ДНК та PEI розчиняли окремо в 150 мМ NaCl, інкубували 5 хв, змішували рівні об'єми та інкубували протягом 15 хв. При використанні Lipofectamin[®] 3000 плазмідну ДНК та реагент для трансфекції розчиняли в середовищі Opti-MEM («Life Technologies», США), інкубували 5 хв, змішували та після інкубації протягом 15 хв додавали до клітин в середовищі DMEM. Після цього клітини інкубували протягом 24-36 годин та використовували відповідно до мети експерименту.

2.14. Створення лінії MDA-MB-231 із стабільною надекспресією ТТР

До безпосередньо створення лінії із стабільною експресією ТТР попередньо визначали чутливість клітин лінії MDA-MB-231 до зеоцину (селективного антибіотику). Для цього клітини висівали на 6-лункові планшети у кількості 700000 на лунку, що відповідає приблизно 70% конфлюентності після прикріплення, давали прикріпитися протягом ночі, після чого додавали поживне середовище із 50, 100, 200, 500, 800 і 1000 мкг/мл та інкубували протягом 3 тижнів. Середовище із селективним антибіотиком змінювали кожні 2 дні. По 3 тижнях інкубації було визначено оптимальну для селекції концентрацію 200 мкг/мл. Далі інтактні клітини трансфекували плазмідною конструкцією pcDNA4-TO-TTR, попередньо отриманою в нашій лабораторії С. Кропивком, за допомогою реагенту Lipofectamine 3000 відповідно до рекомендацій виробника, інкубували протягом 24 годин, після чого замінювали поживне середовище на таке, що містило 200 мкг/мл зеоцину. Клітини культивували протягом 3 тижнів в середовищі із селективним антибіотиком, яке замінювали кожні 2 дні. По завершенню селекції клітини

трипсинізували, відмивали PBS, осаджували протягом 3 хв при 400g та ресуспендували осад в 1 мл середовища. Після цього підраховували кількість клітин та висівали їх в 96-лунковий планшет із розрахунку 1 клітина на лунку. Фактичну кількість клітин, що опинялися в лунці планшету, оцінювали під мікроскопом; лунки, в яких не було клітин, або було більше однієї клітини, мітили та не використовували у подальших маніпуляціях. Частина клітин, що залишилися, заморожували для збереження поліклональної популяції, а іншу частину висівали в 100 мм чашку Петрі і культивували протягом селекції. Одиначні клітини на 96-лунковому планшеті культивували до досягнення ними 50% конфлюентності. Після цього їх переносили до 24-лункових, 12-лункових та 6-лункових планшетів до досягнення ними маси, достатньої для вестерн-блот аналізу та подальшого заморожування та культивації. Далі отримані моноклональні лінії перевіряли на надекспресію TTP за допомогою вестерн-блот аналізу, а відносну зміну копійності внесеного гену визначали за допомогою кількісної ПЛР.

2.15. Визначення відносної зміни копійності гену *ZFP36* в клітинах із стабільною експресією TTP

Відносну зміну копійності *ZFP36* у клітинах лінії MDA-MB-231 з його ектопічною експресією відносно клітин дикого типу визначали за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі. Для цього виділяли геномну ДНК з клітин дикого типу та клітин із ектопічною експресією *ZFP36*, після чого проводили кПЛР в 25 мкл суміші, яка містила 10 мкМ кожного специфічного праймера, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, 2,5 од. DreamTaq ДНК-полімерази («Fermentas») та відповідний буфер. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – +95⁰С, 20 сек (в першому циклі – 2 хв); температура реасоціації праймерів – +60⁰С, час реасоціації праймерів та синтезу об'єднували – 1 хв, протягом 50 циклів. ПЛР проводили в термоциклері CFX96 («Bio Rad»). Послідовність праймерів наведено в таблиці 2.1 (For-2ZFP36, Rev-2ZFP36). Відносну зміну

копійності визначали як нормалізоване відношення відносного рівня експресії в клітинах з ектопічною експресією *ZFP36* до відносного рівня експресії *ZFP36* в клітинах дикого типу.

2.16. Обробка клітин доксорубіцином

Клітини ліній MCF7 та MDA-MB-231 між пасажами 2 та 5 розсівали на чашки Петрі діаметром 100 мм в кількості 6000000 на кожную чашку. Через 24 години після цього додавали DXR в концентраціях 0,1, 0,5 і 1,0 μM та інкубували протягом 48 год. Після цього клітини трипсинізували, двічі відмивали холодним PBS, та ділили вміст на 2 мікроцентрифужні пробірки. Вміст однієї мікроцентрифужної пробірки використовували для виділення тотальної РНК, а вміст іншої – для приготування білкових лізатів. Після трипсинізації всі маніпуляції виконували на льоду та в центрифугу з охолодженням. Якщо вміст мікроцентрифужних пробірок не використовували одразу, то їх заморозували та зберігали за температури -80°C .

2.17. Визначення життєздатності клітин за допомогою тесту з ресазурином із спектрофотометричною детекцією

Для визначення життєздатності (метаболічної активності) клітин використовували тест з ресазурином із спектрофотометричною детекцією. Для цього клітини висівали в 96-лункові планшети у кількості 10000 клітин на лунку, давали прикріпитися за ніч, після чого відбирали поживне середовище і додавали таке, що містило 10% ресазурину. Після цього клітини інкубували протягом 4 годин, далі вимірювали абсорбцію за довжини хвилі $\lambda=570$ нм та $\lambda=600$ нм за допомогою спектрофотометру BioTek Synergy HTX Multimode Reader («Agilent», США), відбирали середовище, двічі промивали PBS та додавали чисте поживне середовище. Далі клітини культивували 48 годин, після чого відбирали поживне середовище і додавали таке, що містило 10%

ресазурину, інкубували протягом 4 годин, і далі вимірювали абсорбцію за довжини хвилі $\lambda=570$ нм та $\lambda=600$ нм. Значення абсорбції першого вимірювання використовували як контроль. Для визначення цитотоксичності DXR також використовували тест з ресазурином. Для цього клітини висівали в 96-лункові планшети у кількості 10000 клітин на лунку, давали прикріпитися за ніч, після чого відбирали поживне середовище і додавали таке, що містило 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 2,0 μM , 3,5 μM або 5,0 μM DXR, або не містило його. Далі клітини інкубували 48 або 72 години, після чого відбирали поживне середовище і додавали таке, що містило 10% ресазурину, інкубували протягом 4 годин, і далі вимірювали абсорбцію за довжини хвилі $\lambda=570$ нм та $\lambda=600$ нм. Як контроль використовували значення абсорбції з лунок, в яких було середовище без DXR. Метаболічну активність клітин, що визначається як % відновленого ресазурину, обчислювали за формулою, наданою виробником:

$$\frac{(O2A1) - (O1A2)}{(O2P1) - (O1P2)}$$

де O1 – коефіцієнт молярної екстинції окисленого ресазурину при $\lambda=570$ нм; O2 – коефіцієнт молярної екстинції окисленого ресазурину при $\lambda=600$ нм; A1 – абсорбція при $\lambda=570$ нм; A2 – абсорбція при $\lambda=600$ нм; P1 – абсорбція в контрольних лунках при $\lambda=570$ нм; P2 P1 – абсорбція в контрольних лунках при $\lambda=600$ нм. У випадку визначення цитотоксичності значення IC_{50} та IC_{90} обраховували за допомогою відповідних пакетів у програмі «GraphPad Prism 9.5».

2.18. Конфокальна мікроскопія фіксованих препаратів клітин

Для аналізу морфології та цитоскелету клітини висівали в кількості 22,000/см² на скельця для інкубації Nunc Lab-Tek II Chamber Slide™ і давали прикріпитися за ніч. Після цього їх фіксували 3.8% ПФА в PBS,

пермеабілізували 0,1% Твін в 1% БСА та фарбували флуоресцентно-міченим фалоїдином Phalloidin-iFluor 488 (Abcam) відповідно до рекомендацій виробника. Далі скельця монтували за допомогою монтувального середовища з DAPI. Зображення клітин отримували за допомогою конфокального мікроскопу Leica STELLARIS 8. Первинний аналіз зображень (визначення меж клітин – сегментацію, накладання маски) виконували за допомогою програмного забезпечення CellPose3 (195), після чого за допомогою ImageJ визначали значення площі клітин, їх циркулярності та витягнутості. Для аналізу кількості, ширини та довжини актинових філаментів використовували програмне забезпечення FilamentSensor 2.0 (196): зображення завантажували до інтерфейсу FilamentSensor 2.0, після чого запускали автоматизований аналіз із налаштуваннями по замовчуванню та отримували зображення клітин із накладеною маскою філаментів, а також числові значення ширини, довжини і кількості філаментів на зображення, які потім підлягали статистичному аналізу.

Для аналізу морфології клітин після обробки DXR клітини висівали в кількості 44,000/см² на скельця для інкубації Nunc Lab-Tek II Chamber Slide™ і давали прикріпитися за ніч. Після цього поживне середовище замінювали на таке, що містило 0.1, 0.5 та 1.0 μM DXR та інкубували протягом 48 год. Після цього їх фіксували 3.8% ПФА в PBS, пермеабілізували 0,1% Твін в 1% БСА та фарбували флуоресцентно-міченим фалоїдином stained by Phalloidin-iFluor 647 (Abcam) відповідно до рекомендацій виробника, після чого скельця монтували за допомогою монтувального середовища з DAPI. Зображення отримували та аналізували так само, як вище описано для клітин MDA-MB-231 дикого типу та MDA-MB-231 з ектопічною експресією TTP.

2.19. Конфокальна мікроскопія препаратів живих клітин

Для аналізу рухливості клітини висівали в кількості 22,000/см² на боросилікатні скельця для інкубації Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass і

давали прикріпитися за ніч. Після цього середовище замінювали на середовище, що містило $0,5 \mu\text{M}$ SiR-DNA та $1:1000$ SPY555-actin та поміщали в камеру, що підтримувала параметри 36°C та $5\% \text{CO}_2$ конфокального мікроскопу Leica TCS SP5. Зображення фіксували кожні 15 хв протягом 24 год. Для аналізу було використано принаймні 500 клітин з кожного повтору. Аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення ImageJ з інстальованим плагіном TrackMate, використовуючи функціонали StarDist та LAP tracker (197–199), а саме: отримані за допомогою конфокального мікроскопу зображення завантажували до ImageJ, після чого детектували ядра за допомогою алгоритму StarDist. Після цього ідентифіковані ядра відстежували за допомогою функції LAP tracker та отримували числові значення переміщення, швидкості та направленості рухів клітин, які далі підлягали статистичному аналізу. Клітини, що були відстежені протягом менше ніж $2/3$ часу, виключали з аналізу.

Для аналізу рухливості клітин після обробки DXR їх висівали в кількості $44,000/\text{cm}^2$ на боросилікатні скельця для інкубації Nunc Lab-Tek II Chambered Coverglass і давали прикріпитися за ніч. Після цього середовище замінювали на середовище, що містило $0,5 \mu\text{M}$ SiR-DNA та 0.1 , 0.5 або $1.0 \mu\text{M}$ DXR, та поміщали в камеру, що підтримувала параметри 36°C та $5\% \text{CO}_2$ конфокального мікроскопу Leica TCS SP5. Зображення фіксували кожні 15 хв протягом 48 год. Аналіз проводили так само, як описано раніше в даному підрозділі..

2.20. Визначення здатності клітин до інвазії

Для визначення здатності клітин до інвазії використовували метод Бойдена (200). Для цього клітини лінії MDA-MB-231 з ектопічною експресією TTP та дикого типу нарощували до досягнення ними приблизно 70% конфлюентності та витримували в середовищі без ембріональної сироватки теляти протягом 24 годин. Після цього клітини трипсинізували, відмивали

PBS, осаджували при 400g протягом 3 хвилин, відбирали надосад і ресуспендували в 1 мл середовища без ембріональної сироватки теляти. Далі клітини підраховували та висівали в попередньо покриті позаклітинним матриксом Geltrex мембрани транс-лункових напівпроникних вставок в кількості 100000 на вставку (24-лунковий формат). Після цього в верхню камеру додавали 200 мкл середовища без сироватки, а в нижню – 600 мкл середовища з 10% ембріональної сироватки теляти в якості хемоатрактанта. Клітини інкубували 20 годин, після чого транс-лункові вставки двічі обережно відмивали PBS, фіксували в 3,8% параформальдегіді (ПФА) протягом 15 хвилин, потім знову двічі відмивали PBS та фарбували розчином 0,2% генціанвіолету в 20% метанолі. Після цього клітини, що залишилися на внутрішній стороні мембрани, обережно видаляли за допомогою ватної палички, а інвазивні клітини на зовнішній стороні мембрани візуалізували за допомогою мікроскопу Axio Zoom (Zeiss). Аналіз зображень виконували за допомогою програми ImageJ, інвазію визначали як % захопленої площі. Після цього результати, отримані для кожної групи, нормалізували на контроль без хемоатрактанту (% захопленої площі дослід/% захопленої площі контроль) і отримували значення відносної інвазії, які потім обраховували методами статистичного аналізу.

2.21. Трансформація клітин *E.coli* плазмідною ДНК

Аліквоту компетентних клітин *E. coli* розморожували при +4°C, після чого додавали плазмідну ДНК або лігазну суміш, об'єм яких не перевищував 5% від загального об'єму аліквоти. Клітини витримували у крижаній бані 15-30 хв, після чого проводили «тепловий шок» на водяній бані при +42°C протягом 2 хв з наступним охолодженням. Далі додавали 1 мл середовища LB і вирощували годину за температури +37°C. Клітини висівали на чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB, 1,5% бактоагара) у присутності селективного антибіотика.

2.22. Виділення плазмідної ДНК

Плазмідну ДНК з малих об'ємів бактеріальної культури (1,5-3 мл середовища LB) виділяли методом лужного лізису. Для цього у 3 мл середовища LB, яке містило селективні антибіотики (залежно від конструкції), інокулювали одиничну колонію *E. coli* відповідного штаму, трансформованих плазмідною ДНК, та інкубували при постійному перемішуванні за температури +37 °C протягом 12 – 20 год. Після культивування весь об'єм центрифугували протягом 5 хв при 14100 g, після чого супернатант зливали. До осаду додавали 200 мкл розчину 1 (PI), що містив РНКазу А в концентрації 100 мкг/мл, осад ресуспендували до утворення гомогенату. Додавали 200 мкл розчину 2 (PII), зразки повільно та обережно перемішували 3-5 разів, але не залишали у даному розчині більше 5 хв. Після цього до розчину додавали 200 мкл розчину 3 (PIII, 3М ацетат калію), інтенсивно перемішували і залишали за –20°C впродовж 15 – 30 хв. Після охолодження зразки центрифугували 10 хв при 14100 g, супернатант зливали у нові мікроцентрифужні пробірки. До супернатанту додавали 0,7 об'єму (420 мкл) ізопропілового спирту, залишали на 15 хв за температури –20°C, після чого зразки центрифугували протягом 15 хв при 14100 g, супернатант зливали. Далі додавали 400 мкл 70%-го етилового спирту, центрифугували 5 хв за 14100 g, супернатант зливали; промивання 70% етанолом повторювали двічі. Для видалення залишків етанолу зразки центрифугували протягом 30 с, 14100 g, спирт обережно відбирали наконечником, а зразки залишали сушитися в термостаті за температури +56°C протягом 2-5 хв до повного випаровування залишків спирту. Отриману ДНК розчиняли у необхідному об'ємі (20 – 40 мкл) дистильованої води. Концентрацію отриманого розчину ДНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Life Technologies», США).

2.23. Приготування лізатів клітин MCF7 та MDA-MB-231 для виділення тотального протеїну

Клітини осаджували центрифугуванням протягом 3 хв при 1000 об/хв, після осадження клітини ресуспендували в лізуючому буфері RIPA, що містив коктейль інгібіторів протеаз та фосфатаз Halt, обидва виробництва «Thermo Fisher Scientific» (США). Осади інкубували при +4°C протягом 30 хв, після чого збирали екстракт шляхом центрифугування при 15000g протягом 15 хв. Лізати зберігали при температурі -80°C.

2.24. Визначення концентрації протеїну в лізатах клітин MCF7 та MDA-MB-231

Для визначення концентрації протеїну в лізатах використовували набір реагентів Pierce™ BCA Protein Assay kit виробництва «Thermo Fisher Scientific» відповідно до рекомендацій виробника, використовуючи протеїнові стандарти. Інтенсивність сигналу вимірювали за допомогою спектрофотометру BioTek Synergy HTX Multimode Reader («Agilent», США). Після цього будували калібрувальну криву, за допомогою якої визначали концентрацію протеїну в зразках.

2.25. Електрофорез протеїнів в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Електрофоретичне розділення протеїнів у денатуруючих умовах проводили у камерах для вертикального електрофорезу за стандартною методикою. В кожен лунку наносили однакову кількість протеїну (6-10 мкг). Для протеїнового електрофорезу використовували 4% концентруючий та розділюючий гелі концентрацією 7,5-15% або готові градієнтні гелі NuPAGE Bis-Tris 4–12% виробництва «Invitrogen» (США). У

випадку самостійного приготування для приготування розділяючого гелю змішували 30% розчин акриламід (при співвідношенні акриламід і біс-акриламід – 29:1), dH₂O, 1,5 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 10% розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 мМ та 0,1% персульфат амонію. Полімеризація акриламід ініціювали додаванням 0,1% TEMED. Електрофорез проводили в трис-гліциновому буфері (195 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 0,1% ДСН) при фіксованій силі струму 20-30 мА у випадку самостійно приготованого гелю, або в MES-буфері виробництва «Thermo Fisher Scientific» (США).

2.26. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення протеїнів в ПААГ протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану в буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 год у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Великобританія) у випадку самостійно приготованого геля, або у буфері TransBlot transfer buffer виробництва «BioRad», США в напівсухій системі переносу TransBlot. Після переносу мембрану фарбували понсо С, документували сигнал за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США), блокували протягом 1 год у розчині 5% знежиреного молока в TBST (20 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100), або 5% БСА (бичачий сироватковий альбумін), щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом від 1 до 16 год в залежності від антитіла та відмивали від первинних антитіл TBS-T три рази по 5 хв. Після промивки мембрану інкубували протягом години в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою TBS-T.

Для хемілюмінісцентної детекції (ECL) змішували рівні об'єми розчину А (100 мМ Tris-HCl, pH8.5, 2,5 мМ люмінал, 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (100 мМ Tris-HCl, pH8,5, 0.023% H_2O_2) та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемілюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США). Інтенсивність сигналів обраховували, використовуючи програмне забезпечення ImageLab.

2.27. Статистичний аналіз даних

Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення, OriginPro 19.1 («OriginLab Corporation», США) або «GraphPad Prism 9.5» («GraphPad Software», США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за W-критерієм Шапіро-Уїлка та критерієм Колмогорова-Смірнова. Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою t-критерію Стюдента. Для порівняння трьох і більше нормально розподілених вибірок аналіз проводили за допомогою ANOVA. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. Для порівняння трьох і більше ненормально розподілених вибірок використовували ANOVA з критерієм Краскела-Уоліса. В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при $p < 0.05$. Спосіб представлення даних наведено окремо під кожною гістограмою. На всіх гістограмах * відповідає $p < 0.05$, ** відповідає $p < 0.01$, *** відповідає $p < 0.001$, а **** відповідає $p < 0.0001$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вивчення можливості впливу TTP на експресію *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*

Як було зазначено в огляді літератури, реорганізація актинового цитоскелету як загалом, так і під час міграції та інвазії – тонко регульований процес, який порушується під час злоякісної трансформації клітин (66,67,201). На разі даних про можливі механізми регуляції цього процесу на пост-транскрипційному рівні недостатньо, і в цьому розділі дисертації нами виконано пошук таких потенційних механізмів у контексті РНК-зв'язувальних протеїнів.

3.1.1. Біоінформатичний пошук регуляторних елементів в мРНК генів, залучених до реорганізації цитоскелету. У рамках роботи нами було проаналізовано загалом 49 транскрипційних варіантів генів, що кодують фактори нуклеації, елонгації та реорганізації актинових філаментів, а також деяких скафолдних протеїнів, залучених до цих процесів. Результати дослідження показано в табл. 3.1.

Для аналізу нами було обрано гени, що належать до родин *Arp*, *Arpc*, *WASP*, *Rho*, а також форміни, кофіліни та деякі інші (повний склад цільової групи наведено у табл. 3.1.) Як видно з таблиці, їх 3'-НТД сильно відрізняються за розміром – від 200 нуклеотидів у третьої транскрипційної ізоформи TRIP10 (thyroid hormone receptor interactor 10; білок 10, що взаємодіє з рецептором тиреоїдного гормону) до 11561 в довгої ізоформи інтерсектину 1, що певною мірою впливає на наявність та кількість регуляторних елементів

окремих мРНК. Всього було ідентифіковано 11 типів потенційних регуляторних елементів.

В ході аналізу було виявлено, що 30 з 49 проаналізованих 3'-НТД мають спільний регуляторний елемент – сайти зв'язування з білками родини Musashi (MBE, 40/49 за даними Scan For Motifs, 33/49 за даними RegRNA 2.0. та 30/49 за двома ресурсами одночасно). *Musashi* – група РЗП, що включає білки MSI1 та MSI2. На разі більш вивченим є MSI1(202). Встановлено, що він відіграє велику роль в процесах, які дозволяють стовбуровим і прогеніторним клітинам дорослих зберігати мультипотентний статус, а також часто надекспресований в багатьох видах раку і вважається одним із протоонкогенів, оскільки пригнічує експресію генів-інгібіторів клітинного циклу (203). Механізм дії цих протеїнів полягає у конкуренції з eIF4G за зв'язування з PABP, що призводить до інгібування ініціації трансляції цільового транскрипту (204). Хоча даний регуляторний елемент пов'язаний із канцерогенезом, наше дослідження було спрямоване на пошук елементів, які б пригнічували малігнізацію, а отже MBE було виключено із подальшого аналізу.

Наступним найбільш поширеним елементом виявився K-box (18 з 49 транскриптів), що являє собою консервативну послідовність cUGUGAUa. В транскриптів, нокаутованих за цими елементами, спостерігали відхилення в розвитку периферійної нервової системи. При подальших дослідженнях було виявлено, що ці послідовності комплементарні 5'-НТД багатьох мікроРНК дрозофіли, що приймають участь у регуляції Notch-сигналіngu і, таким чином, залучені в перебіг багатьох нейрофізіологічних процесів(205). Зважаючи на це, K-box може виступати перспективним для подальшого вивчення в області нейробиології, що, однак, не є фокусом наших досліджень.

Таблиця 3.1. Потенційні регуляторні елементи 3'-НТД основних транскрипційних ізоформ деяких генів, залучених в реорганізацію актинових філаментів

1	Ген* ¹	Arp2	Arp3	Arpc3	Arpc2	Arpc4	Arpc1B	WASP	WASL	WASF1	WASF2 (1)*	WASF2 (2)*	WASF3
2	Довжина 3'-НТД, нуклеотидів	2530	4106	442	442	907	312	278	2592	713	3980	4115	3116
3	Регуляторний елемент	ARE	-	-	-	-	-	-		-			
4		Brd-box		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		C-Rich stability element			-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		Grb-box		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7		GU-rich element		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8		GY-Box	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9		K-Box	-		-	-	-	-	-				
10		Musashi						-					
11		Pumilio binding element			-	-	-	-	-	-	-	-	-
12		SECIS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13		UNR binding site	-	-	-	-	-	-	-	-			-

Біоінформатичні ресурси:  Scan for Motifs  RegRNA 2.0  Обидва

Примітка. * дані про гени, 3'-НТД транскрипційних варіантів яких відрізняються, представлено окремо для кожної ізоформи (номер позначено в дужках)

Продовж. табл. 3.1

1*	Cdc42 (1,3)	Cdc42 (2)*	SH3PXD2A	SH3PXD2B	RhoG	RhoD	RhoB	RhoF	RhoQ	Formin1 (1,2)*	Formin1 (3)*	Formin2	BAIAP2
2	1440	788	8149	4870	599	433	1402	1761	3606	8783	1494	1047	1514
3	-	-			-	-		-			-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
5	-	-	-		-	-	-					-	-
6	-	-		-	-	-	-	-	-		-	-	-
7		-		-	-	-	-	-	-		-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			-
9	-	-	-	-	-			-			-	-	
10					-	-	-						
11	-	-			-	-	-	-			-	-	-
12	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-
13	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-	

Біоінформатичні ресурси: ■ Scan for Motifs ■ RegRNA 2.0 ■ Обидва

Примітка. *дані про гени, 3'-НТД транскрипційних варіантів яких відрізняються, представлено окремо для кожної ізоформи (номер позначено в дужках)

Продовж. табл. 3.1

1*	VASP	FNBP1	TRIP10 (1,2)*	TRIP10 (3)*	FNBP1L (1)*	FNBP1L (2,3)*	CFL1	CFL2	FCHO1	FCHO2	EPS15	ITSN1 (S)*	ITSN1 (L)*	ITSN2 (S)*	ITSN2 (L)*
2	813	3385	315	200	3564	2273	525	2483	268	2431	2437	1510	11561	589	762
3	-	-	-	-					-		-	-		-	
4	-		-	-	-	-	-		-	-	-				
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-			-	-	-						-
8	-	-	-	-			-	-	-		-			-	
9	-		-	-	-	-			-	-		-			
10									-						
11	-	-				-	-	-	-			-			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Біоінформатичні ресурси: ■ Scan for Motifs ■ RegRNA 2.0 ■ Обидва

примітка. *дані про гени, 3'-НТД транскрипційних варіантів яких відрізняються, представлено окремо для кожної ізоформи (номер позначено в дужках)

Оскільки метою даного дослідження був пошук регуляторних елементів, які б сприяли інгібуванню протоонкогенів та прозапальних сигнальних шляхів, ми відкинули описані вище регуляторні елементи та зосередилися на третьому найбільш поширеному – ARE (AU-rich elements, AU-збагачені елементи). Розрізняють декілька класів ARE в залежності від наявності розділених (I клас) або суміжних (II клас) повторів AUUUA. Ці елементи мають різнонаправлені ефекти на стабільність таргетних мРНК – від стабілізації до повної деградації – залежно від класу ARE та від того, який протеїн взаємодіє з цим елементом. Одним із протеїнів, що дестабілізує таргетні мРНК, є тристетрапролін, а значна кількість досліджень демонструє його антионкогенний потенціал, оскільки він знижує експресію генів, залучених до процесів запалення, метастазування, проліферації та виживання клітин (206–215). Незважаючи на те, що TTP є добре дослідженим протеїном, на сьогодні невідомо, чи його антиметастатична дія може бути пов'язана із регуляцією експресії цитоскелет-асоційованих генів, до яких, зокрема, належать *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*. Зважаючи на роль TTP у інгібуванні процесів, пов'язаних із малігнізацією, а також на викладені в таблиці 3.1. результати, нами було прийняте рішення обрати для подальшої роботи саме TTP.

На наступному етапі дослідження необхідно було встановити, чи є AU-збагачені ділянки в 3'НТД цільових мРНК. Узагальнені результати аналізу наведено в таблиці 3.2. Для пошуку AU-збагачених ділянок в транскриптів *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* використовували онлайн-ресурс AREScore, алгоритм якого враховує під час пошуку загальну кількість пентамерів AUUUA, а і такі важливі фактори як пентамери, що перекриваються, розділені на 1-9 нуклеотидів пентамери та AU-збагаченість на початку і в кінці ARE-блоку. Врахування цих параметрів дозволяє з більш високою точністю прогнозувати ймовірність зв'язування ARE-зв'язувальних протеїнів, до яких належить і TTP, з цільовими мРНК. Чим вищим є значення

AREScore, тим вища ймовірність їх зв'язування з даною мРНК. Як видно з таблиці 3.2, найбільш ймовірною є взаємодія з *WASL*, *SH3PXD2A*, та *WIPF1*.

Таблиця 3.2

Оцінка ймовірності взаємодії ТТР із таргетними транскриптами

Транскрипт	Ймовірність (omiXcore)	Ймовірність (RPISeq)	Значення AREScore
<i>SH3PXD2B</i>	0.21	0.90	5.00
<i>WASL</i>	0.13	0.80	16.06
<i>SH3PXD2A</i>	0.87	0.85	18.35
<i>WIPF1</i>	0.69	0.95	11.03
<i>CTTN</i>	0.3	0.80	2.03

Далі для оцінки ймовірності зв'язування саме ТТР з цільовими транскриптами нами *in silico* було проведено аналіз можливості зв'язування ТТР окремо з кожним із транскриптів досліджуваних генів. Для цього використовували 2 ресурси: RPISeq та omiXcore. Перший ресурс дозволяє оцінити глобальну ймовірність зв'язування пари білок-РНК, другий дозволяє оцінити таку ймовірність локально (надає інформацію щодо локалізації сигналів зв'язування по всій довжині таргетної РНК та оцінює ймовірність окремо за кожним сигналом).

Згідно з ресурсом RPISeq ТТР має тенденцію до зв'язування майже із усіма транскриптами інтересу, що можна пояснити природою самого протеїну. ТТР належить до білків із мотивом «цинковий палець», що зумовлює його високу спорідненість до нуклеїнових кислот. Згідно з описом RPISeq, якщо глобальна ймовірність зв'язування *in silico* більша за 0,5, то існує висока ймовірність того, що дана пара білок-мРНК буде також зв'язуватись і *in vitro*. Враховуючи отримані дані, а також дані отримані при пошуку AU-збагачених ділянок в 3'НТД нам було проведено також аналіз локальних ймовірностей зв'язування пар ТТР/мРНК для кожного з цільових

транскриптів окремо за допомогою ресурсу omiXscore.

Згідно з даними, викладеними в таблиці 3.2, найвищу ймовірність зв'язування демонструють *WIPF1* та *SH3PXD2A*. Цікаво, що транскрипт *WASL* демонструє високі AREScore та глобальну ймовірність зв'язування, але при цьому при локальному аналізі ймовірність його зв'язування з ТТР складає лише 0,13. Такі розбіжності, ймовірно, викликані недосконалістю програмного забезпечення, і саме через це при аналізі 3'НТД цільових транскриптів ми використовували декілька різних ресурсів, що дозволяє більш широко та точно передбачити можливість зв'язування протеїн-РНК.

3.1.2. Характеристика клітинної лінії MDA-MB-231 з конститутивною ектопічною експресією ТТР. З літературних джерел відомо, що ТНРМЗ є одним із найагресивніших та найбільш схильних до формування метастазів (216). Внаслідок відсутності HER2 рецепторів, а також рецепторів до естрогену та прогестерону, пухлини цього субтипу характеризуються швидким ростом та високою частотою рецидивів не тільки через значні порушення в регуляції клітинного циклу та рухливості, але також і у зв'язку із неможливістю використання гормональної терапії, що значно звужує коло можливих терапевтичних агентів (217). Модельні лінії клітин, що були отримані від пацієнтів з цим типом РМЗ, часто використовуються для вивчення впливу різноманітних агентів на процеси метастазування. Однією із часто використовуваних ліній, отриманих від пацієнтів з ТНРМЗ є лінія MDA-MB-231 (218). Для вивчення впливу ТТР на експресію таргетних цитоскелет-асоційованих генів, а також на клітинні міграцію та інвазії на основі клітин MDA-MB-231 нами було створено модифіковану лінію MDA-MB-231-екТТР, яку надалі будемо називати скорочено екТТР.

Для підтвердження успішного отримання екТТР ми перевірили рівні білкового продукту ТТР у лізатах екТТР клітин відносно лізатів клітин дикого типу (рис. 3.1, а, б; на рисунку представлено клон 20, який було обрано для роботи, відносна копійність=3). Як видно з рисунку, рівень ТТР в отриманій

лінії приблизно в 36 разів вищий за той, що спостерігався в інтактних клітинах. ТТР – це ген негайної ранньої відповіді, і його базальний рівень експресії дуже низький. Зазвичай, рівень ТТР значно підвищується у відповідь на стимулюючий чинник, а після припинення його дії повертається до нормального (219,220). Також відомо, що у малігнізованих клітинах і так базально низький рівень ТТР значно знижується, що пов'язують із набуттям трансформованого фенотипу (221–223).

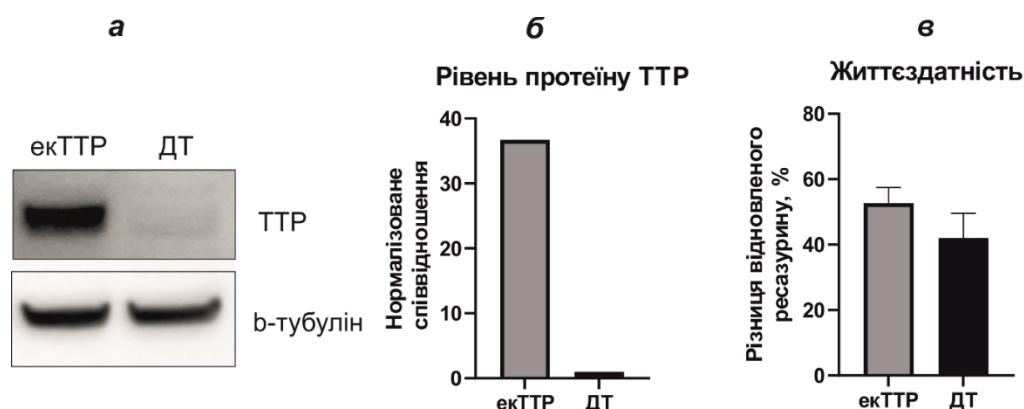


Рис. 3.1. Характеристики клітин лінії MDA-MB-231 із конститутивною ектопічною експресією ТТР. **а** – вестерн-блот аналіз рівнів ТТР в лізатах клітин з ектопічною експресією (екТТР) та клітин дикого типу (ДТ); **б** – гістограма відображає нормалізований рівень ТТР в лізатах відповідних клітинних ліній, $n=1$; **в** – результати визначення життєздатності клітин відповідних ліній за допомогою тесту з ресазурином, $n=5$. Гістограми відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. У **в** використано тест Стьюдента.

Оскільки даний протеїн регулює велику кількість сигнальних каскадів, така висока конститутивна експресія може призводити до змін в фізіології, за яких життєздатність клітин була б значно порушена, що б унеможливило подальші дослідження. Для перевірки придатності отриманої лінії для подальших експериментів ми оцінили їх життєздатність за допомогою тесту з

ресазурином (рис. 3.1, в). У ході аналізу не було виявлено статистично значущої різниці між життєздатністю трансформованих та інтактних клітин, що дозволило використовувати їх в наступних експериментах. Далі в даному дослідженні лінію клітин MDA-MB-231 з ектопічною експресією ТТР буде позначено як екТТР.

3.1.3. Визначення впливу надекспресії ТТР на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*. Після успішної верифікації створення лінії екТТР ми дослідили, як надекспресія ТТР впливає на рівень мРНК таргетних транскриптів. Результати ЗТ-кПЛР представлено на рис. 3.2.

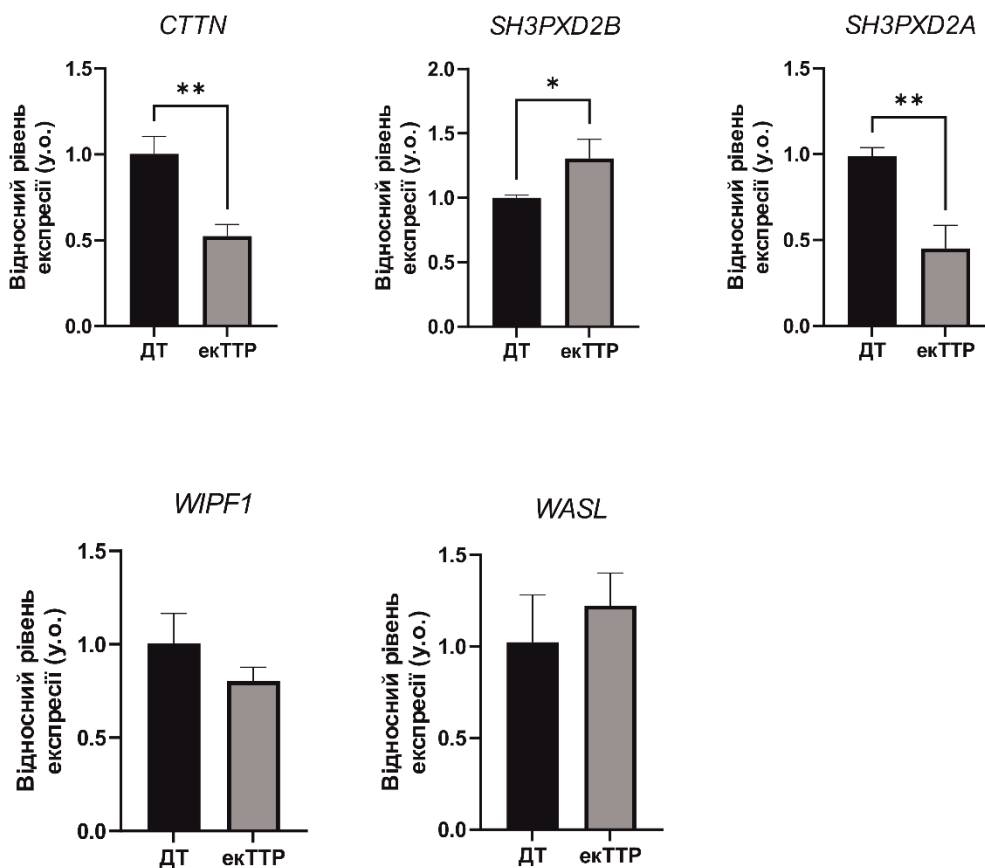


Рис. 3.2. Рівні відносної експресії таргетних генів у клітинах дикого типу (ДТ) та з ектопічною експресією ТТР (екТТР) та (n=3). Гістограми відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. *p<0.05, **p<0.01 (за тестом Мана-Уїтні)

Як видно з рисунку, ектопічна експресія ТТР у екТТР значно змінювала рівень мРНК *CTTN*, *SH3PXD2A* та *SH3PXD2B*, при цьому рівні *WIPF1* та *WASL* не відрізнялися від таких у інтактних клітинах. Так, рівні мРНК *CTTN* та *SH3PXD2A* знижувалися приблизно на 50%, в той час як рівень мРНК *SH3PXD2B*, навпаки, підвищувався приблизно на 40%. Цікаво, що хоча рівні мРНК *WIPF1* та *WASL* статистично значуще не змінювалися порівняно із клітинами дикого типу, рівень цих транскриптів виявився досить варіабельним.

Таким чином, в даному підрозділі нами було встановлено що із 49 проаналізованих цитоскелет-асоційованих генів 16 містили ARE – регуляторний елемент, що може слугувати сайтом зв’язування для антионкогенного протеїну ТТР. Подальший аналіз показав, що існує висока ймовірність зв’язування ТТР з мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*, що могло б призводити до зменшення їх рівнів. Експериментально було підтверджено, в клітинах лінії екТТР дійсно зменшуються рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B* та *CTTN*, проте рівні *WIPF1* та *WASL* не змінюються.

Отримані нами дані свідчать про те, що надекспресія ТТР прямо або опосередковано може бути залучена до регуляції деяких цитоскелет-асоційованих генів, що відкриває нові потенційні напрямки досліджень ТТР у процесах, асоційованих із цитоскелетом.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Hubiarnatorova, 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.
2. Hubiarnatorova, A.; Gerasymchuk, D. MicroRNA and RBP-based regulation of genes involved in the remodelling of actin cytoskeleton. In XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and

Molecular Biology for Innovative Medicine”; 2018; pp 77–84.
doi:10.4324/9780429244506-9.

3. Hubiarnatorova, A.; Gerasymchuk, D.; Kropyvko, S. Investigation of posttranscriptional regulation of genes involved in cytoskeleton dynamics. All-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation 2021, 37, 185–244.

3.2. Вивчення впливу ТТР на морфологію, рухливість та інвазійний потенціал клітин лінії MDA-MB-231

Під час створення лінії клітин із стабільною надекспресією ТТР ми помітили значні морфологічні розбіжності із клітинами дикого типу. Зважаючи також на описані вище зміни рівнів деяких цитоскелет-асоційованих мРНК, ми припустили, що морфологічні зміни можуть бути пов'язані із дефектами актинових філаментів і спрямували подальші дослідження на вивчення особливостей морфології, організації філаментів та рухливості досліджуваних клітин.

3.2.1. Вивчення впливу ТТР на морфологію клітин та актинові філаменти. Для вивчення морфологічних особливостей екТТР клітин актинові філаменти візуалізували флуоресцентно-міченим фалоїдином (рис. 3.3. та 3.4) та за допомогою програм ImageJ, CellPose та FilamentSensor 2.0 проаналізували деякі характеристики клітин.

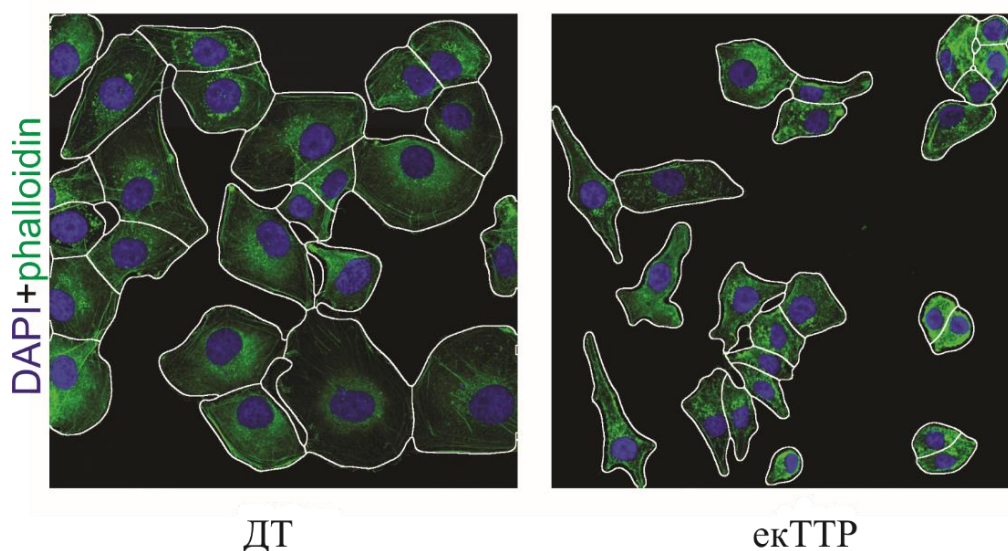


Рис. 3.3. Репрезентативні зображення досліджуваних клітин лінії екТТР порівняно із клітинами дикого типу (ДТ). Ядра візуалізовані флуоресцентним барвником DAPI, актинові філаменти – фалоїдином-488, межі клітин позначено білим. Масштаб – 100 μm . Сегментація за CellPose3

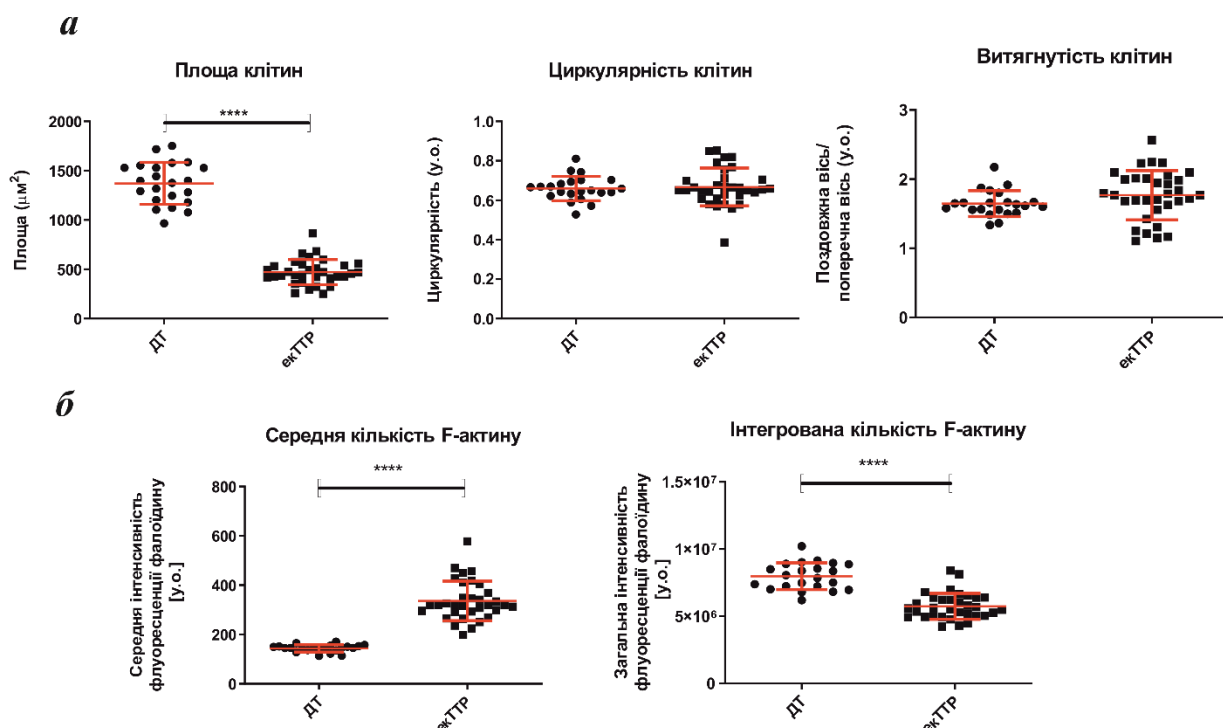


Рис. 3.4. Морфологічні характеристики клітин (**а**) та загальні характеристики актинових філаментів (**б**), проаналізовані за допомогою програмного забезпечення ImageJ, (кількість повторів $n=10$, кількість клітин $n=250$). Гістограми відображають медіану $\pm$ стандартне відхилення. **** $p<0.0001$ (за тестами Мана-Уїтні (середня кількість F-актину) та тестом Стюдента (для всіх інших))

Як видно з рисунку 3.3 та 3.4 а, площа клітин з надекспресією ТТР була значно меншою за таку у клітин дикого типу (у 3,04 рази), хоча їх форма залишалася типовою для клітин лінії MDA-MB-231, на що вказує відсутність статистично достовірної різниці між значеннями циркулярності та витягнутості (рис. 3.4 а). Цікаво, що при цьому, екТТР клітини демонстрували більшу схильність до розпластування тоді, коли мали мінімальну кількість прямих контактів із сусідніми клітинами.

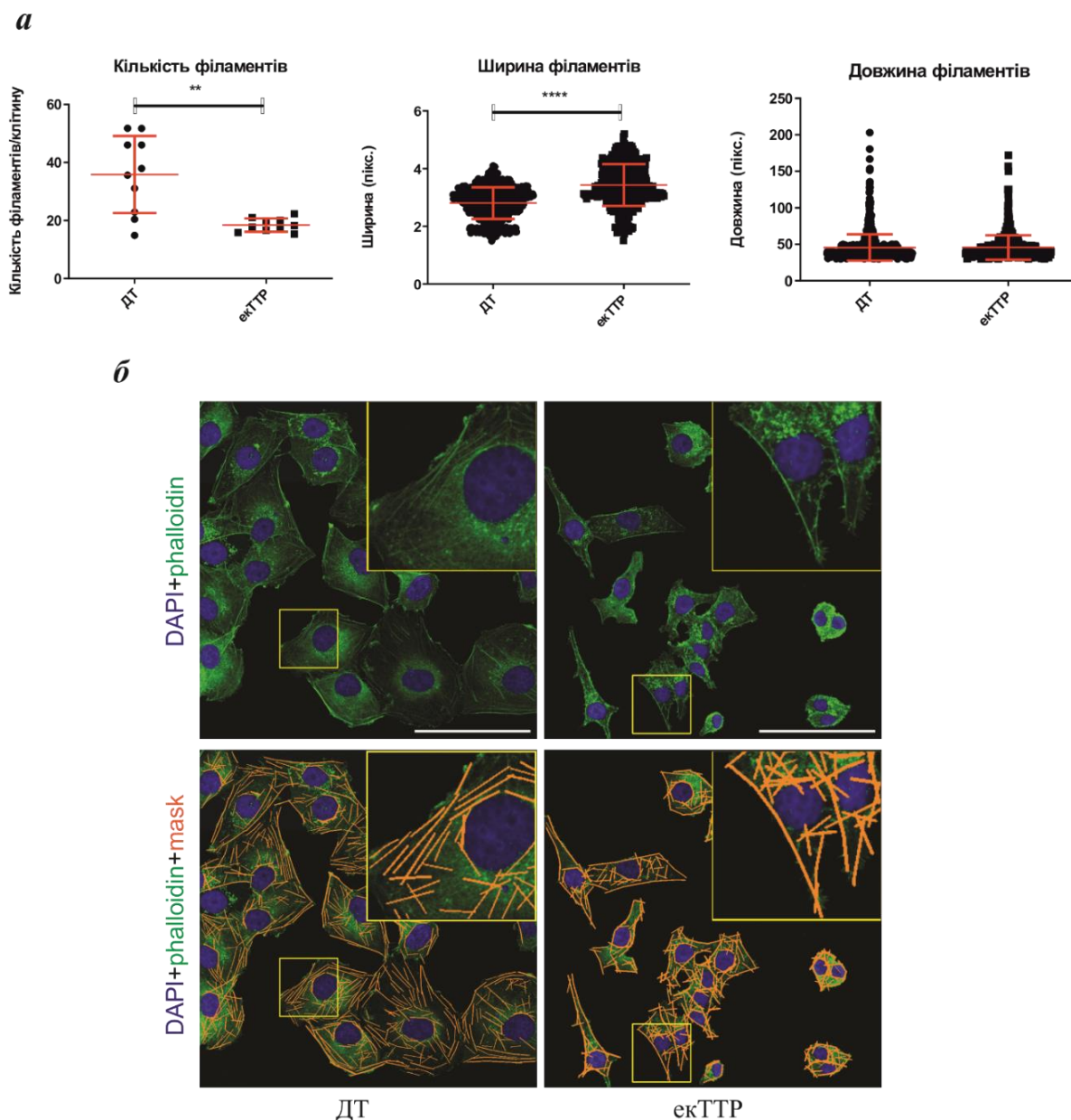


Рис. 3.5. Аналіз деяких морфологічних особливостей клітин лінії екТТР, кількість повторів $n=10$, кількість клітин $n=250$. **a** – аналіз кількості філаментів, а також їх ширини та довжини; **б** – верхня панель – типовий вигляд клітин та будова актинового цитоскелету, нижня панель – типовий вигляд клітин з накладеною маскою філаментів. Ядра візуалізовані DAPI, актинові філаменти – флуоресцентно-міченим фалоїдином-488, маску філаментів позначено оранжевим. Масштаб – 100 μm . Віконця збільшення відображають типові ділянки 50×50 μm . Графіки відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$ (за тестом Мана-Уїтні)

У екТТР клітинах спостерігалось загальне підвищення середньої кількості актину (величина аналогічна до концентрації речовини, рис. 3.4, б), але разом із тим загальна інтенсивність сигналу на клітину (величина аналогічна масі речовини, інтегрована кількість актину) була значно меншою за таку в клітинах дикого типу, що може як відображати загальне зменшення їх розміру, так і вказувати на дефекти під час полімеризації актину. Крім того, хоча клітини дикого типу демонстрували виражені скупчення актину в перинуклеарній та кортикальній зонах, а також виражені актинові фібрили на фоні меншої інтенсивності сигналу в інших зонах (рис 3.3), в екТТР клітинах спостерігалось відносно рівномірне розподілення актину по всій площі, що також свідчить про дисрегуляцію полімеризації та організації актинових філаментів.

Оскільки викладені вище результати свідчать про певні дефекти в організації актинових філаментів, надалі ми проаналізували деякі їх характеристики: кількість, довжину та ширину (рис. 3.5.). Як видно з рис. 3.5, екТТР клітини значно відрізнялися від контрольних будовою та кількістю актинових філаментів. Так, вони мали значно меншу кількість актинових фібрил, а самі фібрили були значно ширшими від таких у контрольних клітинах. При цьому високий рівень експресії ТТР не призводив до змін у довжини філаментів, але в таких клітинах спостерігалась інтенсивніша присутність актину в кортикальній зоні. Також екТТР клітини демонстрували значну кількість глибок актину (англ. actin patches), характерних для клітин, оброблених цитохалазином В – інгібітором полімеризації актину, що підтримує наше припущення щодо ТТР-медійованих порушень організації актину.

3.2.2. Вивчення впливу ТТР на рухливість клітин. Оскільки попередньо нами було виявлено, що досліджувані клітини демонструють різкі зміни у морфології та деяких характеристиках актинового цитоскелету, а також зниження рівня деяких цитоскелет-асоційованих мРНК, продукти яких

необхідні для реалізації рухової активності клітин, ми спрямували подальші дослідження на вивчення рухливості цих клітин. Для цього протягом 24 годин ми відстежували в 2D клітини, що мали попередньо флуоресцентно мічені ядра та цитоскелет. Всі параметри обчислювали з використанням ядер як точок відстежування, результати досліджень представлено на рис. 3.6.

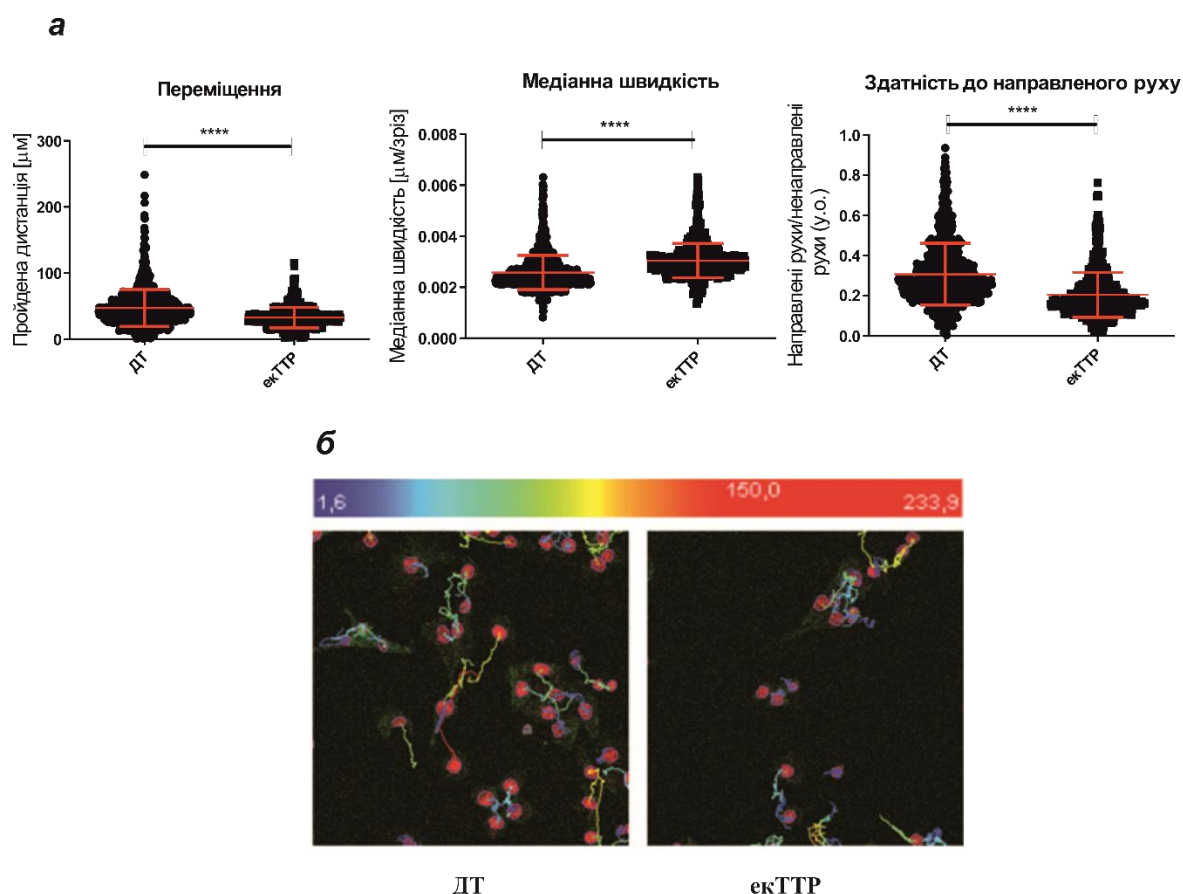


Рис. 3.6. Аналіз рухливості клітин лінії екТТР у порівнянні із клітинами дикого типу (ДТ), повтори $n=14$, кількість ядер $n=500$. **а** – характеристика здатності клітин до переміщення в цілому, швидкості їх руху та здатності до направленої руху; **б** – репрезентативні зображення ($400 \times 400 \mu\text{m}$), що ілюструють траєкторії клітин. Колір треків ілюструє пройдену відстань відповідно до кольорової калібрувальної шкали над зображеннями. Треки клітин, що пройшли більше $150 \mu\text{m}$, забарвлені червоним. Ядра забарвлені червоним (SiR-DNA), F-актин – зеленим (SPY555-actin). Графіки відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. **** $p < 0.0001$ (за тестом Мана-Уїтні)

Конститутивна надекспресія ТТР значно (на 60%) зменшувала переміщення клітин (відстань від початкової до кінцевої точки), а також значно знижувала їх здатність до направлених рухів (на 50%). Цікаво, що при цьому, медіанна швидкість ядер у клітин з надекспресією ТТР була на 10% вищою за швидкість ядер контрольних клітин.

3.2.3. Дослідження впливу ектопічної експресії клітин на інвазійний потенціал клітин. Як зниження рівнів мРНК деяких критично необхідних для інвазії генів, так і загальне зниження рухливості клітин може призводити до зниження інвазійного потенціалу, тому далі ми дослідили здатність клітин лінії екТТР до інвазії (рис. 3.7). Як видно з рисунку, клітини лінії екТТР були в 7,5 разів менш інвазивними порівняно із клітинами дикого типу, що свідчить про значний інгібуючий вплив ТТР на інвазивну поведінку.

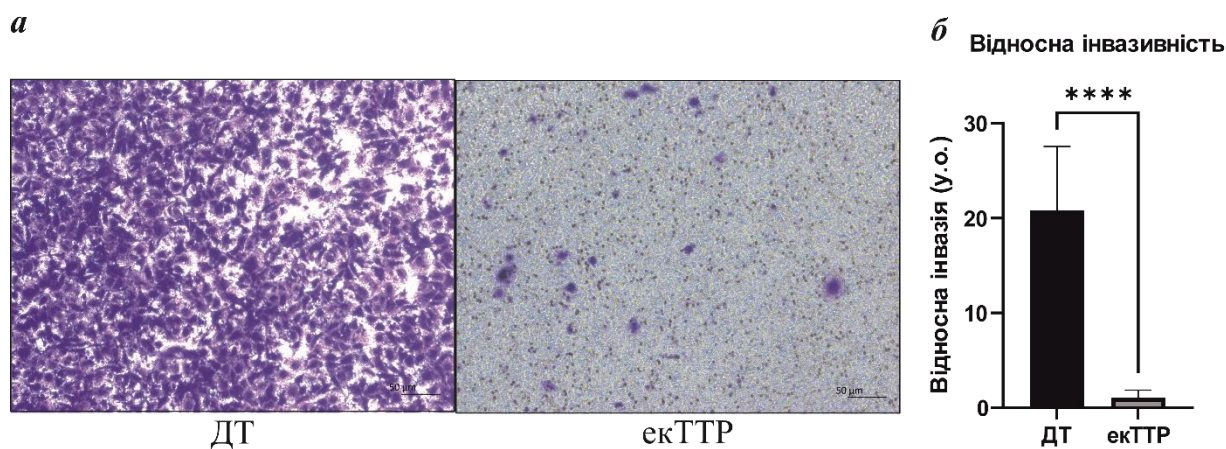


Рис. 3.7. Аналіз інвазійного потенціалу клітин лінії екТТР. *а* – репрезентативні мікрофотографії трансмембранного тесту за Бойденом; *б* – відносний інвазійний потенціал клітин (у.о.). ДТ – клітини дикого типу, екТТР – клітини лінії екТТР, масштаб – 50 мкм. Графіки відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. **** $p < 0.001$ (за тестом Стюдента).

Отже, в цьому розділі дисертаційного дослідження було показано, що ектопічна експресія ТТР значно впливає на морфологію клітин в цілому, а також на організацію, кількість та ширину актинових філаментів, рухливість та здатність клітин до інвазії. Так, надекспресія ТТР призводила до значного зменшення площі клітин, а також до значних змін як в загальній кількості полімеризованого актину, так і в морфології, організації та кількості актинових філаментів. Разом із цими дефектами клітини демонстрували значне зменшення здатності до направлених рухів та значне зменшення показників переміщення порівняно із клітинами дикого типу. При цьому, несподівано швидкість руху ядер клітин із ектопічною експресією ТТР виявилася значно вищою за таку у клітинах дикого типу. Відомо, що під час міграції архітектура клітини змінюється для забезпечення поляризації у напрямку руху, і однією із обов'язкових подій цього процесу є переміщення ядра до протилежного до напрямку руху полюсу клітини, що забезпечує формування переднього краю (англ. *leading edge*) (224). Оскільки ядро напряму пов'язане із актиновими філаментами, які в тому числі реалізують його переміщення під час ініціації руху, ми припускаємо, що одночасно вища швидкість ядер та низька здатність до направлених рухів та результативного переміщення клітин лінії екТТР відображає хаотичні рухи ядра у намаганні сформувати передній край.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

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.

3.3. Аналіз експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних типів та його використання в якості прогностичного маркеру

З літературних джерел відомо, що високий рівень експресії *ZFP36* вважається позитивним прогностичним маркером в різних типах раку (126,139,142–144,225–227). Раніше Goddio та колеги вже проаналізували профілі експресії *ZFP36* в первинних інвазивних пухлинах РМЗ людини, отриманих з бази даних DNA microarray, а також в зразках, отриманих ними безпосередньо (228). В їх дослідженні зразки були поділені лише на три групи: нормальні тканини, нормальні прилеглі тканини та інвазивні пухлинні тканини, проте на сьогодні більш детальна інформація щодо профілю експресії *ZFP36* в різних субтипах РМЗ відсутня. В даному розділі дисертації викладено дослідження профілю експресії *ZFP36* в клінічних зразках пухлин РМЗ різних субтипів, а також оцінка можливості його використання як потенційного маркеру певних субтипів РМЗ, і прогностичного маркеру щодо виживаності пацієнтів.

3.3.1. Формування вибірки зразків пухлин молочної залози людини різних типів. Раніше нашим відділом у співробітництві із Національним Інститутом Раку було створено колекцію зразків пухлин РМЗ. Клінічну інформацію щодо зразків, включених до дослідження, наведено в таблиці 3.3 (всі параметри було визначено після висічення). Зразки з колекції відбирали таким чином, щоб вони представляли не лише пухлини різних типів, але і різних стадій і ступеню метастазування. В роботу включали зразки пухлин п'яти типів: люмінального А, люмінального Б HER2-позитивного, люмінального Б HER2-негативного, тричі негативного та HER2-збагаченого, а також прилеглих умовно-здорових тканин, отриманих від пацієнтів із люмінальним А типом пухлин. Більшість зразків належала до пухлин 2 стадії злоякісності (43 з 70 зразків) без метастазів у лімфатичні вузли та віддалені

тканини, що свідчить про низьку інвазивність на момент висічення. Така вибірка не точно, але приблизно відображає зріз пацієнтів, що звертаються за допомогою вперше і потребують подальшої діагностики (229).

Таблиця 3.3

Клінічна інформація щодо зразків, використаних в роботі.

Тип зразку	Кількість зразків
Інвазивна карцинома	70
Прилеглі тканини	13
Нормальні тканини	1
Стадія	
I	14
II	43
III	11
IV	2
Класифікація TNM (t umor, n odulus, m etastasis)	
T1	18
T2	48
T3	2
T4	2
N0	47
N1	13
N2	10
M0	69
M1	1
Рецепторний статус	
ER ⁺ PR ⁺ HER2/neu ⁻	21
ER ⁻ PR ⁻ HER2/neu ⁻	14
ER ⁺ PR ⁺ HER2/neu ⁺	18
ER ⁻ PR ⁻ HER2/neu ⁺	17

Продовж. табл 3.3

Молекулярний тип	
Люмінальний А	13
Люмінальний Б HER2/neu ⁺	11
Люмінальний Б HER2/neu ⁻	17
HER2-збагачений	17
Тричі-негативний	14

3.3.2. Визначення профілю експресії *ZFP36* в зразках пухлин молочної залози людини різних типів. Оскільки пухлини молочної залози є дуже варіабельними за профілями експресії численних генів, ми припустили, що рівень експресії *ZFP36* може варіюватися не лише між інвазивними та неінвазивними тканинами, а також і залежно від транскрипційного профілю, характерного для того чи іншого молекулярного типу РМЗ. Базова класифікація пухлин РМЗ заснована на різному статусі гормональних рецепторів, які, як відомо, є факторами транскрипції та значно впливають на експресію багатьох генів, отже ми припустили, що *ZFP36*, можливо, міг би виступати потенційним маркером того чи іншого типу РМЗ за умови, що його експресія достовірно відрізнялася б в пухлинах РМЗ того чи іншого типу порівняно з іншими.

Враховуючи ці дані, ми проаналізували профілі експресії *ZFP36* в клінічних зразках пухлин різних типів, щоб визначити, чи він може бути потенційним маркером різних типів пухлин молочної залози людини. Спочатку ми проаналізували транскрипційний профіль *ZFP36* залежно від гістологічного типу, стадії злоякісності пухлин та метастатичного статусу (рис. 3.8.). Рівень мРНК *ZFP36* значно підвищувався у зразках типів Т1 та Т2 порівняно із прилеглими тканинами, але значно не відрізнявся у зразках типів Т3 та Т4. Оскільки вибірка зразків Т3 та Т4 була досить малою (по 2 зразки), неможливо із впевненістю сказати, чи є така особливість тенденцією, чи лише

результатом включення малої вибірки. При цьому також не було виявлено значних розбіжностей у експресії між пухлинами різних типів відносно один одного.

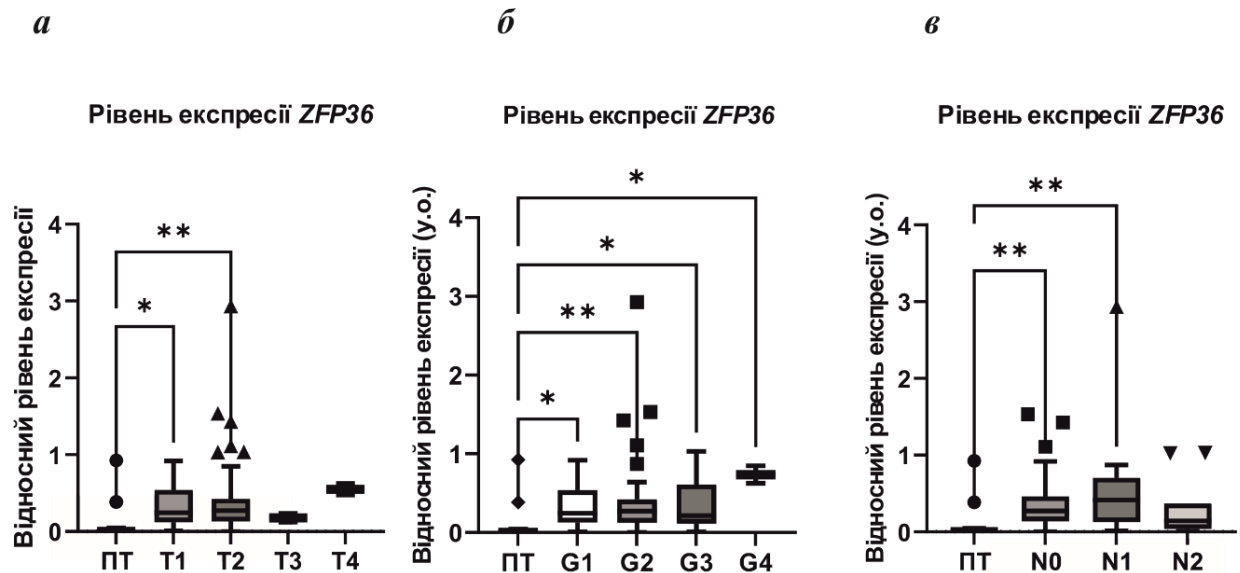


Рис. 3.8. Рівні експресії *ZFP36* пухлинах залежно від патоморфологічних характеристик: *a* – пухлинах з різними гістологічними характеристиками, *б* – пухлинах різних стадій злоякісності, *в* – залежно від типу метастазів у лімфатичні вузли. ПТ – прилеглі тканини, T1, T2, T3 та T4 – морфологічний тип за класифікацією TNM. G1, G2, G3, G4 – стадія злоякісності. N0, N1, N2 – метастази у лімфатичних вузлах за класифікацією TNM. Графіки відображають медіану та 95% довірчі межі. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (за ANOVA Краскела-Уоліса). ● ▲ ■ – значення поза довірчими межами

Схожа тенденція спостерігалася і при поділі зразків за ступенем метастазування, при цьому цікаво, що в неінвазивних зразках N0 спостерігалася значне підвищення рівню *ZFP36* порівняно із зразками прилеглих тканин. Такий самий ефект спостерігався і в більш інвазивних зразках N1, в той час як у високоінвазивних N2 – ні. При цьому, експресія *ZFP36* достовірно не відрізнялася між пухлинами різної інвазивності, подібно

до пухлин різних гістологічних типів. Також, пухлини всіх стадій (G1-G4) значно відрізнялися від прилеглих тканин за рівнем експресії *ZFP36*, при цьому найбільша різниця спостерігалася в пухлинах G2.

На рис. 3.9. представлені відносні рівні експресії *ZFP36* в пухлинах різних молекулярних типів та прилеглих тканинах. В ході аналізу ми з'ясували, що рівень експресії *ZFP36* був значно підвищений у всіх типах пухлин порівняно з прилеглими тканинами.

Рівень експресії *ZFP36* в пухлинах та прилеглих тканинах

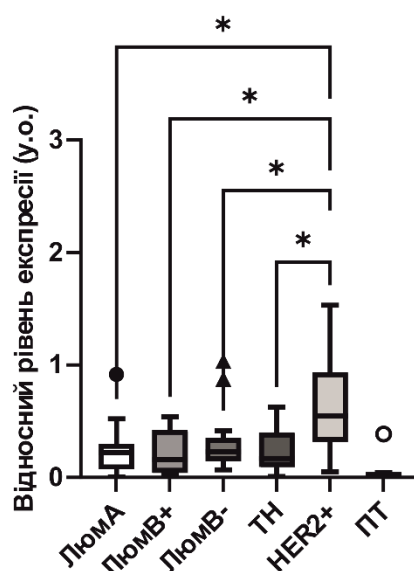


Рис. 3.8. Профіль експресії *ZFP36* в проаналізованих зразках. **а** – профіль експресії *ZFP36* в різних типах пухлин та прилеглих тканинах; **б** – профіль експресії *ZFP36* в різних типах пухлин. ЛюмА – люмінальний А тип, ЛюмВ+ – люмінальний В HER2-позитивний тип, ЛюмВ- – люмінальний В HER2-негативний тип, ТН – тричі-негативний тип, ПТ – прилеглі тканини. Графіки відображають медіану та 95% довірчі межі. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ (за ANOVA Краскела-Уоліса). ○●▲ – значення поза довірчими межами

Хоча з даних літератури відомо, що як рівень мРНК *ZFP36*, так і рівень його білкового продукту часто значно знижені в пухлинних тканинах

порівняно із нормальними, в даному дослідженні як контрольні використовували прилеглі умовно-здорові тканини, що являють собою третій, унікальний тип, що відрізняється як від пухлинних, так і отриманих від здорових донорів тканин (230). Оскільки у ході дослідження виявилось, що експресія *ZFP36* значно підвищена в зразках HER2-збагаченого типу порівняно із іншими типами пухлин. Крім того, як згадувалося раніше, рецепторний статус пухлини також може впливати на транскрипційний профіль, тому ми проаналізували його рівні експресії у зразках з та без експресії HER2-рецептора, а також в залежності від рівня його ампліфікації (рис. 3.10).

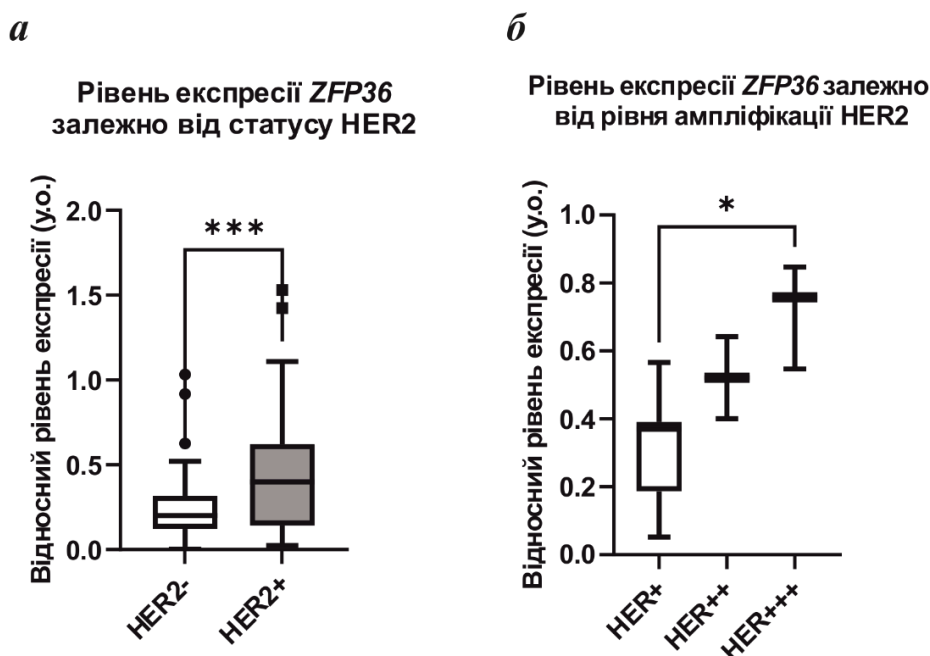


Рис. 3.10. Рівні експресії *ZFP36* залежно від наявності (а) HER2 рецептора у всіх типах пухлин, та (б) рівня ампліфікації (надекспресії) HER2 рецептора у пухлинах HER2-збагаченого типу. На графіку (а) HER2- – відсутність експресії, HER2+ – наявність експресії HER2 рецептора. На графіку (б) HER2+ – звичайний, HER2++ – підвищений, HER2+++ – високий рівень експресії HER2 рецептора. Графіки відображають медіану та 95% довірчі межі. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (а – за тестом Мана-Уїтні, б – за ANOVA Краскела-Уоліса з корекцією за Тьюкі). ■● – значення поза довірчими межами

Аналіз показав, що в HER2-негативних зразках рівень експресії *ZFP36* був значно меншим порівняно із HER2-позитивними зразками. При цьому, серед HER2-позитивних пухлин ті зразки, що мали його звичайний рівень експресії (HER2+) значно відрізнялися від таких із високим рівнем експресії (HER2+++), але не від пухлин із підвищеним рівнем HER2 (HER2++).

Як вже згадувалося вище, наявність або відсутність рецепторів до стероїдних гормонів може призводити до змін транскрипційного профілю та подальших змін у протіканні клітинних процесів, а отже рецепторний статус пухлин може значно впливати на рівні потенційних біомаркерів. В даному дослідженні група зразків люмінального Б типу була представлена як зразками з і без експресії HER2 рецептора, так і зразками з і без експресії рецептора прогестерону (PR), тому далі ми проаналізували чи змінювався рівень експресії *ZFP36* залежно від наявності чи відсутності цих рецепторів в пухлинах даного типу. Результати аналізу представлено на рис. 3.11. Як видно з рисунку, нами не було виявлено значущих змін експресії *ZFP36* в пухлинах люмінального Б типу ані в залежності від статусу HER2, ані в залежності від статусу PR. Вище ми виявили залежність рівня експресії *ZFP36* від статусу HER2 на вибірці, що була представлена пухлинами усіх типів з або без експресії HER2, тому ми припускаємо, що в пухлинах люмінального Б наявні особливості патофізіологічних процесів, що відрізняються від пухлин інших типів та не призводять до змін експресії *ZFP36*.

Так, на відміну від тричі-негативного та HER2-збагченого типів обидва люмінальні характеризуються високою частотою мутацій в гені *GATA3*, продукт якого є транскрипційним фактором, важливим для підтримки люмінальної ідентичності та характеризується низькою експресією в пухлинах люмінального А та Б типів (231,232), що потенційно може вплинути на експресію *ZFP36*.

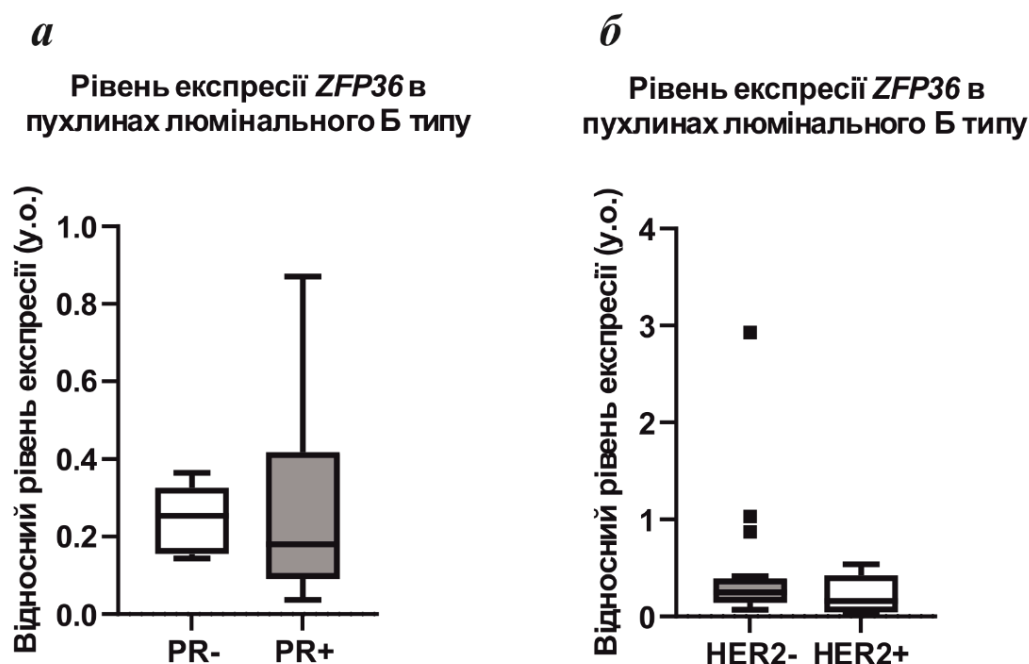


Рис. 3.11. Рівні експресії *ZFP36* в зразках пухлин люмінального Б типу залежно від наявності або відсутності рецептора до прогестерону PR (**а**) та HER2-рецептора (**б**). Графіки відображають медіану та 95% довірчі межі. ■ – значення поза довірчими межами (використано тест Мана-Уїтні)

3.3.3. Аналіз виживаності пацієнтів з РМЗ різних субтипів у когортах з високим та низьким рівнями експресії *ZFP36*. Оскільки одним із завдань даного дисертаційного дослідження було оцінити можливість використання *ZFP36* як прогностичного біомаркера РМЗ, ми проаналізували публічно доступні дані щодо рівнів загальної виживаності та виживаності без рецидиву в когортах пацієнтів із високим та низьким рівнем експресії *ZFP36* (рис. 3.12), а також дані, розділені по субтипам представлені в базі даних GEPIA (рис. 3.13) (141).

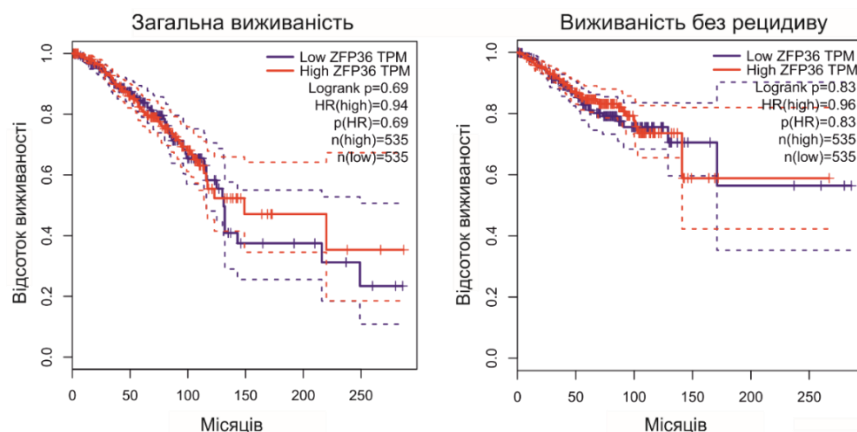


Рис. 3.12. Показники виживаності пацієнтів з РМЗ у когортах з низькою та високою експресією *ZFP36* за GEP1A

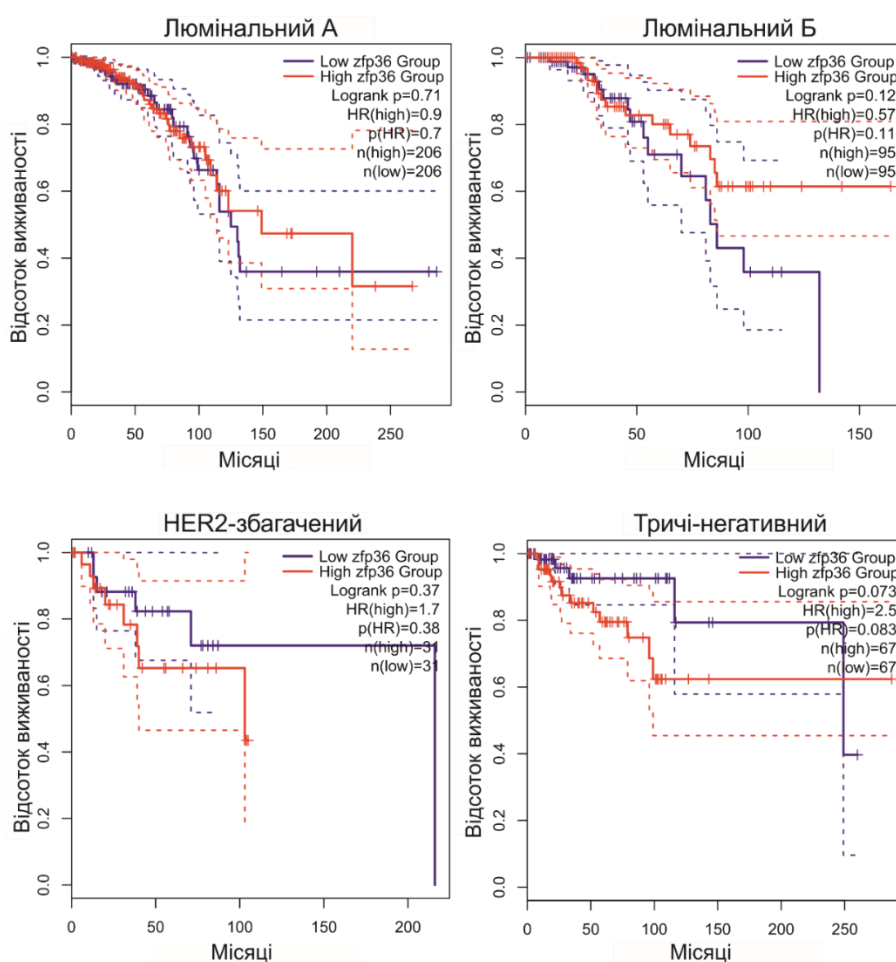


Рис. 3.13. Показники виживаності пацієнтів з РМЗ у когортах з низькою та високою експресією *ZFP36*, диференційовані за різними субтипами за GEP1A

Так, хоча в літературі високий рівень експресії *ZFP36* вважається виключно позитивним прогностичним маркером, в тому числі щодо виживаності пацієнтів, при більш детальному аналізі виявилось, що сприятливість прогнозу у пацієнтів з високим рівнем *ZFP36* значно варіює і може корелювати як із позитивним, так і з негативним прогнозом. Хоча для пацієнтів із люмінальним А та Б субтипами тенденція щодо виживаності у групах з високою та низькою експресією збігається із загальними, у когорті пацієнтів із тричі-негативним РМЗ і високим рівнем *ZFP36* медіанна виживаність була вищою за таку у когорті з низьким рівнем *ZFP36* аж до 250 місяців після діагнозу (80% проти 60%), хоча після цього падала майже вдвічі. Також, у когорті з HER2-збагаченим субтипом, що зазвичай характеризується несприятливим прогнозом, пацієнти із високою експресією *ZFP36* демонстрували значно нижчі показники виживаності порівняно із групою із низькою експресією із різницею майже в 100 місяців, що відповідає 8,3 рокам.

Отже, в даному розділі показано, що рівень експресії *ZFP36* у пухлинних тканинах РМЗ різних типів значно відрізняються від такого в прилеглих тканинах. Крім того, показано, що його експресія значно підвищена в пухлинах HER2-збагаченого субтипу як порівняно із прилеглими тканинами, так і порівняно із зразками інших субтипів. При цьому виявлено, що із підвищенням ампліфікації HER2 в зразках HER2-збагаченого субтипу експресія досліджуваного гена також підвищується, але не змінюється між HER2-позитивними та HER2-негативними зразками люмінального Б субтипу, що свідчить про значні патофізіологічні відмінності між цими двома субтипами.

Крім того, при аналізі публічно доступних даних щодо показників виживаності пацієнтів в когортах із високою та низькою експресією *ZFP36* виявлено, що незважаючи на загальну тенденцію високого рівня експресії до кореляції із сприятливим прогнозом, при розділенні цих даних за різними субтипами висока експресія *ZFP36* може корелювати як із сприятливим, так і з несприятливим прогнозом.

Таким чином, висвітлені в цьому розділі результати свідчать, що рівень експресії *ZFP36* потенційно може бути маркером HER2-збагаченого субтипу РМЗ, але його потенційне використання як прогностичного маркера виживаності пацієнтів можливе лише за умови урахування субтипу та потребує подальших досліджень.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Kropyvko, S.; Hubiarnatorova, 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.
2. Hubiarnatorova, 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.
3. Hubiarnatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O. Tristetraprolin in breast cancer. *Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023* 2023, 39, 66.
4. Hubiarnatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O.; Lavrynenko, K.; Syvak, L.; Verovkina, N.; et al. TRISTETRAPROLIN IN CANCER: TREAT OR TRICK? *All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation*, 2022, 127.

3.4. Дослідження впливу DXR на рівні експресії мРНК *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* на моделі люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози

DXR є одним із найчастіше вживаних в протоколах терапії РМЗ препаратів, що застосовується як з метою попередження метастазування, так і як одна з основних ліній ТНРМЗ, оскільки останній не підлягає гормональній терапії. Крім того, DXR являє собою генотоксичний агент і значно впливає на транскрипційний профіль клітин. Раніше Lee та колеги показали, що DXR може підвищувати експресію *ZFP36* в клітинах лінії MCF7 та MDA-MB-231, що відповідає люмінальному А та тричі-негативному субтипам РМЗ (129,233,234). При цьому, в їх дослідженнях було використано супраклінічні концентрації DXR, що може спотворювати отримані результати внаслідок його високої цитотоксичності та ускладнює екстраполяцію отриманих даних на *in vivo*. Існують дослідження, які демонструють, що доксорубіцин порушує функцію актинового цитоскелету, головним чином шляхом стимуляції оксидативного стресу та впливу на сигнальні шляхи, такі як ROCK1 або RHOA (235,236). Тим не менш, на сьогоднішні дані щодо впливу доксорубіцину на експресію генів, що досліджуються в даному дисертаційному дослідженні, немає. Крім того, аналіз публічно доступних баз даних транскриптомів показав, що дані щодо профілів експресії в клітинах, оброблених за подібним цьому дослідженню протоколом, також відсутні.

В даному розділі викладено дослідження впливу клінічно релевантних концентрацій DXR на рівні експресії *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах ліній MCF7 та MDA-MB-231. Хоча включення екТТР клітин допомогло б більш повно дослідити роль як доксорубіцину, так і ТТР в змінах профілю експресії цільових цитоскелет-асоційованих генів, їх не було включено до дослідження оскільки вони демонстрували високу чутливість до доксорубіцину та не були життєздатними необхідний для експерименту час.

3.4.1. Визначення цитотоксичності DXR для клітин ліній MCF7 та MDA-MB-231. Перед вивченням впливу DXR на рівні експресії таргетних генів ми визначали його цитотоксичність (IC_{50} та IC_{90}) для досліджуваних клітинних ліній (рис. 3.14 та табл. 3.3).

У різних дослідженнях, присвячених вивченню ефектів, що спричиняє DXR, значення IC_{50} та IC_{90} значно варіюють (від 50 nM і аж до 27 μ M) і можуть залежати від умов експерименту та різної чутливості клітин до цитотоксичного агенту (237–240). Клітини, що зазнають впливу одного і того самого агенту, можуть демонструвати різні фенотипи залежно від того, була використана сублетальна чи летальна доза, у скільки разів використана доза перевищувала летальну, а також протягом якого часу інкубації було отримано ці значення. Також велике значення має клінічна релевантність обраних для дослідів концентрацій цитотоксичних агентів.

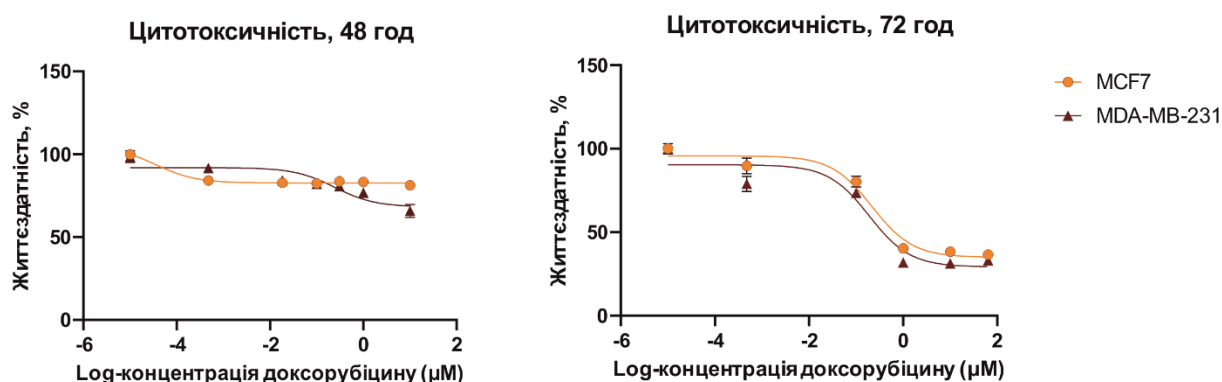


Рис. 3.14. Цитотоксичність DXR для клітин ліній MCF7 та MDA-MB-231 після 48 (зліва) та 72 (справа) годин інкубації

Так, якщо для дослідження *in vitro* використовують кількість, що значно перевищує пікові концентрації в плазмі (C_{pp}), результати таких досліджень важко застосувати до потенційних наступних досліджень *in vivo*. Брак таких відомостей значно ускладнює, а іноді і унеможлиблює як інтерпретацію наявних в літературі результатів, так і їх коректну екстраполяцію на

результати власних досліджень, тому визначення IC_{50} та IC_{90} для кожної конкретної культури клітин та експериментальних умов є необхідною умовою для інтеграції досліджень.

Для використаних у даному дослідженні ліній MCF7 та MDA-MB-231 тестували концентрації від 0,1 до 5,0 μM протягом 48 та 72 годин інкубації. Хоча C_{pp} для DXR коливається від 0,1 до 1,0 μM (а отже ці концентрації для доксорубіцину вважаються клінічно релевантними (187)), ми розширили діапазон тестових концентрацій для точнішого визначення чутливості дослідних клітин. При обробці протягом 48 годин клітини жодної з ліній не досягли порогу менше 50% життєздатних клітин, але при подовженні інкубації до 72 годин було досягнуто 50% інгібування. Після цього для визначення сублетальних (доза нижче IC_{50}) та токсичних (доза вище IC_{50} , але нижча IC_{90}) доз DXR визначали IC_{50} та IC_{90} , відповідно, значення яких представлено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Значення IC_{50} та IC_{90} DXR для клітин ліній MCF7 та MDA-MB-231, використаних в даному дослідженні

Показник цитотоксичності (μM)	Клітинна лінія	
	MCF7	MDA-MB-231
IC_{50}	0,24	0,19
IC_{90}	2,16	1,71

Оскільки основним фокусом даного дослідження було виявити зміни експресії таргетних генів під впливом клінічно релевантних концентрацій (до 1,0 μM) DXR в клітинах із достатньою життєздатністю, для подальших досліджень обрали обробку клітин 0,1, 0,5 та 1,0 μM DXR протягом 48 годин; доза 0,1 μM була визначена як сублетальна, а дози 0,5 та 1,0 μM були визначені як токсичні.

3.4.2. Вивчення впливу клінічно релевантних концентрацій DXR на рівні мРНК та протеїну ТТР в клітинах лінії MCF7 та MDA-MB-231. Враховуючи описані вище дослідження Lee щодо індукції ТТР ми обробляли клітини за схемою, описаною вище, та визначали, чи ці концентрації викликають індукцію ТТР як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну в лініях MCF7 та MDA-MB-231 (рис. 3.15 та рис. 3.16, відповідно).

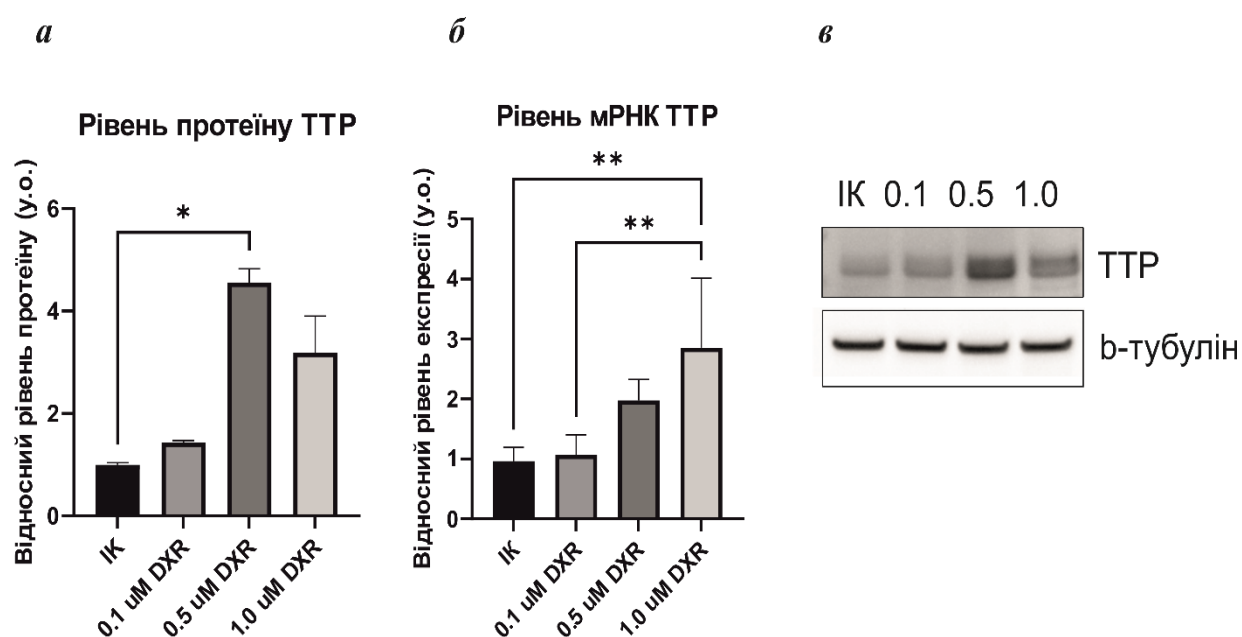


Рис 3.15. Рівень експресії *ZFP36* на рівні мРНК та протеїну в клітинах лінії MCF7, оброблених різними концентраціями DXR. **а** – рівень мРНК ТТР, $n=6$; **б** – рівень протеїну ТТР, $n=6$; **в** – репрезентативні зображення блотограми лізатів досліджуваних клітин. 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM; ІК – інтактні клітини. Графіки відображають медіана та 95% довірчий інтервал. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ за ANOVA

Клітини лінії MCF7 демонстрували індукцію ТТР на рівні мРНК вже з сублетальної дози 0,1 μM, проте на білковому рівні кількість ТТР підвищувалася тільки після підняття концентрації DXR до 0,5 μM. Цікаво, що відносна кількість як мРНК, так і протеїну ТТР була більш-менш сталою як в

інтактних клітинах, так і в клітинах, оброблених 0,1 та 0,5 μM доксорубіцину, але під впливом 1,0 μM рівень як мРНК, так і протеїну вже демонстрували значну варіабельність. При цьому також цікаво, що кількість протеїнового продукту ТТР досягала піку при концентрації 0,5 μM , після чого спостерігався спад. Хоча рівень мРНК був варіабельним, в середньому він був вищий за той, що спостерігався у випадку менших концентрацій.

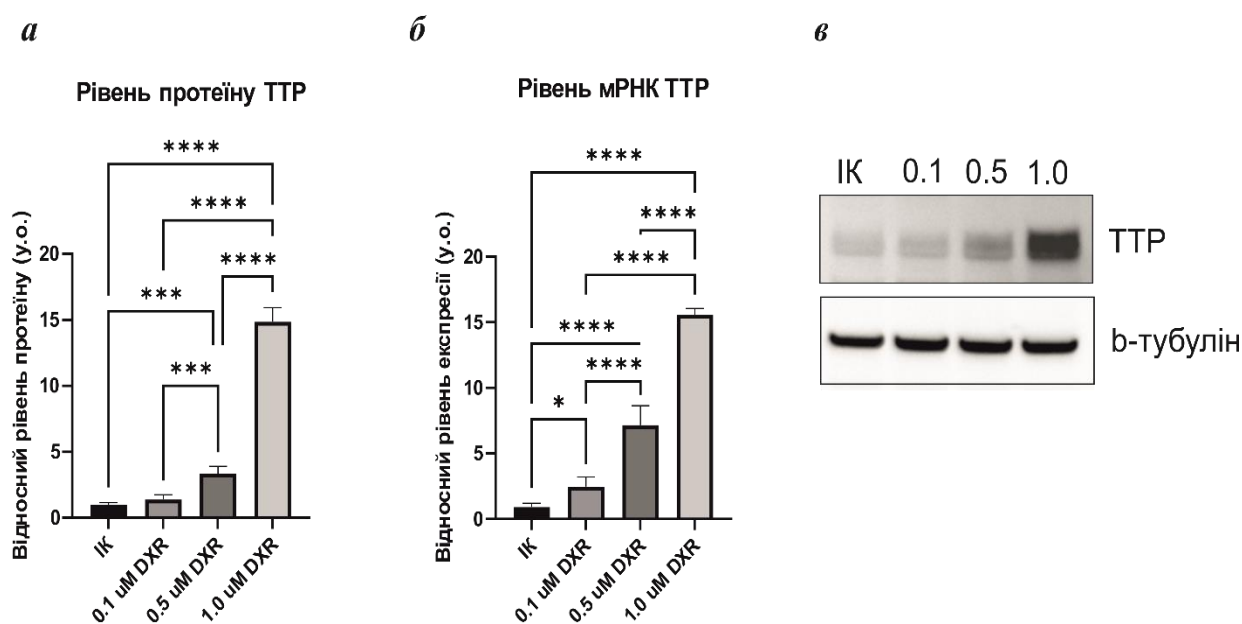


Рис 3.16. Рівень експресії *ZFP36* на рівні мРНК та протеїну в клітинах лінії MDA-MB-231, оброблених різними концентраціями DXR. **a** – рівень мРНК ТТР, $n=6$; **б** – рівень протеїну ТТР, $n=6$; **в** – репрезентативні зображення блотограми лізатів досліджуваних клітин. 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM ; IK – інтактні клітини. Графіки відображають медіану та 95% довірчий інтервал. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ за ANOVA Краскела-Уоліса

Такі спостереження можна пояснити тим, що лінія MCF7 характеризується наявністю протеїну p53 дикого типу. Так, p53 бере участь у відповіді на пошкодження ДНК, в тому числі викликаному DXR (241). При цьому, p53 має осцилюючий характер активності, що значно впливає на часові

патерни експресії його таргетних генів залежно від стабільності їх мРНК. Оскільки ТТР є одним із таргетів p53 і період півжиття його мРНК складає приблизно 20 хвилин, така варіабельність може бути пов'язана із його різним статусом на момент лізису клітин (242).

Лінія MDA-MB-231 натомість характеризується мутантним p53, що призводить до нездатності клітини реагувати на пошкодження ДНК належним чином, і, як наслідок, потенційному уникненню апоптозу та подальшій малігнізації (242). Враховуючи це, можна очікувати, що рівні ТТР у оброблених DXR клітинах цієї лінії будуть відрізнятися від таких, що спостерігали в клітинах MCF7.

Дійсно, наші результати показали, що рівень мРНК та протеїнового продукту ТТР значно підвищувалися починаючи з мінімальної концентрації (0,1 та 0,5 μM для мРНК та протеїну, відповідно), сягаючи збільшення приблизно в 15 разів для обох продуктів за концентрації 1,0 μM , тобто у випадку лінії MDA-MB-231 не спостерігалось піку експресії при 0,5 μM та подальшого спаду при 1,0 μM , а також спостерігалася стійка кореляція між рівнями мРНК та протеїну. До того ж, на відміну від клітин MCF7 кількість продуктів була сталою між зразками і значно не варіювала, що може свідчити про індукцію ТТР як генералізовану відповідь клітини на пошкодження ДНК за іншим, p53-незалежним механізмом.

3.4.3. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах ліній MCF7 та MDA-MB-231. Генотоксичність DXR та його здатність змінювати експресію різних генів є предметом численних досліджень, особливо тих, що присвячені його кардіотоксичності (243–248). Проте на сьогодні невідомо, чи впливає він на експресію цитоскелет-асоційованих генів, що були включені до нашого дослідження. Зважаючи на механізм дії DXR ми припустили, що він потенційно міг би змінювати рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в досліджуваних клітинах, і для перевірки цієї гіпотези нами

було прийнято рішення вивчити рівні експресії таргетних генів у клітинах ліній MCF7 та MDA-MB-231 після обробки DXR.

3.4.3.1. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MCF7. В ході дослідження виявилось, що обробка DXR призводить до значних змін експресії лише у випадку *CTTN* (рис. 3.17). Так, різке збільшення (у 2,3 рази) його експресії спостерігали за обробки сублетальною дозою (0,1 μM) DXR, при цьому при збільшенні концентрації рівень мРНК *CTTN* знижувався майже до рівня інтактних клітин.

Також ми спостерігали значну варіабельність в рівнях мРНК усіх досліджуваних генів як в інтактних, так і в оброблених клітинах, за виключенням *CTTN* – його рівень в інтактних клітинах був стабільним. Ми пов'язуємо таку варіабельність із високою гетерогенністю клітин лінії MCF7: дані клітини хоча і вважаються єдиною лінією, але насправді являють собою декілька гетерогенних субпопуляцій, що відрізняються між собою в тому числі розміром, морфологією, транскрипційними профілями та рецепторним статусом (249).

Крім того, цікаво, що рівні експресії *SH3PXD2A* та *WIPF1* демонстрували тенденцію до зниження порівняно із інтактними клітинами за сублетальної дози 0,1 μM із подальшим підвищенням за 0,5 μM . При цьому підвищення концентрації до 1,0 μM призводило до подальшого незначного зниження рівня експресії *WIPF1*, але *SH3PXD2A* мав тенденцію до стабільної експресії. Оскільки рівні експресії таргетних генів значно варіювали, ми вирішили провести кореляційний аналіз їх експресії (рис. 3.18).

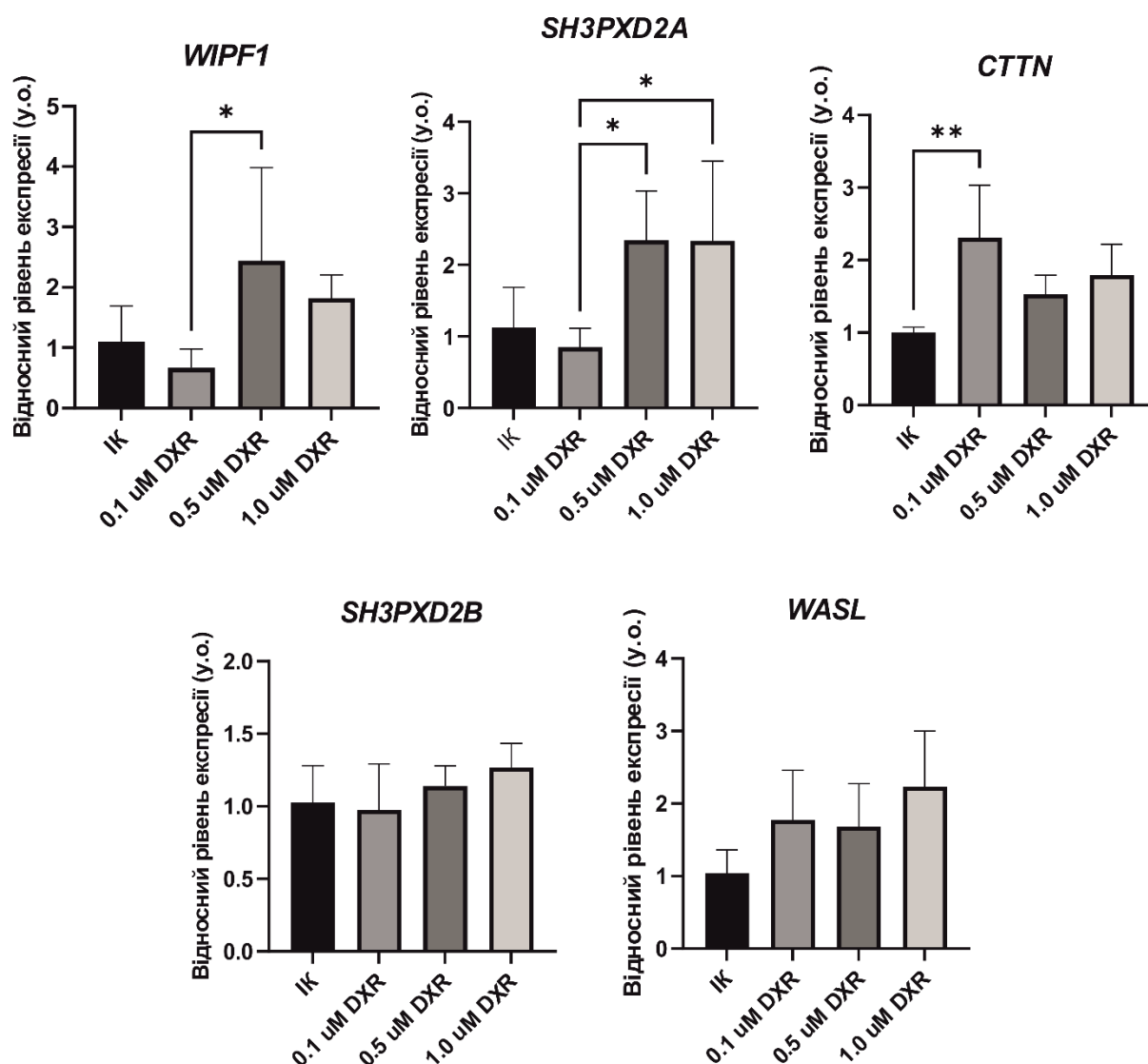


Рис. 3.17. Рівні експресії *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MCF7, оброблених різними концентраціями DXR, $n=6$. 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM ; ІК – інтактні клітини. Графіки відображають медіану та 95% довірчий інтервал. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (за ANOVA Краскела-Уоліса)

Кореляційний аналіз показав позитивну кореляцію між рівнями експресії більшості мРНК, при цьому найвища кореляція спостерігалася між мРНК *ZFP36* та *SH3PXD2A* (коефіцієнт кореляції 0,87) та між *CTTN*, *SH3PXD2B* та *WASL* (коефіцієнт кореляції 0,77). Для інших транскриптів

коефіцієнт кореляції був не менше 0,3, за винятком *CTTN* та *WIPF1*: для них не було виявлено жодної кореляції. Загалом, зважаючи на згадану вище гетерогенність даних клітин, а також наявність у них р53 дикого типу такі рівні експресії таргетних генів ймовірно є проявами генералізованої відповіді клітини на пошкодження ДНК, викликані DXR.

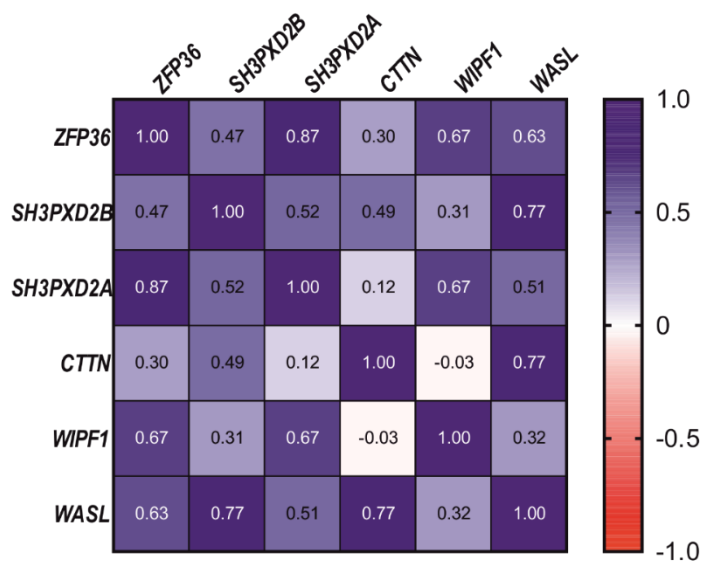


Рис. 3.18. Кореляційний аналіз (за Спірменом) рівнів мРНК *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* після обробки клітин лінії MCF7 DXR

3.4.3.2. Вивчення впливу DXR на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MDA-MB-231. Як і в клітинах MCF7, в клітинах MDA-MB-231 спостерігали значне підвищення рівня мРНК *CTTN*, але в даному випадку не спостерігалось його повернення до рівня, характерного для інтактних клітин. Натомість, рівень *CTTN* залишався стабільно підвищеним (рис. 3.20).

Подібну тенденцію було виявлено і для експресії *WIPF1*, але його рівень врешті знижувався за концентрації 1,0 μ M. Окрім того, за концентрації 1,0 μ M також спостерігалось невелике підвищення рівня *WASL*. Цікаво, що на відміну

від клітин лінії MCF7, інтактні клітини MDA-MB-231 демонстрували достатньо стабільні рівні цільових мРНК (за винятком *SH3PXD2B*), що, можливо пов'язано із більшою унітарністю клітин MDA-MB-231 порівняно із клітинами MCF7.

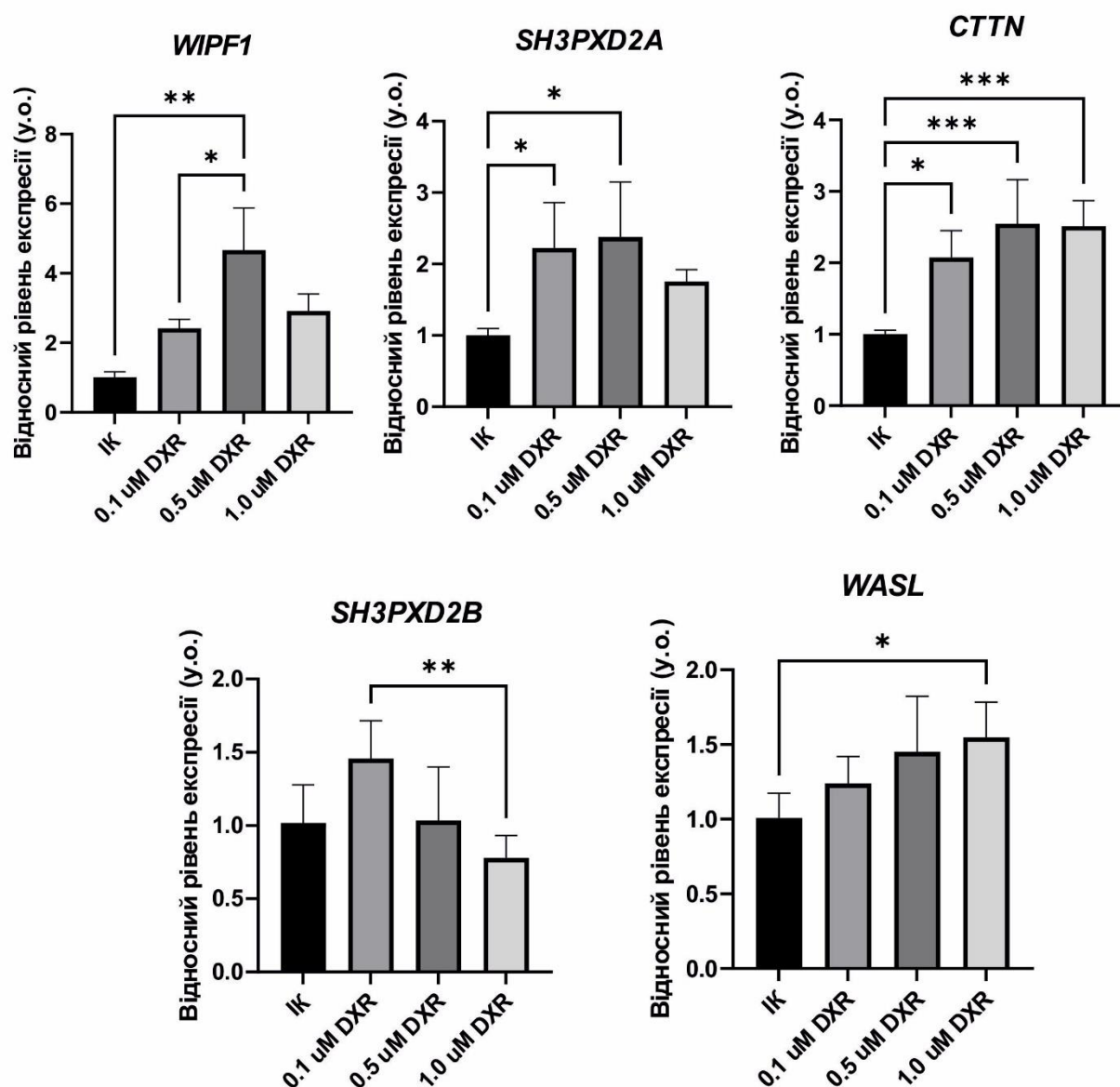


Рис. 3.20. Рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* в клітинах лінії MDA-MB-231, оброблених різними концентраціями DXR, n=6. 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM; IK – інтактні клітини Графіки відображають медіану та 95% довірчий інтервал. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (за ANOVA Краскела-Уоліса)

Також нами було проведено кореляційний аналіз рівнів експресії таргетних генів, результати якого показано на рис. 3.21.

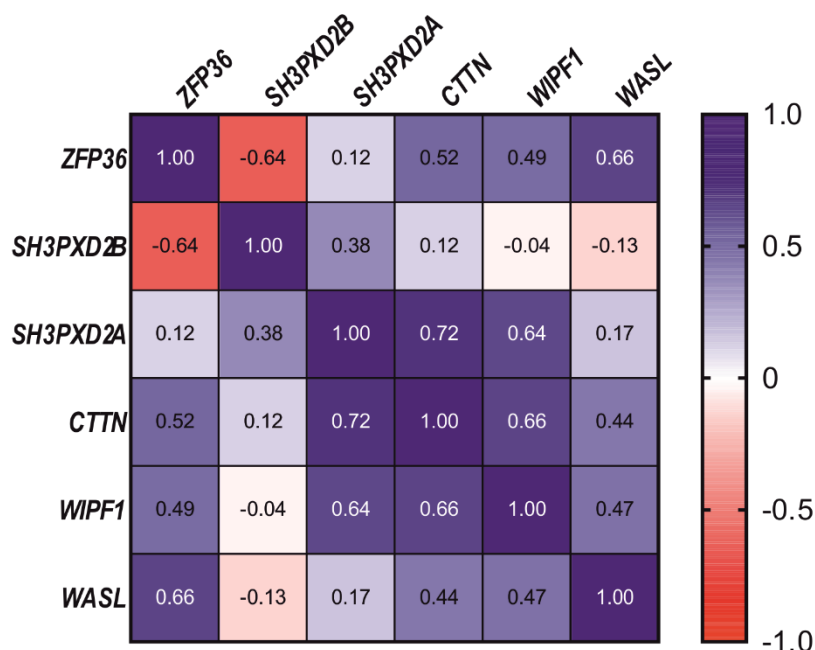


Рис. 3.21. Кореляційний аналіз (за Спірменом) рівнів експресії *ZFP36*, *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* після обробки клітин лінії MDA-MB-231 DXR

Несподівано ми виявили помірну негативну кореляцію між транскриптами *ZFP36* та *SH3PXD2B*. Цікаво, що хоча у розділі 3.2 ми виявили, що у клітинах лінії MDA-MB-231 із стабільною надекспресією ТТР рівень *SH3PXD2B* підвищується, в даному випадку подібної кореляції виявлено не було, що, ймовірно, можна пояснити різними механізмами надекспресії ТТР та ймовірними значними розбіжностями у фізіології клітин MDA-MB-231 дикого типу під впливом DXR та інтактними клітинами екТТР. Хоча безумовно було б доречно вивчити вплив DXR на клітини екТТР, такий експеримент провести було неможливо, оскільки вони демонстрували значну

чутливість до препарату і не були життєздатними протягом достатнього для експерименту часу, як вже було вказано на початку підрозділу.

Також було виявлено позитивну кореляцію різної сили між усіма цільовими транскриптами, окрім *SH3PXD2B* та *WASL*, хоча в клітинах лінії MCF7 кореляція між цими транскриптами була досить сильною (коефіцієнт кореляції 0,77). Не зважаючи на деякі розбіжності можна сказати, що підвищення рівнів експресії деяких таргетних генів ймовірно є генералізованою відповіддю клітин на пошкодження ДНК в клітинах обох ліній.

Отже, в даному розділі нами було досліджено вплив клінічно значущих концентрацій DXR на рівні мРНК та протеїну TTP, а також на рівні мРНК цільових цитоскелет-асоційованих транскриптів на клітинних моделях люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози. Нами було виявлено, що після обробки DXR рівень TTP в клітинах MCF7 збільшувався максимально в 4,2, а в клітинах MDA-MB-231 – 15,3 рази, що ймовірно можна пояснити наявністю p53 дикого типу та мутантного p53, відповідно, у досліджуваних клітинах. Також нами було виявлено підвищення рівня *CTTN* у клітинах обох ліній вже з сублетальної дози 0,1 μ M, проте у клітинах MCF7 даний транскрипт мав тенденцію до повернення до вихідного рівня, а у клітинах MDA-MB-231 навпаки спостерігали його стабільно підвищений рівень за обробки всіма трьома концентраціями. Також нами було виявлено велику варіабельність у рівнях експресії досліджуваних генів як в інтактних, так і в оброблених клітинах лінії MCF7, що, ймовірно, пов'язано із наявністю в цій лінії субпопуляцій із різним статусом експресії гормональних рецепторів (249). Крім того, в даному розділі нами виявлено, що загалом обробка клінічно релевантними концентраціями DXR призводить до тенденції підвищення рівнів експресії досліджуваних цитоскелет-асоційованих генів, що, ймовірно, відображає генералізовану відповідь клітин на генотоксичний стрес та оксидативний стрес.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

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.
2. A. O. Hubiernatorova and S. V. Kropyvko, “Doxorubicin affects expression of the ZFP36 and CTTN genes in MCF7 cell line,” *Biopolym. Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 127–135, 2024, doi: 10.7124/bc.000AB3.

3.5. Вивчення впливу DXR на морфологію та рухливість клітин лінії MDA-MD-231

В розділі 3.2 нами було показано, що ектопічна експресія TTP призводить до значних змін в морфології та рухливості клітин лінії MDA-MB-231, а в розділі 3.4 було виявлено, що DXR викликає не тільки індукцію TTP, а також зміни в експресії більшості таргетних цитоскелет-асоційованих генів, зокрема, призводить до стійкого підвищення експресії *CTTN*, продуктом якого є фактор нуклеації актину кортактин. Зважаючи на ці результати, ми спрямували подальші дослідження на вивчення впливу DXR на морфологію та рухливість клітин лінії MDA-MB-231, оскільки 1) саме ця лінія продемонструвала значне підвищення рівня TTP після обробки DXR; 2) ці клітини є моделлю тричі-негативного РМЗ, для якого DXR є однією з основних терапевтичних ліній, тому вивчення його впливу на морфологію та рухливість даних клітин може розширити наше розуміння механізмів терапевтичної дії цього препарату.

3.5.1. Вивчення впливу DXR на морфологію клітин. Для вивчення впливу DXR на морфологію клітини обробляли за таким самим протоколом, як і в розділі 2.2, результати дослідження представлено на рис. 3.22 та 3.23. Як видно з рисунків, DXR значно впливав на морфологію клітин. Так, оброблені клітини значно збільшувалися у розмірі, а також набувають більш округлої форми порівняно з інтактними клітинами. Цікаво, що найбільші зміни загальної площі (збільшення у 3,7 разів) спостерігали не за найвищої дози доксорубіцину, а після обробки 0,1 μM . Спостережуваний ефект також супроводжувався різким збільшенням кількості актину на клітину (інтегрована кількість F-актину, рис. 3.23 а), а також кількості філаментів на клітину (рис. 3.23 б) що підтримує результати, отримані нами у попередньому розділі, та підтверджує здатність DXR прямо або опосередковано призводити до змін в організації цитоскелету, ймовірно, шляхом індукції експресії

цитоскелет-асоційованих генів та, можливо, через підвищення стабільності їх протеїнових продуктів. При цьому, при подальшому підвищенні концентрації DXR спостерігали значуще збільшення товщини та довжини актинових філаментів, що, ймовірно, відображає їх галуження та може бути пов'язано із підвищеними рівнями мРНК *CTTN* та *SH3PXD2B*, оскільки їх білкові продукти беруть пряму участь в цьому процесі.

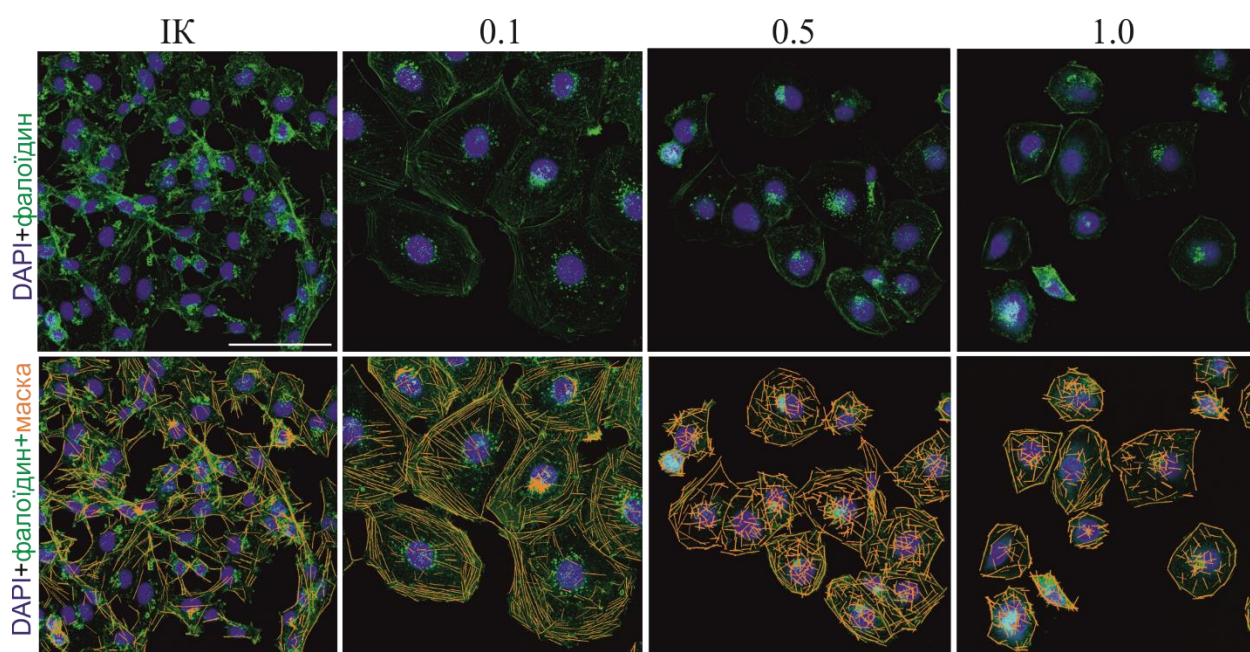


Рис. 3.22. Репрезентативні зображення клітин лінії MDA-MB-231 після обробки DXR. Верхня панель – типовий вигляд клітин та будова актинового цитоскелету, нижня панель – типовий вигляд клітин з накладеною маскою філаментів. Ядра візуалізовані DAPI, актинові філаменти – флуоресцентно-міченим фалоїдином-647 (тут візуалізовано зеленим), маску філаментів позначено оранжевим. Масштаб – 100 μm . 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM ; ІК – інтактні клітини

Поряд з тим, при збільшенні концентрації DXR клітини демонстрували тенденцію до зменшення розміру порівняно із клітинами, обробленими сублетальною дозою DXR, хоча загалом їх площа була все ще більшою за таку,

що спостерігали у контрольних клітин. Одночасне зменшення розміру та потовщення і подовження актинових філаментів порівняно із клітинами, що отримували сублетальну дозу, може свідчити про нездатність клітин до ефективної динамічної реорганізації цитоскелету внаслідок порушення функціонування сигнальних каскадів за токсичної дози DXR.

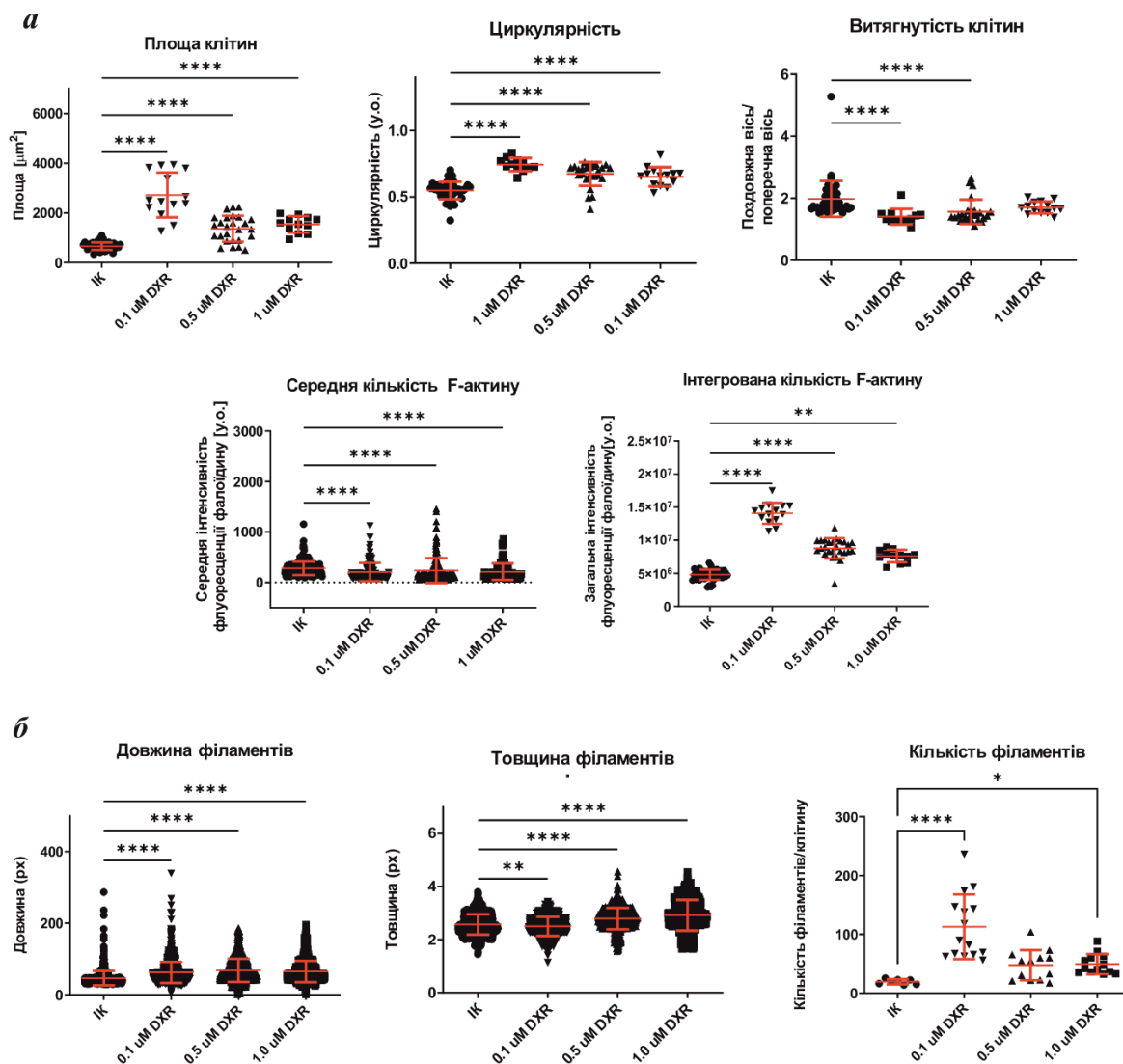


Рис. 3.23. Морфологічні характеристики клітин (*a*) та актинових філаментів (*б*), проаналізовані за допомогою програмного забезпечення ImageJ, (n=10). 0,1, 0,5, 1,0 μM DXR – концентрації DXR, μM ; IK – інтактні клітини. Гістограми відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ (за ANOVA Краскела-Уоліса)

3.5.2. Вивчення впливу DXR на рухливість клітин. Аналіз рухливості показав, що DXR призводить до значного зменшення швидкості клітин, а також зменшує їх здатність до направленого руху вже із найменшої концентрації, та такий ефект є дозозалежним (рис. 3.24). При цьому показник переміщення клітин (пройдена дистанція) при обробці сублетальною дозою 0,1 μM не відрізнявся від контролю, і починав знижуватися лише після обробки токсичними дозами.

Різниця у фенотипах, що спостерігалися у клітин, оброблених різними дозами доксорубцину, ймовірно, є наслідком різних сигнальних каскадів, що превалювали під час дії певної концентрації. Зміни в морфології та рухливості, що спостерігалися під час обробки дозою 0,1 μM , ймовірно, були викликані в основному безпосередньо DXR, оскільки ця доза не призводила до масової загибелі клітин (тест на життєздатність клітин показав 94% життєздатності після 48 годин інкубації, рис. 3.14). Проте при концентраціях 0,5 та 1 μM спостерігалися апоптичні явища, які, ймовірно, сприяли зниженню рухливості.

Отже, в даному підрозділі нами показано, що обробка DXR значно впливало на рухливість клітин, що, ймовірно, пов'язано з підвищенням рівнів TTP та CTTN, а також з апоптичними явищами у випадку обробки токсичними концентраціями. Результати, отримані в даному підрозділі, узгоджуються із результатами підрозділу 3.4: обробка 0,1 μM DXR призводила до збільшення як розміру клітин, так і кількості і довжини актинових філаментів, але не призводила до дефектів у здатності клітин до переміщення, тобто за цієї концентрації функція цитоскелету в контексті рухливості не порушувалася, хоч морфологічно він зазнавав змін. Але за токсичних концентрацій 0,5 та 1 μM морфологічно спостерігали значні зміни в товщині та довжині філаментів, що свідчить про дефекти полімерізації актину: ймовірно, підвищення рівня CTTN призводило до ініціації галуження філаментів, що морфологічно проявлялося в їх потовщенні та порушеннях рухової функції клітин.

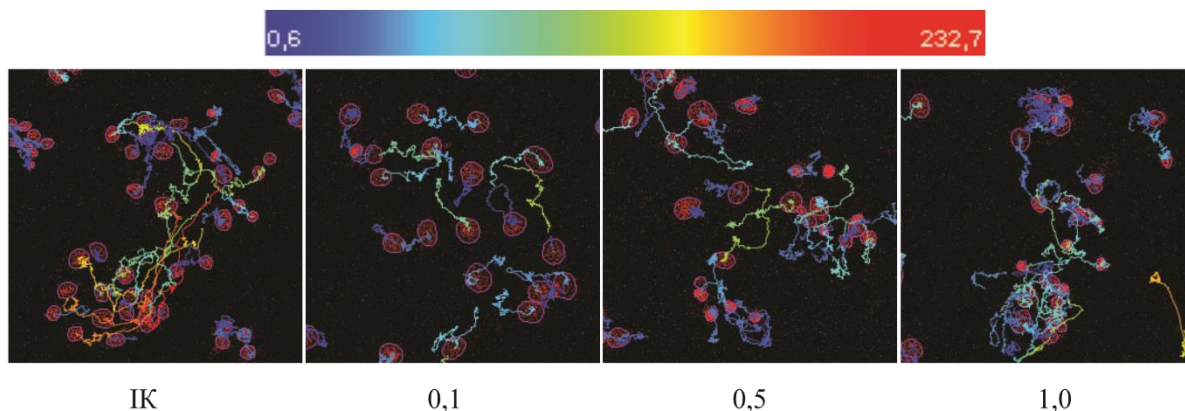
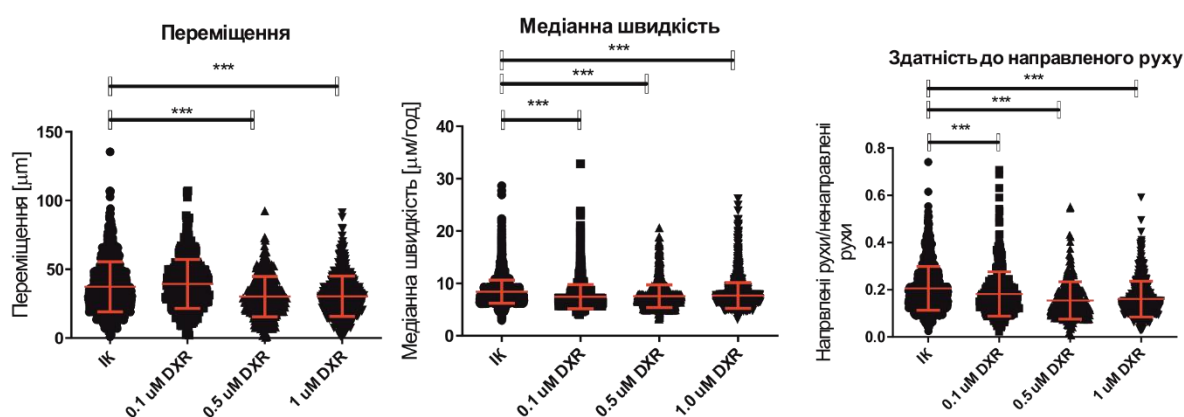
a*б*

Рис. 3.24. Аналіз рухливості клітин, що оброблялися DXR, $n=14$. *a* – репрезентативні зображення ($400 \times 400 \mu\text{m}$), що ілюструють траєкторії клітин; *б* – характеристика здатності клітин до переміщення в цілому, швидкості їх руху та здатності до направленої руху. Колір треків ілюструє пройденої відстані відповідно до кольорової калібрувальної шкали над зображеннями. Треки клітин, що пройшли більше $150 \mu\text{m}$, забарвлені червоним. Ядра забарвлені червоним (SiR-DNA). 0,1, 0,5, 1,0 – концентрації DXR, μM ; IK – інтактні клітини. Графіки відображають середнє $\pm$ стандартне відхилення. *** $p < 0.001$ (за ANOVA для «Переміщення» та ANOVA Краскела-Уоліса для інших)

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

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

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Незважаючи на численні дослідження ролі TTP в інгібуванні канцерогенезу та інвазивності наше розуміння його впливу на механізми клітинної рухливості та інвазійного потенціалу і досі залишається обмеженим. В даному дослідженні нами було поставлено запитання чи може TTP впливати на компоненти цитоскелету, що залучені як до міграції, так і до інвазії, серед яких фактори нуклеації актину N-WASP (*WASP*) та кортактин (*CTTN*), WIP (*WIPF1*), а також скафолдні протеїни TKS4 та TKS5 (*SH3PXD2B* та *SH3PXD2A*, відповідно).

Наші дослідження показали, що інвазивні клітини MDA-MB-231 із стабільною надекспресією TTP демонстрували майже вдвічі знижений рівень мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, що добре пояснює значне зниження рухливості та інвазійного потенціалу цих клітин, а також підвищений в 1,3 рази рівень мРНК *SH3PXD2B*. Ми вважаємо, що виявлений фенотип (зниження рухливості та здатності до направленого руху та інвазії) був спричинений значним зниженням здатності клітин до ефективної полімеризації актину. Відомо, що для полімеризації актину необхідний комплекс Arp2/3, який сам по собі є слабким фактором нуклеації, але його пряма взаємодія з кортактином значно підвищує активність цього комплексу і врешті призводить до ефективної полімеризації і утворення фібрил (250). Раніше Вгусе та колеги спостерігали зниження здатності до міграції та інвазії у клітинах із зниженим рівнем кортактину: такі клітини демонстрували селективний дефект у стабільності ламеліподій та зменшенні кількості вільних «+»-кінців (англ *barbed ends*) актинових фібрил (251). В даному дослідженні разом із зниженням рівня *CTTN* ми виявили зменшення рівнів F-актину та розгалужених філаментів, а також зменшення кількості ламеліподій у клітинах з надекспресією TTP порівняно із

клітинами дикого типу. Оскільки кортактин є необхідним для галуження філаментів, зниження рівня його мРНК, ймовірно, вплинуло на описаний фенотип (252).

Цікаво, що в екТТР клітинах ми спостерігали появу великої кількості F-актину в кортикальній зоні клітинної мембрани, але одночасно з цим і значне зменшення кількості актинових фібрил, особливо в перинуклеарному просторі. Відомо, що ТТР відіграє значну роль в організації ковпачків кортикального актину (англ. cortical actin caps) в мишачих ооцитах, що разом із нашими даними вказує на його участь в процесах просторової організації актинових філаментів (252). Крім того, хоча середня кількість F-актину в екТТР клітинах збільшувалася, інтегрована його кількість була меншою за таку в клітинах дикого типу, що може відображати як менший розмір клітин, так і зниження здатності до полімеризації актину. Подібні морфологічні особливості були описані в клітинах, оброблених цитохалазином Б – інгібітором полімеризації актину, що підтримує нашу гіпотезу щодо порушень процесів полімеризації (253,254). Зменшення розміру екТТР клітин також можна пояснити значним зменшенням кількості ламеліподій порівняно із клітинами дикого типу, хоча обидві клітинні лінії демонстрували типову для клітин MDA-MB-231 форму (255).

Протеїни родини TKS, як і кортактин, являють собою важливі ланки як в процесах реорганізації актинових філаментів, так і в утворенні інвадоподій: Як і кортактин, вони беруть участь в сигнальних каскадах EGFR, що регулює в тому числі динаміку актинових філаментів (256). TKS5 є ключовим скафолдним протеїном, що локалізується в інвадоподіях і є критично необхідним для їх функціонування, оскільки його пряма взаємодія із кортактином та N-WASP регулює полімеризацію актину, формування мембранних протрузій та секрецію матричних металопротеїназ в сайтах утворення інвадоподій (257,258). Зниження експресії *SH3PXD2A* в екТТР клітинах корелювало із майже повною втратою здатності до інвазії. Раніше було описано, що зменшення кількості TKS5 може призводити до нездатності

клітин формувати інвадоподії і подосоми, що в результаті призводило до зниження здатності до міграції та інвазії та підтримує отримані нами результати (58). Крім того, оскільки TKS5 необхідний для сигнальної трансдукції та заякорення актинових філаментів у клітинну мембрану зменшення розміру екТТР клітин також могло бути наслідком неефективних спроб прикріпити філаменти до мембрани і утворити контакти із поверхнею, що є необхідною умовою для набуття клітиною тієї чи іншої форми в умовах 2D культури.

TKS4 – ще один скафолдний протеїн, залучений до формування супрамолекулярних комплексів під час ремоделювання актинових філаментів. Наші дослідження показали, що кількість його мРНК в екТТР клітинах збільшується в 1,3 рази. Хоча велика кількість досліджень і пов'язує TKS4 з активним канцерогенезом, на сьогодні немає консолідованої думки щодо його впливу на здатність клітин до міграції. Так, Vogel та колеги показали, що в оброблених EGF клітинах TKS4 асоційований з EGFR, й нокдаун TKS4 призводить до значного зниження міграції та інвазії клітин лінії HeLa, що свідчить про його сприяння міграції та інвазії (54). Інше дослідження показало, що в первинній культурі ендотелію пуповинної вени людини відсутність TKS4 призвела до зниження рухливості (259). Ще одне дослідження показало, що нокдаун TKS4 в клітинах колоректального раку призводив до посилення міграції та інвазії, а також сприяв EMT (260,261). На нашу думку, нокаут та нокдаун TKS4 може мати різні ефекти на клітинну рухливість, а також може залежати від типу клітин. Крім того, TKS4 має дві ізоформи, TKS4 та TKS4b, співвідношення кількості яких також може впливати на фенотип. У даному дослідженні ми визначали лише загальний рівень експресії *SH3PXD2B* та показали, що його кількість достовірно підвищується в екТТР клітинах. Проте, ми не можемо із впевненістю сказати, чи це підвищення впливало на отриманий фенотип. Зважаючи на описані вище дослідження колег ми вважаємо, що необхідні подальші дослідження для детального вивчення ролі

TKS4 в міграції та інвазії, а також з'ясування чи ці ефекти є специфічними для певних типів клітин або залежать від диференціальної експресії його ізоформ.

TPP активно досліджується як супресор пухлин, і часто його високий рівень, особливо рівень мРНК, вважається позитивним прогностичним маркером для багатьох злоякісних новоутворень, оскільки як його зниження, так і функціональні дефекти часто асоційовані із прогресуванням пухлин та несприятливим прогнозом щодо виживаності (144,222,262). Відомо, що рівень *ZFP36* значно знижений в багатьох пухлинах, в тому числі РМЗ, і рівень його експресії обернено корелює із агресивністю пухлини та її метастатичним потенціалом (139,263). Пацієнти з низьким рівнем експресії *ZFP36* демонстрували гірші показники виживаності та більш агресивні пухлини, внаслідок чого його розглядають як потенційний позитивний прогностичний маркер РМЗ (264). Проведений нами аналіз бази даних GEPIA щодо виживаності когорт пацієнтів з високим та низьким рівнем експресії *ZFP36* показав, що якщо розглядати загальну тенденцію виживаності без розділення на субтипи, то дійсно когорта пацієнтів із високим *ZFP36* мала значно вищі показники виживаності порівняно із когортою з низьким *ZFP36*. Проте, подальше розділення цих когорт по субтипах виявило, що залежно від субтипу високий *ZFP36* може корелювати як зі сприятливим, так і з несприятливим прогнозом, що свідчить про неможливість використання високої експресії *ZFP36* як виключно позитивного прогностичного маркера.

Як згадувалося раніше, пухлини молочної залози поділяють на 4 основні групи в залежності від патоморфологічних характеристик та патернів експресії специфічних маркерів. Зазвичай молекулярні субтипи діагностують використовуючи інформацію щодо наявності або відсутності експресії естрогенового рецептору (ЕР), прогестеронового рецептору (ПР) та експресії HER2/neu рецептору, а подальший прогноз і терапевтична стратегія базуються на цій класифікації. Тим не менш, десятиліття досліджень вказують на існування значно більшої кількості субтипів навіть в рамках основних груп, вказуючи на те, що один і той самий субтип пухлини в різних пацієнтів може

бути як більш агресивним, так і менш агресивним, залежно від додаткових факторів, що, в свою чергу, може змінювати прогноз і терапевтичну стратегію для кожного окремого пацієнта.

Канцерогенез характеризується зростанням рівнів експресії різноманітних онкогенів і втратою експресії супресорів пухлин, що призводить до неконтрольованого ділення, проліферації і міграції клітин. Отримані нами дані показують, що рівень експресії *ZFP36* значно підвищений у зразках HER2-збагачених пухлин порівняно як з іншими типами пухлин, так і порівняно з прилеглими тканинами. Крім того, чим вищою була кількість HER2, тим вищою була експресія *ZFP36*, що вказує на певний зв'язок між HER2-залежним сигналіngом та експресією *ZFP36*, який виявлено вперше в межах нашого дослідження. З даних літератури відомо, що зв'язування HER2 з лігандом призводить до активації множинних сигнальних каскадів, одним з яких є активація NF-κB (265). Також відомо, що NF-κB активує експресію *ZFP36* в активованих ліпополісахаридом макрофагах шляхом прямого зв'язування з його промотором (266). Зважаючи на це, ми припускаємо, що підвищена активність HER2 (незалежно від того, чи це ампліфікація, чи підвищена активність рецептора) могло призводити до NF-κB-залежного підвищення експресії *ZFP36*, і могло б не тільки пояснити отримані нами результати, а і сприяти подальшому вивченню можливості використовувати високий рівень експресії *ZFP36* як потенційного маркера HER2-збагаченого субтипу РМЗ.

Як згадувалося в огляді літератури, багато досліджень вказують на те, що рівень експресії *ZFP36* часто значно нижчий в тканинах пухлин порівняно із нормальними тканинами. Наші результати показали, що експресія *ZFP36* навпаки значно підвищена порівняно з такою у контрольних тканинах. Такий феномен можна пояснити тим, що тут в якості контролю ми використовували не нормальні тканини, а умовно-здорові прилеглі тканини. В згаданому раніше дослідженні Goddio та колег було проаналізовано рівні експресії *ZFP36* в трьох групах тканин: нормальних, прилеглих та пухлинних (228). Їх дані

показали, що експресія *ZFP36* хоча і була вищою у нормальних тканинах порівняно із пухлинними, найнижчого свого значення досягала саме в прилеглих тканинах, що підтримує отримані нами результати. Відомо, що під час забору матеріалу від пацієнтів гістологічно нормальними вважаються тканини на відстані більше 1 см від краю пухлини. Проте, відносно нещодавні дослідження транскриптому пухлинних, нормальних та прилеглих тканин показали, що останні являють собою унікальний, третій тип тканин, що не схожі ні на пухлинні, ні на нормальні внаслідок унікального мікрооточення (230). Ці дані разом із даними, отримані в рамках нашого дослідження, підкреслюють нагальну необхідність створення нового підходу як до вибору кандидатів в біомаркери, так і до покращення протоколів імуногістохімічних та молекулярно-біологічних підходів в контексті використання релевантних референсних тканин.

Висока гетерогенність пухлин РМЗ зумовила появу значної кількості протоколів лікування, які відповідають особливостям різних субтипів. Так, гормональна терапія успішно застосовується для рецептор-позитивного люмінального А типу, але не є ефективною для тричі-негативного внаслідок відсутності в цих пухлинах гормональних рецепторів. Крім того, з цієї ж причини ТНРМЗ є нечутливим і до антитіл та інгібіторів HER2-рецептора, і єдиним терапевтичним підходом, схваленим Управлінням продовольства та медикаментів (FDA, Food and Drug Administration) є хіміотерапевтичні препарати, зокрема, DXR (267). Як і інші хіміотерапевтичні препарати, DXR є високотоксичною сполукою, дія якої направлена на знищення клітин із високою проліферативною активністю та яка має низку побічних ефектів, а отже дослідження його впливу на патофізіологічні процеси має не лише фундаментальну, а і високу прикладну цінність. DXR-зумовлений генотоксичний стрес є добре описаним явищем, проте його вплив на транскрипційний ландшафт клітини досліджується в основному в розрізі його високою кардіотоксичності, адже це накладає значні обмеження на гранично допустиму дозу, яку може отримати пацієнт (243,247). Проте, на сьогодні

даних про те, як DXR впливає на цитоскелет-асоційовані гени або *ZFP36*, недостатньо. Декілька досліджень вивчали вплив DXR на експресію *ZFP36* в тому числі в клітинах MCF7 та MDA-MB-231, проте використані в них концентрації (від 1,5 до 5 μM) перевищували C_{pp} , що спостерігаються *in vivo* (129,234). Крім того, час інкубації становив лише 24 години, що разом могло призводити до швидкої активації апоптозу і неможливості спостерігати інші фізіологічні реакції внаслідок високого токсичного навантаження на клітини. В даному дослідженні ми використовували клінічно релевантні концентрації (від 0,1 до 1,0 μM) з метою якомога більш коректного дослідження потенційних ефектів DXR *in vivo*. Крім того, час інкубації було подовжено до 48 годин. На нашу думку, одночасне зниження концентрації і подовження інкубації краще відповідає умовам *in vivo* оскільки показано, що доксорубіцин абсорбується та накопичується тканинами (268–270).

Наші результати показали значні зміни експресії *ZFP36* як на рівні мРНК, так і на рівні білкового продукту, після обробки DXR клітинної моделі тричі-негативного РМЗ, що сягало 15-ти кратного збільшення за концентрації 1,0 μM . При цьому, клітинна модель люмінального А РМЗ хоча також демонструвала підвищення рівня ТТР, проте максимальний рівень був лише приблизно в 4 рази більший у порівнянні з інтактними клітинами. Цікаво, що кореляція рівнів мРНК та білкового продукту відрізнялася: клітини MDA-MB-231 демонстрували значну позитивну кореляцію, що залежала від дози, в той час як MCF7 за концентрації 1,0 μM демонстрували підвищення рівня мРНК, але зниження рівня білкового продукту.

Оскільки велика кількість досліджень пропонує використовувати високий рівень ТТР як позитивний прогностичний маркер у багатьох типах раку, наші результати можуть накласти на це певні обмеження. Так, якщо DXR індукує ТТР також і *in vivo*, то в такому разі буде важко сказати чи високий рівень ТТР відображає органічні процеси та свідчить про задовільний фізіологічний стан пацієнта, чи це тимчасове явище, викликане лікуванням. Зважаючи на p53-залежний механізм індукції ТТР, описаний Lee et al. (129),

можливо ТТР може бути індукований і іншими хіміотерапевтичними агентами, що призводять до пошкодження ДНК: цисплатином, його похідними та метатрексатом. Крім того, відомо, що DXR абсорбується тканинами, і на разі невідомо, як довго після введення може тривати ефект індукції ТТР. У зв'язку із цим ми вважаємо, що необхідні подальші дослідження щодо того, чи спостерігається подібний феномен *in vivo*, чи є він специфічним для ТНРМЗ, як довго він може тривати та чи впливає він на прогностичну цінність ТТР, оскільки на нашу думку отримані нами результати та їх подальше продовження може бути корисним для розробки релевантних методів персоналізованої медицини та діагностики.

Ми також вивчали вплив DXR на рівні мРНК таргетних цитоскелет-асоційованих генів. Так, і в клітинах MCF7, і в клітинах MDA-MB-231 DXR призвів до загального підвищення рівнів таргетних транскриптів, хоча лінія MCF7 демонструвала набагато слабшу відповідь порівняно із MDA-MB-231 як в контексті індукції ТТР, так і в контексті змін експресії таргетних генів. У лінії MCF7 статистично значуще збільшення рівнів мРНК спостерігали лише для *CTTN* за концентрації 0.1 μM , хоча інші гени також виявляли певну тенденцію до зростання експресії. Клітини ж лінії MDA-MB-231 демонстрували стабільне підвищення експресії *CTTN* вже з найменшої дози, а також підвищення рівнів мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, та *WIPF1*.

Такі розбіжності в експресії таргетних генів можна пояснити тим, що DXR активує та дисрегулює велику кількість сигнальних шляхів. DXR-індуковане пошкодження ДНК призводить до активації АТМ-кінази, що має численні мішені, і клітинна відповідь в контексті просторово-часових змін в організації актинових філаментів залежить від динамічної взаємодії між активованими сигнальними шляхами. Більше того, ефекти DXR значно залежать від p53-статусу клітини і призводять до TNF α -залежної активації NF- κ B (188). Так, показано, що обробка клітин MDA-MB-231 DXR призводила до NF- κ B-індукованої експресії деяких генів, асоційованих з інвазією, метастазуванням та резистентністю до хіміотерапії. Такий саме патерн

спостерігали і в інших клітинних лініях та зразках РМЗ, а поновлення функції р53 призводило до зміни в транскрипційних ландшафтах, спричинених DXR (189). Також показано, що DXR-індукований NF-κB сприяє міграції та інвазії клітин РМЗ через індукцію CXCR4 (190). При цьому нещодавні дослідження виявили, що хоча доксорубіцин і посилює сигналінг від NF-κB і сприяє утворенню його активних комплексів, ці комплекси мають значні дефекти фосфорилування та ацетилювання, що призводить до супресії конститутивної та цитокін-асоційованої експресії NF-κB-залежних генів (191). Наведені нами дослідження підтверджують, що подальші дослідження транскрипційних профілів необхідні для розуміння тонких механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів, а також для з'ясування механізмів регуляції клітинної відповіді на них.

Ми також досліджували вплив DXR на морфологію та рухливість клітин. Наші результати показали, що DXR знижував рухливість, починаючи з концентрації 0,5 μM, а також призводив до значних змін у морфології актинових фібрил. На сьогодні немає також і консолідованої думки щодо впливу DXR на рухливість клітин: деякі дослідження стверджують, що він пригнічує рухливість(271–273), тоді як інші показують її посилення (271,274,275). Ми вважаємо, що такі диференціальні ефекти залежать від індивідуальної чутливості клітин, використаних в тому чи іншому дослідженні. Як ми вже згадували раніше, чутливість клітин однієї і тієї самої лінії до тих чи інших сполук може значно відрізнятися між лабораторіями, а отже при проведенні досліджень важливим є визначення IC₅₀. Багато досліджень, що показали активуючий ефект DXR на клітинну рухливість використовували сублетальну дозу, що зазвичай лежить в межах від 25% до 50% значення IC₅₀ конкретної культури. В нашому дослідженні показник IC₅₀ для лінії MDA-MB-231 складав 0.19 μM, що відповідає 50% IC₅₀. Перевищення цієї дози призводило до інгібування рухливості та значних патологічних змін у морфології філаментів, в той час як сублетальна доза хоча і спричиняла деякі зміни в морфології цитоскелету та знижувала медіанну швидкість клітин,

проте не обмежувала пройдену ними дистанцію. Деякі з досліджень не подають значень IC_{50} для використаних ними культур, ускладнюючи аналіз літературних даних, а отже на разі важко сказати, чи інгібуючий вплив на рухливість є наслідком варіабельності фізіологічних процесів, чи різної чутливості до препарату в різних дослідженнях.

DXR також впливав на морфологію, особливо за найнижчої концентрації 0.1 μM . В літературі описано, що DXR впливає на полімеризацію актину, а саме зменшує розмір фібрил, їх ріст та кількість стабільних фібрил (276,277). Крім того, наявні дані про те, що він також індукує формування гігантських клітин (31). Також показано, що DXR індукує кортикальну локалізацію F-актину, асоційовану з кортикальною транслокацією p-MLC (phospho-myosin light chain 2, фосфорильований легкий ланцюг міозину 2) з центральних фібрил (235). Ми також спостерігали значне збільшення загальної площі клітин, хоча неочікувано найбільший ефект був описаний за найменшої концентрації. Ми вважаємо, що різниця між фенотипами за різних концентрацій DXR обумовлена різницею в цитофізіології за дії різних доз DXR.

Отже, в даному дисертаційному дослідженні нами проаналізовано можливі шляхи пост-транскрипційної регуляції експресії деяких генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелету, міграції, та інвазії. Серед виявлених регуляторних елементів для подальшої роботи було обрано AU-збагачені ділянки, що є сайтами зв'язування для РНК-зв'язувального протеїну TTP та показано, що TTP демонструє високу ймовірність зв'язування із асоційованими із інвазією *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL*. Нами вперше показано, що конститутивна ектопічна експресія TTP у високоінвазивних клітинах лінії MDA-MB-231 призводила до значного зменшення рівнів *SH3PXD2A*, та *CTTN* та підвищення рівня мРНК *SH3PXD2B*. Крім того, вперше прямо за допомогою відслідковування окремих клітин показано зниження здатності до направлених рухів та інвазії, зниження рухливості клітин та патологічні зміни морфології актинових філаментів. Ці

дані розкривають перспективність досліджень ТТР як потенційного прямого чи опосередкованого регулятора цитоскелету. Також ми вперше докладно описуємо зміни морфології актинових фібрил під дією доксорубіцину в клітинах MDA-MB-231 та вперше досліджуємо його вплив на експресію цитоскелет-асоційованих генів.

Нами вперше показано, що клінічно релевантні концентрації доксорубіцину призводять до індукції ТТР на моделях люмінального А та тричі-негативного раку молочної залози людини, що на сьогодні обмежує його потенційне використання як прогностичного маркера РМЗ. Крім того, ми ставимо під сумнів використання високої експресії *ZFP36* як загального позитивного маркера виживаності пацієнтів, проте пропонуємо використовувати його як додатковий діагностичний маркер HER2-збагаченого субтипу.

ВИСНОВКИ

В даному дисертаційному дослідженні було проаналізовано можливі шляхи посттранскрипційної регуляції експресії деяких генів, залучених до реорганізації актинового цитоскелету, а також вивчено роль РНК-зв'язувального протеїну ТТР в перебігу раку молочної залози людини в контексті клітинної рухливості та інвазії:

1. Показано, що більшість з проаналізованих транскрипційних ізоформ цитоскелет-асоційованих генів, включених до даного дослідження, мають спільні регуляторні елементи, а саме: сайти зв'язування протеїнів Musashi, K-box та AU-збагачені елементи, а також можуть що *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* можуть бути таргетними мРНК РНК-зв'язувального протеїну ТТР.
2. З'ясовано, що надекспресія ТТР значно знижує рівні мРНК *SH3PXD2A* та *CTTN*, підвищує рівень мРНК *SH3PXD2B*, але не впливає на рівні мРНК *WIPF1* та *WASL*.
3. З'ясовано, що надекспресія ТТР призводить до значного зменшення площі клітин, кількості полімеризованих філаментів та збільшення їх товщини в клітинах лінії MDA-MB-231 з ектопічною експресією ТТР, а також до значного зменшення їх рухливості, здатності до направлених рухів та інвазії.
4. Виявлено, що рівень експресії *ZFP36* значно підвищений в зразках пухлин молочної залози людини HER2-збагаченого субтипу порівняно із іншими субтипами, а також корелює із рівнем ампліфікації HER2; запропоновано використання високого рівня *ZFP36* як біомаркера HER2-збагаченого РМЗ різних субтипів.
5. Виявлено, що доксорубіцин індукує експресію *ZFP36* як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну на моделях люмінального А та тричі-негативного

PM3 та поставлено під сумнів його діагностичну цінність як біомаркера в когортах пацієнтів, що отримували доксорубіцин.

6. Виявлено, що доксорубіцин підвищує або не впливає на рівні мРНК *SH3PXD2A*, *SH3PXD2B*, *CTTN*, *WIPF1* та *WASL* на моделях люмінального А та тричі-негативного РМЗ, а також змінює площу та форму клітин тричі-негативного РМЗ, ширину, довжину та кількість актинових філаментів цих клітин, їх рухливість та здатність до направлених рухів, а направленість ефекту залежить від концентрації.
7. Показано, що ТТР може прямо або опосередковано знижувати здатність клітин моделі тричі-негативного раку молочної залози до рухливості та інвазивності. Поставлено під сумнів використання високої експресії *ZFP36* як прогностичного біомаркер РМЗ, оскільки він індукується доксорубіцином в моделях люмінального А та тричі-негативного РМЗ, проте висока експресія *ZFP36* має потенціал використання як діагностичного біомаркера HER2-збагаченого типу РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2024**, 74(3), 229–263. doi:10.3322/caac.21834.
2. Bulletin of National Cancer Registry of Ukraine. *National Institute of Cancer of Ukraine* **2024**, 25(25).
3. Gerstberger, S.; Jiang, Q.; Ganesh, K. Metastasis. *Cell* **2023**, 186(8), 1564–1579. doi:10.1016/j.cell.2023.03.003.
4. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
5. Murphy, D. A.; Courtneidge, S. A. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**, 12(7), 413–426. doi:10.1038/nrm3141.
6. Carpenter, C. L. Actin cytoskeleton and cell signaling. *Critical care medicine* **2000**, 28(4 Suppl), N94-9. doi:10.1097/00003246-200004001-00011.
7. Saini, Y.; Chen, J.; Patial, S. The Tristetraprolin Family of RNA-Binding Proteins in Cancer: Progress and Future Prospects. *Cancers* **2020**, 12(6), 1539. doi:10.3390/cancers12061539.
8. Lai, W. S.; Carballo, E.; Strum, J. R.; Kennington, E. A.; Phillips, R. S.; Blackshear, P. J. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology* **1999**, 19(6), 4311–4323. doi:10.1128/MCB.19.6.4311.
9. Park, J.-M.; Lee, T.-H.; Kang, T.-H. Roles of Tristetraprolin in Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19(11). doi:10.3390/ijms19113384.
10. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. Anthracyclines:

Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews* **2004**, 56(2), 185–229. doi:10.1124/pr.56.2.6.

11. Li, Q.; Xia, C.; Li, H.; Yan, X.; Yang, F.; Cao, M.; et al. Disparities in 36 cancers across 185 countries: secondary analysis of global cancer statistics. *Frontiers of medicine* **2024**. doi:10.1007/s11684-024-1058-6.

12. Tsang, J. Y. S.; Tse, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances in anatomic pathology* **2020**, 27(1), 27–35. doi:10.1097/PAP.0000000000000232.

13. Lam, S. W.; Jimenez, C. R.; Boven, E. Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer treatment reviews* **2014**, 40(1), 129–138. doi:10.1016/j.ctrv.2013.06.006.

14. Dai, X.; Xiang, L.; Li, T.; Bai, Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *Journal of Cancer* **2016**, 7(10), 1281–1294. doi:10.7150/jca.13141.

15. Tang, Y.; Wang, Y.; Kiani, M. F.; Wang, B. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical breast cancer* **2016**, 16(5), 335–343. doi:10.1016/j.clbc.2016.05.012.

16. Kropyvko, S. V.; Tsyba, L.; Novokhatska, V.; Nemesh, Y. M.; Syvak, L.; Tarasenko, T. Y.; et al. Expression of ITSN2 and TKS5 in different subtypes of breast cancer tumors. *Biopolymers and Cell* **2019**, 35(1), 21–29. doi:10.7124/bc.00098F.

17. Li, D.; Lai, W.; Fan, D.; Fang, Q. Protein biomarkers in breast cancer-derived extracellular vesicles for use in liquid biopsies. *American journal of physiology. Cell physiology* **2021**, 321(5), C779–C797. doi:10.1152/ajpcell.00048.2021.

18. Eroles, P.; Bosch, A.; Pérez-Fidalgo, J. A.; Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews* **2012**, 38(6), 698–707. doi:10.1016/j.ctrv.2011.11.005.

19. Fusco, N.; Geyer, F. C.; De Filippo, M. R.; Martelotto, L. G.; Ng, C. K. Y.; Piscuoglio, S.; et al. Genetic events in the progression of adenoid cystic carcinoma of the breast to high-grade triple-negative breast cancer. *Modern pathology: an*

official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc **2016**, 29(11), 1292–1305. doi:10.1038/modpathol.2016.134.

20. Schmidt, M.; Thomssen, C.; Untch, M. Intrinsic Subtypes of Primary Breast Cancer--Gene Expression Analysis. *Oncology research and treatment* **2016**, 39(3), 102–110. doi:10.1159/000444409.

21. Pourteimoor, V.; Mohammadi-Yeganeh, S.; Paryan, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2016**, 37(11), 14479–14499. doi:10.1007/s13277-016-5349-7.

22. Kang, B.; Lee, J.; Jung, J. H.; Kim, W. W.; Keum, H.; Park, H. Y. Differences in clinical outcomes between HER2-negative and HER2-positive luminal B breast cancer. *Medicine* **2023**, 102(34), e34772. doi:10.1097/MD.00000000000034772.

23. Leidy, J.; Khan, A.; Kandil, D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Archives of pathology & laboratory medicine* **2014**, 138(1), 37–43. doi:10.5858/arpa.2012-0439-RA.

24. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery* **2022**, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

25. Wang, B.; Kohli, J.; Demaria, M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in cancer* **2020**, 6(10), 838–857. doi:10.1016/j.trecan.2020.05.004.

26. Prasanna, P. G.; Citrin, D. E.; Hildesheim, J.; Ahmed, M. M.; Venkatachalam, S.; Riscuta, G.; et al. Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **2021**, 113(10), 1285–1298. doi:10.1093/jnci/djab064.

27. Borriello, L.; Condeelis, J.; Entenberg, D.; Oktay, M. H. Breast Cancer Cell Re-Dissemination from Lung Metastases-A Mechanism for Enhancing Metastatic Burden. *Journal of clinical medicine* **2021**, 10(11). doi:10.3390/jcm10112340.

28. Coelho Neto, J.; Mesquita, O. N. Living cell motility. *Philosophical*

- transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **2008**, 366(1864), 319–328. doi:10.1098/rsta.2007.2091.
29. Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2018**, 10(1). doi:10.1101/cshperspect.a018267.
30. Lee, J.; Veatch, S. L.; Baird, B.; Holowka, D. Molecular mechanisms of spontaneous and directed mast cell motility. *Journal of leukocyte biology* **2012**, 92(5), 1029–1041. doi:10.1189/jlb.0212091.
31. Eddy, R. J.; Weidmann, M. D.; Sharma, V. P.; Condeelis, J. S. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends in cell biology* **2017**, 27(8), 595–607. doi:10.1016/j.tcb.2017.03.003.
32. Fletcher, D. A.; Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **2010**, 463(7280), 485–492. doi:10.1038/nature08908.
33. Merino, F.; Pospich, S.; Raunser, S. Towards a structural understanding of the remodeling of the actin cytoskeleton. *Seminars in cell & developmental biology* **2020**, 102, 51–64. doi:10.1016/j.semcdb.2019.11.018.
34. Hohmann, T.; Dehghani, F. The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **2019**, 8(4). doi:10.3390/cells8040362.
35. Galletta, B. J.; Chuang, D. Y.; Cooper, J. A. Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. *PLoS biology* **2008**, 6(1), e1. doi:10.1371/journal.pbio.0060001.
36. Siton-Mendelson, O.; Bernheim-Groswasser, A. Functional Actin Networks under Construction: The Cooperative Action of Actin Nucleation and Elongation Factors. *Trends in biochemical sciences* **2017**, 42(6), 414–430. doi:10.1016/j.tibs.2017.03.002.
37. Rottner, K.; Faix, J.; Bogdan, S.; Linder, S.; Kerkhoff, E. Actin assembly mechanisms at a glance. *Journal of cell science* **2017**, 130(20), 3427–3435. doi:10.1242/jcs.206433.
38. Chesarone, M. A.; Goode, B. L. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current opinion in cell biology* **2009**, 21(1), 28–37. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.001.

39. Lee, S. H.; Dominguez, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells* **2010**, 29(4), 311–325. doi:10.1007/s10059-010-0053-8.
40. Weaver, A. M.; Karginov, A. V.; Kinley, A. W.; Weed, S. A.; Li, Y.; Parsons, J. T.; et al. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology* **2001**, 11(5), 370–374. doi:10.1016/S0960-9822(01)00098-7.
41. Alekhina, O.; Burstein, E.; Billadeau, D. D. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *Journal of Cell Science* **2017**, 130(14), 2235–2241. doi:10.1242/jcs.199570.
42. Suetsugu, S. Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation: allosteric regulation and multimerization on the membrane. *Seminars in cell & developmental biology* **2013**, 24(4), 267–271. doi:10.1016/j.semcdb.2013.01.006.
43. Helgeson, L. A.; Nolen, B. J. Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *eLife* **2013**, 2, e00884. doi:10.7554/eLife.00884.
44. Rohatgi, R.; Ho, H. Y.; Kirschner, M. W. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *The Journal of cell biology* **2000**, 150(6), 1299–1310. doi:10.1083/jcb.150.6.1299.
45. Antón, I. M.; Jones, G. E. WIP: a multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *European journal of cell biology* **2006**, 85(3–4), 295–304. doi:10.1016/j.ejcb.2005.08.004.
46. García, E.; Jones, G. E.; Machesky, L. M.; Antón, I. M. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *European journal of cell biology* **2012**, 91(11–12), 869–877. doi:10.1016/j.ejcb.2012.06.002.
47. García, E.; Jones, G. E.; Machesky, L. M.; Antón, I. M. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *European Journal of Cell Biology* **2012**, 91(11–12), 869–877. doi:10.1016/j.ejcb.2012.06.002.
48. Ayala, I.; Baldassarre, M.; Giacchetti, G.; Caldieri, G.; Tetè, S.; Luini, A.; et al. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis

- and extracellular matrix degradation. *Journal of Cell Science* **2008**, 121(3), 369–378. doi:10.1242/jcs.008037.
49. Siar, C. H.; Rahman, Z. A. B. A.; Tsujigiwa, H.; Mohamed Om Alblazi, K.; Nagatsuka, H.; Ng, K. H. Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **2016**, 45(8), 591–598. doi:10.1111/jop.12417.
50. Bryce, N. S.; Clark, E. S.; Leysath, J. L.; Currie, J. D.; Webb, D. J.; Weaver, A. M. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current Biology* **2005**, 15(14), 1276–1285. doi:10.1016/j.cub.2005.06.043.
51. Buschman, M. D.; Bromann, P. A.; Cejudo-Martin, P.; Wen, F.; Pass, I.; Courtneidge, S. A. The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation. *Molecular biology of the cell* **2009**, 20(5), 1302–1311. doi:10.1091/mbc.e08-09-0949.
52. Oikawa, T.; Itoh, T.; Takenawa, T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of cell biology* **2008**, 182(1), 157–169. doi:10.1083/jcb.200801042.
53. Lányi, Á.; Baráth, M.; Péterfi, Z.; Bogel, G.; Orient, A.; Simon, T.; et al. The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading. *PloS one* **2011**, 6(8), e23653. doi:10.1371/journal.pone.0023653.
54. Bögel, G.; Gujdár, A.; Geiszt, M.; Lányi, Á.; Fekete, A.; Sipeki, S.; et al. Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration. *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287(37), 31321–31329. doi:10.1074/jbc.M111.324897.
55. Kropyvko, S. V. New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolymers and Cell* **2015**, 31(5), 395–401. doi:10.7124/bc.0008FC.
56. Ben-Chetrit, N.; Chetrit, D.; Russell, R.; Körner, C.; Mancini, M.; Abdul-Hai, A.; et al. Synaptojanin 2 is a druggable mediator of metastasis and the gene is overexpressed and amplified in breast cancer. *Science signaling* **2015**, 8(360), ra7. doi:10.1126/scisignal.2005537.

57. Oser, M.; Mader, C. C.; Gil-Henn, H.; Magalhaes, M.; Bravo-Cordero, J. J.; Koleske, A. J.; et al. Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *Journal of cell science* **2010**, 123(Pt 21), 3662–3673. doi:10.1242/jcs.068163.
58. Blouw, B.; Seals, D. F.; Pass, I.; Diaz, B.; Courtneidge, S. A. A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo. *European journal of cell biology* **2008**, 87(8–9), 555–567. doi:10.1016/j.ejcb.2008.02.008.
59. Belsches, A. P.; Haskell, M. D.; Parsons, S. J. Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **1997**, 2, d501-18. doi:10.2741/a208.
60. Méplan, C.; Johnson, I. T.; Polley, A. C. J.; Cockell, S.; Bradburn, D. M.; Commane, D. M.; et al. Transcriptomics and proteomics show that selenium affects inflammation, cytoskeleton, and cancer pathways in human rectal biopsies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2016**, 30(8), 2812–2825. doi:10.1096/fj.201600251R.
61. Ivanov, A. I.; Le, H. T.; Naydenov, N. G.; Rieder, F. Novel Functions of the Septin Cytoskeleton: Shaping Up Tissue Inflammation and Fibrosis. *The American journal of pathology* **2021**, 191(1), 40–51. doi:10.1016/j.ajpath.2020.09.007.
62. Thomas, T. H.; Advani, A. Inflammation in cardiovascular disease and regulation of the actin cytoskeleton in inflammatory cells: the actin cytoskeleton as a target. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* **2006**, 4(2), 165–182. doi:10.2174/187152506776369926.
63. Martínez-Sánchez, L. D. C.; Ngo, P. A.; Pradhan, R.; Becker, L.-S.; Boehringer, D.; Soteriou, D.; et al. Epithelial RAC1-dependent cytoskeleton dynamics controls cell mechanics, cell shedding and barrier integrity in intestinal inflammation. *Gut* **2023**, 72(2), 275–294. doi:10.1136/gutjnl-2021-325520.
64. Rosanò, L.; Bagnato, A. New insights into the regulation of the actin cytoskeleton dynamics by GPCR/ β -arrestin in cancer invasion and metastasis. *International review of cell and molecular biology* **2019**, 346, 129–155. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.03.002.

65. Olson, M. F.; Sahai, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clinical & experimental metastasis* **2009**, *26*(4), 273–287. doi:10.1007/s10585-008-9174-2.
66. Fife, C. M.; McCarroll, J. A.; Kavallaris, M. Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British journal of pharmacology* **2014**, *171*(24), 5507–5523. doi:10.1111/bph.12704.
67. Wang, E. J.-Y.; Chen, I.-H.; Kuo, B. Y.-T.; Yu, C.-C.; Lai, M.-T.; Lin, J.-T.; et al. Alterations of Cytoskeleton Networks in Cell Fate Determination and Cancer Development. *Biomolecules* **2022**, *12*(12). doi:10.3390/biom12121862.
68. Ciszewski, W. M.; Wawro, M. E.; Sacewicz-Hofman, I.; Sobierajska, K. Cytoskeleton Reorganization in EndMT-The Role in Cancer and Fibrotic Diseases. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22*(21). doi:10.3390/ijms222111607.
69. Courtneidge, S. A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochemical Society transactions* **2012**, *40*(1), 129–132. doi:10.1042/BST20110685.
70. Mardakheh, F. K.; Paul, A.; Kümper, S.; Sadok, A.; Paterson, H.; McCarthy, A.; et al. Global Analysis of mRNA, Translation, and Protein Localization: Local Translation Is a Key Regulator of Cell Protrusions. *Developmental cell* **2015**, *35*(3), 344–357. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.005.
71. Dermit, M.; Dodel, M.; Lee, F. C. Y.; Azman, M. S.; Schwenzer, H.; Jones, J. L.; et al. Subcellular mRNA Localization Regulates Ribosome Biogenesis in Migrating Cells. *Developmental cell* **2020**, *55*(3), 298–313.e10. doi:10.1016/j.devcel.2020.10.006.
72. Hall, A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews* **2009**, *28*(1–2), 5–14. doi:10.1007/s10555-008-9166-3.
73. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2014**, *15*(3), 178–196. doi:10.1038/nrm3758.
74. Yilmaz, M.; Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews* **2009**, *28*(1–2), 15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0.

75. Farache, D.; Antine, S. P.; Lee, A. S. Y. Moonlighting translation factors: multifunctionality drives diverse gene regulation. *Trends in cell biology* **2022**, 32(9), 762–772. doi:10.1016/j.tcb.2022.03.006.
76. Verta, J.-P.; Jacobs, A. The evolutionary significance of post-transcriptional gene regulation. *Heredity*. England March 2024, pp 117–119. doi:10.1038/s41437-024-00674-5.
77. Pope, S. D.; Medzhitov, R. Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular cell* **2018**, 71(3), 389–397. doi:10.1016/j.molcel.2018.07.017.
78. Kurokawa, R.; Rosenfeld, M. G.; Glass, C. K. Transcriptional regulation through noncoding RNAs and epigenetic modifications. *RNA biology* **2009**, 6(3), 233–236. doi:10.4161/rna.6.3.8329.
79. Kilchert, C.; Vasiljeva, L. mRNA quality control goes transcriptional. *Biochemical Society transactions* **2013**, 41(6), 1666–1672. doi:10.1042/BST20130202.
80. Rambout, X.; Dequiedt, F.; Maquat, L. E. Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre-mRNA Splicing. *Chemical reviews* **2018**, 118(8), 4339–4364. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00470.
81. Roux, P. P.; Topisirovic, I. Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation. *Molecular and cellular biology* **2018**, 38(12). doi:10.1128/MCB.00070-18.
82. Kleene, K. C. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenetic and genome research* **2003**, 103(3–4), 217–224. doi:10.1159/000076807.
83. Hwang, M.-S.; Park, J.; Ham, Y.; Lee, I. H.; Chun, K.-H. Roles of Protein Post-Translational Modifications During Adipocyte Senescence. *International journal of biological sciences* **2023**, 19(16), 5245–5256. doi:10.7150/ijbs.86404.
84. Ahearn, I. M.; Haigis, K.; Bar-Sagi, D.; Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**, 13(1), 39–51. doi:10.1038/nrm3255.

85. Helmann, J. D. RNA polymerase: a nexus of gene regulation. *Methods (San Diego, Calif.)*. United States January 2009, pp 1–5. doi:10.1016/j.ymeth.2008.12.001.
86. Vaquerizas, J. M.; Kummerfeld, S. K.; Teichmann, S. A.; Luscombe, N. M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nature reviews. Genetics*. England April 2009, pp 252–263. doi:10.1038/nrg2538.
87. Cao, J.; Luo, Z.; Cheng, Q.; Xu, Q.; Zhang, Y.; Wang, F.; et al. Three-dimensional regulation of transcription. *Protein & cell* **2015**, 6(4), 241–253. doi:10.1007/s13238-015-0135-7.
88. Kelaini, S.; Chan, C.; Cornelius, V. A.; Margariti, A. RNA-Binding Proteins Hold Key Roles in Function, Dysfunction, and Disease. *Biology* **2021**, 10(5). doi:10.3390/biology10050366.
89. Oroz, J.; Laurents, D. V. RNA binding proteins: Diversity from microsurgeons to cowboys. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms* **2019**, 1862(11–12), 194398. doi:10.1016/j.bbagr.2019.06.009.
90. Liu, D.; Luo, X.; Xie, M.; Zhang, T.; Chen, X.; Zhang, B.; et al. HNRNPC downregulation inhibits IL-6/STAT3-mediated HCC metastasis by decreasing HIF1A expression. *Cancer science* **2022**, 113(10), 3347–3361. doi:10.1111/cas.15494.
91. Cao, Y.; Geng, J.; Wang, X.; Meng, Q.; Xu, S.; Lang, Y.; et al. RNA-binding motif protein 10 represses tumor progression through the Wnt/ β -catenin pathway in lung adenocarcinoma. *International journal of biological sciences* **2022**, 18(1), 124–139. doi:10.7150/ijbs.63598.
92. Li, M.; Li, A.-Q.; Zhou, S.-L.; Lv, H.; Wei, P.; Yang, W.-T. RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **2020**, 39(1), 92. doi:10.1186/s13046-020-01587-x.
93. Yong, H.; Zhao, W.; Zhou, X.; Liu, Z.; Tang, Q.; Shi, H.; et al. RNA-Binding Motif 4 (RBM4) Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Human Gastric Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental*

and clinical research **2019**, 25, 4025–4034. doi:10.12659/MSM.914513.

94. Zhang, B.; Babu, K. R.; Lim, C. Y.; Kwok, Z. H.; Li, J.; Zhou, S.; et al. A comprehensive expression landscape of RNA-binding proteins (RBPs) across 16 human cancer types. *RNA biology* **2020**, 17(2), 211–226. doi:10.1080/15476286.2019.1673657.

95. Leung, A. K. L.; Sharp, P. A. Function and localization of microRNAs in mammalian cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **2006**, 71, 29–38. doi:10.1101/sqb.2006.71.049.

96. Yasuda, K.; Kotani, T.; Yamashita, M. A cis-acting element in the coding region of cyclin B1 mRNA couples subcellular localization to translational timing. *Developmental biology* **2013**, 382(2), 517–529. doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.014.

97. Gerstberger, S.; Hafner, M.; Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nature reviews. Genetics*. England December 2014, pp 829–845. doi:10.1038/nrg3813.

98. Sanford, J. R.; Gray, N. K.; Beckmann, K.; Cáceres, J. F. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes & development* **2004**, 18(7), 755–768. doi:10.1101/gad.286404.

99. Zhong, X.-Y.; Wang, P.; Han, J.; Rosenfeld, M. G.; Fu, X.-D. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Molecular cell* **2009**, 35(1), 1–10. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.016.

100. Zhao, Q.; Pavanello, L.; Bartlam, M.; Winkler, G. S. Structure and function of molecular machines involved in deadenylation-dependent 5'-3' mRNA degradation. *Frontiers in genetics* **2023**, 14, 1233842. doi:10.3389/fgene.2023.1233842.

101. Pekovic, F.; Rammelt, C.; Kubíková, J.; Metz, J.; Jeske, M.; Wahle, E. RNA binding proteins Smaug and Cup induce CCR4-NOT-dependent deadenylation of the nanos mRNA in a reconstituted system. *Nucleic acids research* **2023**, 51(8), 3950–3970. doi:10.1093/nar/gkad159.

102. Ban, T.; Zhu, J.-K.; Melcher, K.; Xu, H. E. Structural mechanisms of RNA recognition: sequence-specific and non-specific RNA-binding proteins and the

Cas9-RNA-DNA complex. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2015**, 72(6), 1045–1058. doi:10.1007/s00018-014-1779-9.

103. Corley, M.; Burns, M. C.; Yeo, G. W. How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular cell* **2020**, 78(1), 9–29. doi:10.1016/j.molcel.2020.03.011.

104. Vindry, C.; Vo Ngoc, L.; Kruys, V.; Gueydan, C. RNA-binding protein-mediated post-transcriptional controls of gene expression: integration of molecular mechanisms at the 3' end of mRNAs? *Biochemical pharmacology* **2014**, 89(4), 431–440. doi:10.1016/j.bcp.2014.04.003.

105. Xie, X.; Lu, J.; Kulbokas, E. J.; Golub, T. R.; Mootha, V.; Lindblad-Toh, K.; et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **2005**, 434(7031), 338–345. doi:10.1038/nature03441.

106. Xu, N.; Chen, C. Y.; Shyu, A. B. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Molecular and cellular biology* **1997**, 17(8), 4611–4621. doi:10.1128/MCB.17.8.4611.

107. Ghigna, C.; Riva, S.; Biamonti, G. Alternative splicing of tumor suppressors and oncogenes. *Cancer treatment and research* **2013**, 158, 95–117. doi:10.1007/978-3-642-31659-3_4.

108. Hausburg, M. A.; Doles, J. D.; Clement, S. L.; Cadwallader, A. B.; Hall, M. N.; Blackshear, P. J.; et al. Post-transcriptional regulation of satellite cell quiescence by TTP-mediated mRNA decay. *eLife* **2015**, 4, e03390. doi:10.7554/eLife.03390.

109. Lai, W. S.; Carballo, E.; Thorn, J. M.; Kennington, E. A.; Blackshear, P. J. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *The Journal of biological chemistry* **2000**, 275(23), 17827–17837. doi:10.1074/jbc.M001696200.

110. Peng, S. S.; Chen, C. Y.; Xu, N.; Shyu, A. B. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *The EMBO journal* **1998**, 17(12),

3461–3470. doi:10.1093/emboj/17.12.3461.

111. Pereira, B.; Billaud, M.; Almeida, R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends in cancer* **2017**, *3*(7), 506–528. doi:10.1016/j.trecan.2017.05.003.

112. Wang, Z.-L.; Li, B.; Luo, Y.-X.; Lin, Q.; Liu, S.-R.; Zhang, X.-Q.; et al. Comprehensive Genomic Characterization of RNA-Binding Proteins across Human Cancers. *Cell reports* **2018**, *22*(1), 286–298. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.035.

113. Nyati, K. K.; Agarwal, R. G.; Sharma, P.; Kishimoto, T. Arid5a Regulation and the Roles of Arid5a in the Inflammatory Response and Disease. *Frontiers in immunology* **2019**, *10*, 2790. doi:10.3389/fimmu.2019.02790.

114. Hentze, M. W.; Castello, A.; Schwarzl, T.; Preiss, T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2018**, *19*(5), 327–341. doi:10.1038/nrm.2017.130.

115. Zhang, M.; Weng, W.; Zhang, Q.; Wu, Y.; Ni, S.; Tan, C.; et al. The lncRNA NEAT1 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes colorectal cancer progression via interacting with DDX5. *Journal of hematology & oncology* **2018**, *11*(1), 113. doi:10.1186/s13045-018-0656-7.

116. Lin, S.; Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer* **2015**, *15*(6), 321–333. doi:10.1038/nrc3932.

117. Gloss, B. S.; Dinger, M. E. The specificity of long noncoding RNA expression. *Biochimica et biophysica acta* **2016**, *1859*(1), 16–22. doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.005.

118. Sahu, A.; Singhal, U.; Chinnaiyan, A. M. Long noncoding RNAs in cancer: from function to translation. *Trends in cancer* **2015**, *1*(2), 93–109. doi:10.1016/j.trecan.2015.08.010.

119. Fu, M.; Blackshear, P. J. RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCH zinc finger proteins. *Nature reviews. Immunology* **2017**, *17*(2), 130–143. doi:10.1038/nri.2016.129.

120. Lai, W. S.; Stumpo, D. J.; Kennington, E. A.; Burkholder, A. B.; Ward, J. M.; Fargo, D. L.; et al. Life without TTP: apparent absence of an important anti-

inflammatory protein in birds. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **2013**, 305(7), R689-700. doi:10.1152/ajpregu.00310.2013.

121. Brewer, B. Y.; Malicka, J.; Blackshear, P. J.; Wilson, G. M. RNA sequence elements required for high affinity binding by the zinc finger domain of tristetraprolin: conformational changes coupled to the bipartite nature of Au-rich mRNA-destabilizing motifs. *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279(27), 27870–27877. doi:10.1074/jbc.M402551200.

122. Taylor, G. A.; Carballo, E.; Lee, D. M.; Lai, W. S.; Thompson, M. J.; Patel, D. D.; et al. A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* **1996**, 4(5), 445–454. doi:10.1016/s1074-7613(00)80411-2.

123. Stumpo, D. J.; Byrd, N. A.; Phillips, R. S.; Ghosh, S.; Maronpot, R. R.; Castranio, T.; et al. Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Molecular and cellular biology* **2004**, 24(14), 6445–6455. doi:10.1128/MCB.24.14.6445-6455.2004.

124. Stumpo, D. J.; Broxmeyer, H. E.; Ward, T.; Cooper, S.; Hangoc, G.; Chung, Y. J.; et al. Targeted disruption of Zfp36L2, encoding a CCCH tandem zinc finger RNA-binding protein, results in defective hematopoiesis. *Blood* **2009**, 114(12), 2401–2410. doi:10.1182/blood-2009-04-214619.

125. Hodson, D. J.; Janas, M. L.; Galloway, A.; Bell, S. E.; Andrews, S.; Li, C. M.; et al. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nature immunology* **2010**, 11(8), 717–724. doi:10.1038/ni.1901.

126. Rounbehler, R. J.; Fallahi, M.; Yang, C.; Steeves, M. A.; Li, W.; Doherty, J. R.; et al. Tristetraprolin impairs myc-induced lymphoma and abolishes the malignant state. *Cell* **2012**, 150(3), 563–574. doi:10.1016/j.cell.2012.06.033.

127. Zekavati, A.; Nasir, A.; Alcaraz, A.; Aldrovandi, M.; Marsh, P.; Norton, J. D.; et al. Post-transcriptional regulation of BCL2 mRNA by the RNA-binding protein

ZFP36L1 in malignant B cells. *PloS one* **2014**, 9(7), e102625. doi:10.1371/journal.pone.0102625.

128. Sawaoka, H.; Dixon, D. A.; Oates, J. A.; Boutaud, O. Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278(16), 13928–13935. doi:10.1074/jbc.M300016200.

129. Lee, J. Y.; Kim, H. J.; Yoon, N. A.; Lee, W. H.; Min, Y. J.; Ko, B. K.; et al. Tumor suppressor p53 plays a key role in induction of both tristetraprolin and let-7 in human cancer cells. *Nucleic acids research* **2013**, 41(11), 5614–5625. doi:10.1093/nar/gkt222.

130. Lee, H. H.; Vo, M.-T.; Kim, H. J.; Lee, U. H.; Kim, C. W.; Kim, H. K.; et al. Stability of the LATS2 tumor suppressor gene is regulated by tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry* **2010**, 285(23), 17329–17337. doi:10.1074/jbc.M109.094235.

131. Wang, H.; Ding, N.; Guo, J.; Xia, J.; Ruan, Y. Dysregulation of TTP and HuR plays an important role in cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2016**, 37(11), 14451–14461. doi:10.1007/s13277-016-5397-z.

132. Hitti, E.; Iakovleva, T.; Brook, M.; Deppenmeier, S.; Gruber, A. D.; Radzioch, D.; et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Molecular and cellular biology* **2006**, 26(6), 2399–2407. doi:10.1128/MCB.26.6.2399-2407.2006.

133. Ronkina, N.; Shushakova, N.; Tiedje, C.; Yakovleva, T.; Tollenaere, M. A. X.; Scott, A.; et al. The Role of TTP Phosphorylation in the Regulation of Inflammatory Cytokine Production by MK2/3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2019**, 203(8), 2291–2300. doi:10.4049/jimmunol.1801221.

134. Brook, M.; Tchen, C. R.; Santalucia, T.; McIlrath, J.; Arthur, J. S. C.; Saklatvala, J.; et al. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and

- extracellular signal-regulated kinase pathways. *Molecular and cellular biology* **2006**, 26(6), 2408–2418. doi:10.1128/MCB.26.6.2408-2418.2006.
135. Lin, N.-Y.; Lin, C.-T.; Chen, Y.-L.; Chang, C.-J. Regulation of tristetraprolin during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *The FEBS journal* **2007**, 274(3), 867–878. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05632.x.
136. Hsieh, H.-H.; Chen, Y.-A.; Chang, Y.-J.; Wang, H.-H.; Yu, Y.-H.; Lin, S.-W.; et al. The functional characterization of phosphorylation of tristetraprolin at C-terminal NOT1-binding domain. *Journal of inflammation (London, England)* **2021**, 18(1), 22. doi:10.1186/s12950-021-00288-2.
137. Gebeshuber, C. A.; Zatloukal, K.; Martinez, J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO reports* **2009**, 10(4), 400–405. doi:10.1038/embor.2009.9.
138. Clark, A. R.; Dean, J. L. E. The control of inflammation via the phosphorylation and dephosphorylation of tristetraprolin: a tale of two phosphatases. *Biochemical Society transactions* **2016**, 44(5), 1321–1337. doi:10.1042/BST20160166.
139. Brennan, S. E.; Kuwano, Y.; Alkharouf, N.; Blackshear, P. J.; Gorospe, M.; Wilson, G. M. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer research* **2009**, 69(12), 5168–5176. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4238.
140. Zhang, D.; Zhou, Z.; Yang, R.; Zhang, S.; Zhang, B.; Tan, Y.; et al. Tristetraprolin, a Potential Safeguard Against Carcinoma: Role in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in oncology* **2021**, 11, 632189. doi:10.3389/fonc.2021.632189.
141. Tang, Z.; Li, C.; Kang, B.; Gao, G.; Li, C.; Zhang, Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic acids research* **2017**, 45(W1), W98–W102. doi:10.1093/nar/gkx247.
142. Guo, J.; Qu, H.; Shan, T.; Chen, Y.; Chen, Y.; Xia, J. Tristetraprolin Overexpression in Gastric Cancer Cells Suppresses PD-L1 Expression and Inhibits Tumor Progression by Enhancing Antitumor Immunity. *Molecules and cells* **2018**, 41(7), 653–664. doi:10.14348/molcells.2018.0040.

143. Gerke, T.; Beltran, H.; Wang, X.; Lee, G.-S. M.; Sboner, A.; Karnes, R. J.; et al. Low Tristetraprolin Expression Is Associated with Lethal Prostate Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2019**, 28(3), 584–590. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0667.
144. Rounbehler, R. J.; Berglund, A. E.; Gerke, T.; Takhar, M. M.; Awasthi, S.; Li, W.; et al. Tristetraprolin Is a Prognostic Biomarker for Poor Outcomes among Patients with Low-Grade Prostate Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **2018**, 27(11), 1376–1383. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0369.
145. Jiang, W.; Zhu, D.; Wang, C.; Zhu, Y. Tumor suppressing effects of tristetraprolin and its small double-stranded RNAs in bladder cancer. *Cancer Medicine* **2021**, 10(1), 269–285. doi:10.1002/cam4.3622.
146. Al-Souhibani, N.; Al-Ahmadi, W.; Hesketh, J. E.; Blackshear, P. J.; Khabar, K. S. A. The RNA-binding zinc-finger protein tristetraprolin regulates AU-rich mRNAs involved in breast cancer-related processes. *Oncogene* **2010**, 29(29), 4205–4215. doi:10.1038/onc.2010.168.
147. Ren, C.; Yang, T.; Qiao, P.; Wang, L.; Han, X.; Lv, S.; et al. PIM2 interacts with tristetraprolin and promotes breast cancer tumorigenesis. *Molecular oncology* **2018**, 12(5), 690–704. doi:10.1002/1878-0261.12192.
148. Al-Yahya, S.; Al-Saif, M.; Al-Ghamdi, M.; Moghrabi, W.; Khabar, K. S. A.; Al-Souhibani, N. Post-transcriptional regulation of BIRC5/survivin expression and induction of apoptosis in breast cancer cells by tristetraprolin. *RNA biology* **2024**, 21(1), 1–15. doi:10.1080/15476286.2023.2286101.
149. Milke, L.; Schulz, K.; Weigert, A.; Sha, W.; Schmid, T.; Brüne, B. Depletion of tristetraprolin in breast cancer cells increases interleukin-16 expression and promotes tumor infiltration with monocytes/macrophages. *Carcinogenesis* **2013**, 34(4), 850–857. doi:10.1093/carcin/bgs387.
150. Barrios-García, T.; Gómez-Romero, V.; Tecalco-Cruz, Á.; Valadéz-Graham,

- V.; León-Del-Río, A. Nuclear tristetraprolin acts as a corepressor of multiple steroid nuclear receptors in breast cancer cells. *Molecular genetics and metabolism reports* **2016**, 7, 20–26. doi:10.1016/j.ymgmr.2016.02.004.
151. Huang, L.; Yu, Z.; Zhang, Z.; Ma, W.; Song, S.; Huang, G. Interaction with Pyruvate Kinase M2 Destabilizes Tristetraprolin by Proteasome Degradation and Regulates Cell Proliferation in Breast Cancer. *Scientific reports* **2016**, 6, 22449. doi:10.1038/srep22449.
152. Pan, Q. H.; Fan, Y. H.; Wang, Y. Z.; Li, D. M.; Hu, C. E.; Li, R. X. Long noncoding RNA NNT-AS1 functions as an oncogene in breast cancer via repressing ZFP36 expression. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* **2020**, 34(3), 795–805. doi:10.23812/20-100-A-13.
153. Mao, Y.; Lv, M.; Cao, W.; Liu, X.; Cui, J.; Wang, Y.; et al. Circular RNA 000554 represses epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by regulating microRNA-182/ZFP36 axis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2020**, 34(9), 11405–11420. doi:10.1096/fj.201903047R.
154. Li, C.; Tang, C.; He, G. Tristetraprolin: a novel mediator of the anticancer properties of resveratrol. *Genetics and molecular research : GMR* **2016**, 15(2). doi:10.4238/gmr.15027213.
155. Lee, S.-R.; Mun, J.-Y.; Jeong, M.-S.; Lee, H.-H.; Roh, Y.-G.; Kim, W.-T.; et al. Thymoquinone-Induced Tristetraprolin Inhibits Tumor Growth and Metastasis through Destabilization of MUC4 mRNA. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20(11). doi:10.3390/ijms20112614.
156. Barrios-García, T.; Tecalco-Cruz, A.; Gómez-Romero, V.; Reyes-Carmona, S.; Meneses-Morales, I.; León-Del-Río, A. Tristetraprolin represses estrogen receptor α transactivation in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **2014**, 289(22), 15554–15565. doi:10.1074/jbc.M114.548552.
157. Lee, H. H.; Kim, W.-T.; Kim, D. H.; Park, J. W.; Kang, T.-H.; Chung, J. W.; et al. Tristetraprolin suppresses AHRR expression through mRNA destabilization. *FEBS letters* **2013**, 587(10), 1518–1523. doi:10.1016/j.febslet.2013.03.031.

158. Xu, L.; Ning, H.; Gu, L.; Wang, Q.; Lu, W.; Peng, H.; et al. Tristetraprolin induces cell cycle arrest in breast tumor cells through targeting AP-1/c-Jun and NF- κ B pathway. *Oncotarget* **2015**, 6(39), 41679–41691. doi:10.18632/oncotarget.6149.
159. Pandiri, I.; Chen, Y.; Joe, Y.; Kim, H. J.; Park, J.; Chung, H. T.; et al. Tristetraprolin mediates the anti-proliferative effects of metformin in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **2016**, 156(1), 57–64. doi:10.1007/s10549-016-3742-y.
160. Jeon, D. Y.; Jeong, S. Y.; Lee, J. W.; Kim, J.; Kim, J. H.; Chu, H. S.; et al. FOXO1 Is a Key Mediator of Glucocorticoid-Induced Expression of Tristetraprolin in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences* **2022**, 23(22). doi:10.3390/ijms232213673.
161. Xiong, T.; Liu, X.-W.; Huang, X.-L.; Xu, X.-F.; Xie, W.-Q.; Zhang, S.-J.; et al. Tristetraprolin: A novel target of diallyl disulfide that inhibits the progression of breast cancer. *Oncology letters* **2018**, 15(5), 7817–7827. doi:10.3892/ol.2018.8299.
162. Dolicka, D.; Sobolewski, C.; Gjorgjieva, M.; Correia de Sousa, M.; Berthou, F.; De Vito, C.; et al. Tristetraprolin Promotes Hepatic Inflammation and Tumor Initiation but Restrains Cancer Progression to Malignancy. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **2021**, 11(2), 597–621. doi:10.1016/j.jcmgh.2020.09.012.
163. Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science (New York, N.Y.)* **2011**, 331(6024), 1559–1564. doi:10.1126/science.1203543.
164. Tarin, D. Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Seminars in cancer biology* **2011**, 21(2), 72–82. doi:10.1016/j.semcancer.2010.12.006.
165. Chambers, A. F.; Groom, A. C.; MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer* **2002**, 2(8), 563–572. doi:10.1038/nrc865.
166. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* **2003**, 3(6), 453–458. doi:10.1038/nrc1098.

167. Tarin, D. Comparisons of metastases in different organs: biological and clinical implications. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**, 14(7), 1923–1925. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5259.
168. Gondi, C. S.; Lakka, S. S.; Yanamandra, N.; Siddique, K.; Dinh, D. H.; Olivero, W. C.; et al. Expression of antisense uPAR and antisense uPA from a bicistronic adenoviral construct inhibits glioma cell invasion, tumor growth, and angiogenesis. *Oncogene* **2003**, 22(38), 5967–5975. doi:10.1038/sj.onc.1206535.
169. Tu, M.; Wange, W.; Cai, L.; Zhu, P.; Gao, Z.; Zheng, W. IL-13 receptor $\alpha 2$ stimulates human glioma cell growth and metastasis through the Src/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2016**, 37(11), 14701–14709. doi:10.1007/s13277-016-5346-x.
170. Bartolomé, R. A.; García-Palmero, I.; Torres, S.; López-Lucendo, M.; Balyasnikova, I. V; Casal, J. I. IL13 Receptor $\alpha 2$ Signaling Requires a Scaffold Protein, FAM120A, to Activate the FAK and PI3K Pathways in Colon Cancer Metastasis. *Cancer research* **2015**, 75(12), 2434–2444. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3650.
171. Zeng, B.; Zhu, D.; Su, Z.; Li, Z.; Yu, Z. Tristetraprolin exerts tumor suppressive functions on the tumorigenesis of glioma by targeting IL-13. *International immunopharmacology* **2016**, 39, 63–70. doi:10.1016/j.intimp.2016.07.001.
172. Andersson, P.; Yang, Y.; Hosaka, K.; Zhang, Y.; Fischer, C.; Braun, H.; et al. Molecular mechanisms of IL-33-mediated stromal interactions in cancer metastasis. *JCI insight* **2018**, 3(20). doi:10.1172/jci.insight.122375.
173. Li, Y.; Shi, J.; Qi, S.; Zhang, J.; Peng, D.; Chen, Z.; et al. IL-33 facilitates proliferation of colorectal cancer dependent on COX2/PGE(2). *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* **2018**, 37(1), 196. doi:10.1186/s13046-018-0839-7.
174. Yang, T.; Ren, C.; Lu, C.; Qiao, P.; Han, X.; Wang, L.; et al. Phosphorylation of HSF1 by PIM2 Induces PD-L1 Expression and Promotes Tumor Growth in

Breast Cancer. *Cancer research* **2019**, 79(20), 5233–5244. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0063.

175. Mukherjee, N.; Jacobs, N. C.; Hafner, M.; Kennington, E. A.; Nusbaum, J. D.; Tuschl, T.; et al. Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome biology* **2014**, 15(1), R12. doi:10.1186/gb-2014-15-1-r12.

176. Al-Ahmadi, W.; Al-Ghamdi, M.; Al-Souhibani, N.; Khabar, K. S. A. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *The Journal of pathology* **2013**, 230(1), 28–38. doi:10.1002/path.4178.

177. Zhou, C.; Yang, Q. Value of HMGB1 expression for assessing gastric cancer severity: a systematic meta-analysis. *The Journal of international medical research* **2021**, 49(3), 300060521993312. doi:10.1177/0300060521993312.

178. Wang, H.; Chen, Y.; Guo, J.; Shan, T.; Deng, K.; Chen, J.; et al. Dysregulation of tristetraprolin and human antigen R promotes gastric cancer progressions partly by upregulation of the high-mobility group box 1. *Scientific reports* **2018**, 8(1), 7080. doi:10.1038/s41598-018-25443-3.

179. Ishii, H.; Furuse, J.; Yonemoto, N.; Nagase, M.; Yoshino, M.; Sato, T. Chemotherapy in the treatment of advanced gallbladder cancer. *Oncology* **2004**, 66(2), 138–142. doi:10.1159/000077440.

180. Jun, Y.; Tang, Z.; Luo, C.; Jiang, B.; Li, X.; Tao, M.; et al. Leukocyte-Mediated Combined Targeted Chemo and Gene Therapy for Esophageal Cancer. *ACS applied materials & interfaces* **2020**, 12(42), 47330–47341. doi:10.1021/acsami.0c15419.

181. Chang, J.-E.; Yoon, I.-S.; Sun, P.-L.; Yi, E.; Jheon, S.; Shim, C.-K. Anticancer efficacy of photodynamic therapy with hematoporphyrin-modified, doxorubicin-loaded nanoparticles in liver cancer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* **2014**, 140, 49–56. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.07.005.

182. Murad, A. M.; Santiago, F. F.; Petroianu, A.; Rocha, P. R.; Rodrigues, M. A.; Rausch, M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer* **1993**, 72(1), 37–41. doi:10.1002/1097-

0142(19930701)72:1<37::aid-cnrcr2820720109>3.0.co;2-p.

183. Sun, G.; Sun, K.; Sun, J. Combination prostate cancer therapy: Prostate-specific membranes antigen targeted, pH-sensitive nanoparticles loaded with doxorubicin and tanshinone. *Drug delivery* **2021**, *28*(1), 1132–1140. doi:10.1080/10717544.2021.1931559.

184. du Bois, A.; Pfisterer, J.; Burchardi, N.; Loibl, S.; Huober, J.; Wimberger, P.; et al. Combination therapy with pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin in gynecologic malignancies: a prospective phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and Kommission Uterus (AGO-K-. *Gynecologic oncology* **2007**, *107*(3), 518–525. doi:10.1016/j.ygyno.2007.08.008.

185. Pautier, P.; Italiano, A.; Piperno-Neumann, S.; Chevreau, C.; Penel, N.; Firmin, N.; et al. Doxorubicin-Trabectedin with Trabectedin Maintenance in Leiomyosarcoma. *The New England journal of medicine* **2024**, *391*(9), 789–799. doi:10.1056/NEJMoa2403394.

186. Geanacopoulos, M. An introduction to RNA-mediated gene silencing. *Science progress* **2005**, *88*(Pt 1), 49–69.

187. Nicoletto, R. E.; Ofner, C. M. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2022**, *89*(3), 285–311. doi:10.1007/s00280-022-04400-y.

188. Banno, T.; Gazel, A.; Blumenberg, M. Effects of tumor necrosis factor- α (TNF α) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*(31), 32633–32642. doi:10.1074/jbc.M400642200.

189. Dalmases, A.; González, I.; Menendez, S.; Arpí, O.; Corominas, J. M.; Servitja, S.; et al. Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF- κ B target genes in human breast cancer. *Oncotarget* **2014**, *5*(1), 196–210. doi:10.18632/oncotarget.1556.

190. Helbig, G.; Christopherson, K. W. 2nd; Bhat-Nakshatri, P.; Kumar, S.; Kishimoto, H.; Miller, K. D.; et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration

and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278(24), 21631–21638. doi:10.1074/jbc.M300609200.

191. Ho, W. C.; Dickson, K. M.; Barker, P. A. Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer research* **2005**, 65(10), 4273–4281. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3494.

192. Lyng, M. B.; Lænkholm, A. V.; Pallisgaard, N.; Ditzel, H. J. Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* **2008**, 8, 1–11. doi:10.1186/1471-2407-8-20.

193. Gorji-Bahri, G.; Moradtabrizi, N.; Hashemi, A. Uncovering the stability status of the reputed reference genes in breast and hepatic cancer cell lines. *PloS one* **2021**, 16(11), e0259669. doi:10.1371/journal.pone.0259669.

194. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **2001**, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.

195. Stringer, C.; Pachitariu, M. Cellpose3: one-click image restoration for improved cellular segmentation. *bioRxiv* **2024**, 2024.02.10.579780.

196. Hauke, L.; Primeßnig, A.; Eltzner, B.; Radwitz, J.; Huckemann, S. F.; Rehfeldt, F. FilamentSensor 2.0: An open-source modular toolbox for 2D/3D cytoskeletal filament tracking. *PloS one* **2023**, 18(2), e0279336. doi:10.1371/journal.pone.0279336.

197. Schmidt, U.; Weigert, M.; Broaddus, C.; Myers, G. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*; Springer International Publishing, 2018; Vol. 11071 LNCS. doi:10.1007/978-3-030-00934-2_30.

198. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **2012**, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.

199. Ershov, D.; Phan, M.-S.; Pylvänäinen, J. W.; Rigaud, S. U.; Le Blanc, L.; Charles-Orszag, A.; et al. TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation

- algorithms into tracking pipelines. *Nature methods* **2022**, 19(7), 829–832. doi:10.1038/s41592-022-01507-1.
200. Chen, H.-C. Boyden chamber assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2005**, 294, 15–22. doi:10.1385/1-59259-860-9:015.
201. Yilmaz, M.; Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* **2009**, 28(1–2), 15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0.
202. Eliseeva, I. A.; Lyabin, D. N.; Ovchinnikov, L. P. Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry. Biokhimiia* **2013**, 78(13), 1377–1391. doi:10.1134/S0006297913130014.
203. Kudinov, A. E.; Karanickolas, J.; Golemis, E. A.; Bumber, Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2017**, 23(9), 2143–2153. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-2728.
204. Sutherland, J. M.; McLaughlin, E. A.; Hime, G. R.; Siddall, N. A. The Musashi family of RNA binding proteins: master regulators of multiple stem cell populations. *Advances in experimental medicine and biology* **2013**, 786, 233–245. doi:10.1007/978-94-007-6621-1_13.
205. Lai, E. C.; Tam, B.; Rubin, G. M. Pervasive regulation of Drosophila Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes & development* **2005**, 19(9), 1067–1080. doi:10.1101/gad.1291905.
206. Nakayama, T.; Mutsuga, N.; Tosato, G. FGF2 posttranscriptionally down-regulates expression of SDF1 in bone marrow stromal cells through FGFR1 IIIc. *Blood* **2007**, 109(4), 1363–1372. doi:10.1182/blood-2006-06-028217.
207. Kim, C. W.; Kim, H. K.; Vo, M.-T.; Lee, H. H.; Kim, H. J.; Min, Y. J.; et al. Tristetraprolin controls the stability of cIAP2 mRNA through binding to the 3'UTR of cIAP2 mRNA. *Biochemical and biophysical research communications* **2010**, 400(1), 46–52. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.136.
208. Kang, J.-G.; Amar, M. J.; Remaley, A. T.; Kwon, J.; Blackshear, P. J.; Wang, P.; et al. Zinc finger protein tristetraprolin interacts with CCL3 mRNA and regulates

- tissue inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **2011**, 187(5), 2696–2701. doi:10.4049/jimmunol.1101149.
209. Horner, T. J.; Lai, W. S.; Stumpo, D. J.; Blackshear, P. J. Stimulation of polo-like kinase 3 mRNA decay by tristetraprolin. *Molecular and cellular biology* **2009**, 29(8), 1999–2010. doi:10.1128/MCB.00982-08.
210. Sauer, I.; Schaljo, B.; Vogl, C.; Gattermeier, I.; Kolbe, T.; Müller, M.; et al. Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin. *Blood* **2006**, 107(12), 4790–4797. doi:10.1182/blood-2005-07-3058.
211. Ross, H. J.; Sato, N.; Ueyama, Y.; Koeffler, H. P. Cytokine messenger RNA stability is enhanced in tumor cells. *Blood* **1991**, 77(8), 1787–1795.
212. Qiu, L.-Q.; Lai, W. S.; Bradbury, A.; Zeldin, D. C.; Blackshear, P. J. Tristetraprolin (TTP) coordinately regulates primary and secondary cellular responses to proinflammatory stimuli. *Journal of leukocyte biology* **2015**, 97(4), 723–736. doi:10.1189/jlb.3A0214-106R.
213. Lee, H. H.; Lee, S.-R.; Leem, S.-H. Tristetraprolin regulates prostate cancer cell growth through suppression of E2F1. *Journal of microbiology and biotechnology* **2014**, 24(2), 287–294. doi:10.4014/jmb.1309.09070.
214. Van Tubergen, E.; Vander Broek, R.; Lee, J.; Wolf, G.; Carey, T.; Bradford, C.; et al. Tristetraprolin regulates interleukin-6, which is correlated with tumor progression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **2011**, 117(12), 2677–2689. doi:10.1002/cncr.25859.
215. Mahat, D. B.; Brennan-Laun, S. E.; Fialcowitz-White, E. J.; Kishor, A.; Ross, C. R.; Pozharskaya, T.; et al. Coordinated expression of tristetraprolin post-transcriptionally attenuates mitogenic induction of the oncogenic Ser/Thr kinase Pim-1. *PloS one* **2012**, 7(3), e33194. doi:10.1371/journal.pone.0033194.
216. Afifi, N.; Barrero, C. A. Understanding Breast Cancer Aggressiveness and Its Implications in Diagnosis and Treatment. *Journal of clinical medicine*. Switzerland February 2023. doi:10.3390/jcm12041375.
217. Obidiro, O.; Battogtokh, G.; Akala, E. O. Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics* **2023**, 15(7).

doi:10.3390/pharmaceutics15071796.

218. Arroyo-Crespo, J. J.; Armiñán, A.; Charbonnier, D.; Deladriere, C.; Palomino-Schätzlein, M.; Lamas-Domingo, R.; et al. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International journal of cancer* **2019**, *145*(8), 2267–2281. doi:10.1002/ijc.32270.

219. Sachidanandan, C.; Sambasivan, R.; Dhawan, J. Tristetraprolin and LPS-inducible CXC chemokine are rapidly induced in presumptive satellite cells in response to skeletal muscle injury. *Journal of Cell Science* **2002**, *115*(13), 2701–2712. doi:10.1242/jcs.115.13.2701.

220. Cao, H. Lipopolysaccharide regulation of antiinflammatory tristetraprolin family and proinflammatory gene expression in mouse macrophages. *BMC research notes* **2024**, *17*(1), 82. doi:10.1186/s13104-024-06743-6.

221. Jiang, W.; Zhu, D.; Wang, C.; Zhu, Y. Tumor suppressing effects of tristetraprolin and its small double-stranded RNAs in bladder cancer. *Cancer medicine* **2021**, *10*(1), 269–285. doi:10.1002/cam4.3622.

222. Essafi-Benkhadir, K.; Onesto, C.; Stebe, E.; Moroni, C.; Pagès, G. Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Molecular biology of the cell* **2007**, *18*(11), 4648–4658. doi:10.1091/mbc.e07-06-0570.

223. Ross, C. R.; Brennan-Laun, S. E.; Wilson, G. M. Tristetraprolin: roles in cancer and senescence. *Ageing research reviews* **2012**, *11*(4), 473–484. doi:10.1016/j.arr.2012.02.005.

224. Calero-Cuenca, F. J.; Janota, C. S.; Gomes, E. R. Dealing with the nucleus during cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* **2018**, *50*, 35–41. doi:10.1016/j.ceb.2018.01.014.

225. Deng, K.; Wang, H.; Shan, T.; Chen, Y.; Zhou, H.; Zhao, Q.; et al. Tristetraprolin inhibits gastric cancer progression through suppression of IL-33. *Scientific Reports* **2016**, *6*(March), 1–14. doi:10.1038/srep24505.

226. Wei, Z.-R.; Liang, C.; Feng, D.; Cheng, Y.-J.; Wang, W.-M.; Yang, D.-J.; et al. Low tristetraprolin expression promotes cell proliferation and predicts poor patients

outcome in pancreatic cancer. *Oncotarget* **2016**, 7(14), 17737–17750. doi:10.18632/oncotarget.7397.

227. Zhu, J.-G.; Yuan, D.-B.; Chen, W.-H.; Han, Z.-D.; Liang, Y.-X.; Chen, G.; et al. Prognostic value of ZFP36 and SOCS3 expressions in human prostate cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **2016**, 18(8), 782–791. doi:10.1007/s12094-015-1432-6.

228. Goddio, M. V.; Gattelli, A.; Slomiansky, V.; Lacunza, E.; Gingerich, T.; Tocci, J. M.; et al. Mammary differentiation induces expression of Tristetraprolin, a tumor suppressor AU-rich mRNA-binding protein. *Breast cancer research and treatment* **2012**, 135(3), 749–758. doi:10.1007/s10549-012-2216-0.

229. Zoja, F. P.; Youriy Yo, M.; Lyudmyla, G. O.; Yevgeniy, G. L.; Anton Yu, R. Bulletin of National Cancer Registry of Ukraine № 21. *Bulletin of National Cancer Registry of Ukraine* **2019**, 21, 2018–2019.

230. Aran, D.; Camarda, R.; Odegaard, J.; Paik, H.; Oskotsky, B.; Krings, G.; et al. Comprehensive analysis of normal adjacent to tumor transcriptomes. *Nature communications* **2017**, 8(1), 1077. doi:10.1038/s41467-017-01027-z.

231. Takaku, M.; Grimm, S. A.; Wade, P. A. GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene? *Gene expression* **2015**, 16(4), 163–168. doi:10.3727/105221615X14399878166113.

232. Creighton, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics : targets & therapy* **2012**, 6, 289–297. doi:10.2147/BTT.S29923.

233. Lee, S.-R.; Jin, H.; Kim, W.-T.; Kim, W.-J.; Kim, S. Z.; Leem, S.-H.; et al. Tristetraprolin activation by resveratrol inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells. *International journal of oncology* **2018**, 53(3), 1269–1278. doi:10.3892/ijo.2018.4453.

234. Kim, D. J.; Jang, J. H.; Ham, S. Y.; Choi, S. H.; Park, S. S.; Jeong, S. Y.; et al. Doxorubicin inhibits PD-L1 expression by enhancing TTP-mediated decay of PD-L1 mRNA in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2020**, 522(2), 402–407. doi:10.1016/j.bbrc.2019.11.106.

235. Wei, L.; Surma, M.; Gough, G.; Shi, S.; Lambert-Cheatham, N.; Chang, J.; et al. Dissecting the Mechanisms of Doxorubicin and Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity: The Involvement of Actin Cytoskeleton and ROCK1. *PloS one* **2015**, *10*(7), e0131763. doi:10.1371/journal.pone.0131763.
236. Bober, P.; Alexovič, M.; Tomková, Z.; Kilík, R.; Sabo, J. RHOA and mDia1 Promotes Apoptosis of Breast Cancer Cells Via a High Dose of Doxorubicin Treatment. *Open life sciences* **2019**, *14*, 619–627. doi:10.1515/biol-2019-0070.
237. Fang, X. J.; Jiang, H.; Zhu, Y. Q.; Zhang, L. Y.; Fan, Q. H.; Tian, Y. Doxorubicin induces drug resistance and expression of the novel CD44st via NF- κ B in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncology Reports* **2014**, *31*(6), 2735–2742. doi:10.3892/or.2014.3131.
238. Wan, X.; Hou, J.; Liu, S.; Zhang, Y.; Li, W.; Zhang, Y.; et al. Estrogen Receptor α Mediates Doxorubicin Sensitivity in Breast Cancer Cells by Regulating E-Cadherin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*(February). doi:10.3389/fcell.2021.583572.
239. Rasouli, A.; Aliebrahimi, S.; Montazeri, V.; Ghahremani, M. H.; Ostad, S. N. Combination effect of doxorubicin and HIF inhibitor on MCF-7 CD44+/CD24-subpopulation cells in hypoxic condition. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2022**, *58*, 1–10. doi:10.1590/s2175-97902020000318754.
240. Mizielska, A.; Dziechciowska, I.; Szczepański, R.; Cisek, M.; Dąbrowska, M.; Ślęzak, J.; et al. Doxorubicin and Cisplatin Modulate miR-21, miR-106, miR-126, miR-155 and miR-199 Levels in MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 Cells That Makes Them Potential Elements of the DNA-Damaging Drug Treatment Response Monitoring in Breast Cancer Cells—A Preliminary St. *Genes* **2023**, *14*(3). doi:10.3390/genes14030702.
241. Hientz, K.; Mohr, A.; Bhakta-Guha, D.; Efferth, T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* **2017**, *8*(5), 8921–8946. doi:10.18632/oncotarget.13475.
242. Tchen, C. R.; Brook, M.; Saklatvala, J.; Clark, A. R. The stability of tristetraprolin mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by

tristetraprolin itself. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279(31), 32393–32400. doi:10.1074/jbc.M402059200.

243. Xing, X.; Tan, Z.; Zhi, X.; Sun, H.; Yang, J.; Li, L.; et al. Integrating analysis of circular RNA and mRNA expression profiles in doxorubicin induced cardiotoxicity mice. *Journal of applied toxicology : JAT* **2022**, 42(5), 793–805. doi:10.1002/jat.4257.

244. Ciocan-Cartita, C. A.; Jurj, A.; Zanoaga, O.; Cojocneanu, R.; Pop, L.-A.; Moldovan, A.; et al. New insights in gene expression alteration as effect of doxorubicin drug resistance in triple negative breast cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **2020**, 39(1), 241. doi:10.1186/s13046-020-01736-2.

245. Ito, H.; Miller, S. C.; Billingham, M. E.; Akimoto, H.; Torti, S. V; Wade, R.; et al. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87(11), 4275–4279. doi:10.1073/pnas.87.11.4275.

246. Andersen, C. L.; Liu, M.; Wang, Z.; Ye, X.; Xiao, S. Chemotherapeutic agent doxorubicin alters uterine gene expression in response to estrogen in ovariectomized CD-1 adult mice†. *Biology of reproduction*. United States April 2019, pp 869–871. doi:10.1093/biolre/iory259.

247. Matthews, E. R.; Johnson, O. D.; Horn, K. J.; Gutiérrez, J. A.; Powell, S. R.; Ward, M. C. Anthracyclines induce cardiotoxicity through a shared gene expression response signature. *PLoS genetics* **2024**, 20(2), e1011164. doi:10.1371/journal.pgen.1011164.

248. Ramachandran, C.; Samy, T. S.; Huang, X. L.; Yuan, Z. K.; Krishan, A. Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochemical pharmacology* **1993**, 45(6), 1367–1371. doi:10.1016/0006-2952(93)90293-6.

249. Comşa, Ş.; Cîmpean, A. M.; Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer research* **2015**, 35(6), 3147–3154.

250. Uruno, T.; Liu, J.; Zhang, P.; Fan, Y. X.; Egile, C.; Li, R.; et al. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature Cell Biology* **2001**, 3(3), 259–266. doi:10.1038/35060051.
251. Bryce, N. S.; Clark, E. S.; Leysath, J. L.; Currie, J. D.; Webb, D. J.; Weaver, A. M. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current biology : CB* **2005**, 15(14), 1276–1285. doi:10.1016/j.cub.2005.06.043.
252. Liu, T.; Cao, L.; Mladenov, M.; Jegou, A.; Way, M.; Moores, C. A. Cortactin stabilizes actin branches by bridging activated Arp2/3 to its nucleated actin filament. *Nature structural & molecular biology* **2024**, 31(5), 801–809. doi:10.1038/s41594-023-01205-2.
253. Lambert, C.; Schmidt, K.; Karger, M.; Stadler, M.; Stradal, T. E. B.; Rottner, K. Cytochalasins and Their Impact on Actin Filament Remodeling. *Biomolecules* **2023**, 13(8), 1247. doi:10.3390/biom13081247.
254. Elosegui-Artola, A.; Jorge-Peñas, A.; Moreno-Arotzena, O.; Oregi, A.; Lasa, M.; García-Aznar, J. M.; et al. Image analysis for the quantitative comparison of stress fibers and focal adhesions. *PloS one* **2014**, 9(9), e107393. doi:10.1371/journal.pone.0107393.
255. Franchi, M.; Piperigkou, Z.; Karamanos, K.-A.; Franchi, L.; Masola, V. Extracellular Matrix-Mediated Breast Cancer Cells Morphological Alterations, Invasiveness, and Microvesicles/Exosomes Release. *Cells* **2020**, 9(9), 2031. doi:10.3390/cells9092031.
256. Chen, P.; Xie, H.; Sekar, M. C.; Gupta, K.; Wells, A. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *The Journal of cell biology* **1994**, 127(3), 847–857. doi:10.1083/jcb.127.3.847.
257. Stylli, S. S.; Stacey, T. T. I.; Verhagen, A. M.; Xu, S. S.; Pass, I.; Courtneidge, S. A.; et al. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *Journal of cell science* **2009**, 122(Pt 15), 2727–2740. doi:10.1242/jcs.046680.
258. Seals, D. F.; Azucena, E. F. J.; Pass, I.; Tesfay, L.; Gordon, R.; Woodrow, M.;

- et al. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer cell* **2005**, 7(2), 155–165. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.006.
259. Mehes, E.; Barath, M.; Gulyas, M.; Bugyik, E.; Geiszt, M.; Szoor, A.; et al. Enhanced endothelial motility and multicellular sprouting is mediated by the scaffold protein TKS4. *Scientific reports* **2019**, 9(1), 14363. doi:10.1038/s41598-019-50915-5.
260. Szeder, B.; Tárnoki-Zách, J.; Lakatos, D.; Vas, V.; Kudlik, G.; Merő, B.; et al. Absence of the Tks4 Scaffold Protein Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Changes in Human Colon Cancer Cells. *Cells* **2019**, 8(11), 1343. doi:10.3390/cells8111343.
261. Kurilla, A.; László, L.; Takács, T.; Tilajka, Á.; Lukács, L.; Novák, J.; et al. Studying the Association of TKS4 and CD2AP Scaffold Proteins and Their Implications in the Partial Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Process. *International journal of molecular sciences* **2023**, 24(20), 15136. doi:10.3390/ijms242015136.
262. Brooks, S. A.; Blackshear, P. J. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, 1829(6–7), 666–679. doi:10.1016/j.bbagr.2013.02.003.
263. Griseri, P.; Bourcier, C.; Hieblot, C.; Essafi-Benkhadir, K.; Chamorey, E.; Touriol, C.; et al. A synonymous polymorphism of the Tristetraprolin (TTP) gene, an AU-rich mRNA-binding protein, affects translation efficiency and response to Herceptin treatment in breast cancer patients. *Human molecular genetics* **2011**, 20(23), 4556–4568. doi:10.1093/hmg/ddr390.
264. Fallahi, M.; Amelio, A. L.; Cleveland, J. L.; Rounbehler, R. J. CREB targets define the gene expression signature of malignancies having reduced levels of the tumor suppressor tristetraprolin. *PloS one* **2014**, 9(12), e115517. doi:10.1371/journal.pone.0115517.
265. Biswas, D. K.; Shi, Q.; Baily, S.; Strickland, I.; Ghosh, S.; Pardee, A. B.; et al. NF-κB activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation

and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101(27), 10137–10142. doi:10.1073/pnas.0403621101.

266. Chen, Y. L.; Jiang, Y. W.; Su, Y. L.; Lee, S. C.; Chang, M. S.; Chang, C. J. Transcriptional regulation of tristetraproline by NF- κ B signaling in LPS-stimulated macrophages. *Molecular Biology Reports* **2013**, 40(4), 2867–2877. doi:10.1007/s11033-012-2302-8.

267. Waks, A. G.; Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* **2019**, 321(3), 288–300. doi:10.1001/jama.2018.19323.

268. Tacar, O.; Sriamornsak, P.; Dass, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2013**, 65(2), 157–170. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.

269. Rosa, P.; Clementi, F. Absorption and tissue distribution of doxorubicin entrapped in liposomes following intravenous or intraperitoneal administration. *Pharmacology* **1983**, 26(4), 221–229. doi:10.1159/000137805.

270. Goolsby, T. V.; Lombardo, F. A. Extravasation of chemotherapeutic agents: prevention and treatment. *Seminars in oncology* **2006**, 33(1), 139–143. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.11.007.

271. Hernandez, E. P.; Lazarin-Bidóia, D.; Bini, R. D.; Nakamura, C. V.; Cótica, L. F.; de Oliveira Silva Lautenschlager, S. Doxorubicin-Loaded Iron Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2023**, 12(2), 237. doi:10.3390/antiox12020237.

272. Effat, H.; Abosharaf, H. A.; Radwan, A. M. Combined effects of naringin and doxorubicin on the JAK/STAT signaling pathway reduce the development and spread of breast cancer cells. *Scientific Reports* **2024**, 14(1), 1–10. doi:10.1038/s41598-024-53320-9.

273. Wang, X.; Decker, C. C.; Zechner, L.; Krstin, S.; Wink, M. In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC pharmacology & toxicology* **2019**, 20(1), 4. doi:10.1186/s40360-018-0284-4.

274. Liu, C.-L.; Chen, M.-J.; Lin, J.-C.; Lin, C.-H.; Huang, W.-C.; Cheng, S.-P.; et

- al. Doxorubicin Promotes Migration and Invasion of Breast Cancer Cells through the Upregulation of the RhoA/MLC Pathway. *Journal of breast cancer* **2019**, 22(2), 185–195. doi:10.4048/jbc.2019.22.e22.
275. Mohammed, S.; Shamseddine, A. A.; Newcomb, B.; Chavez, R. S.; Panzner, T. D.; Lee, A. H.; et al. Sublethal doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells: role of Src Family non-receptor tyrosine kinases. *Breast cancer research : BCR* **2021**, 23(1), 76. doi:10.1186/s13058-021-01452-5.
276. Colombo, R.; Milzani, A. How does doxorubicin interfere with actin polymerization? *Biochimica et biophysica acta* **1988**, 968(1), 9–16. doi:10.1016/0167-4889(88)90038-9.
277. Colombo, R.; Necco, A.; Vailati, G.; Milzani, A. Dose-dependence of doxorubicin effect on actin assembly in vitro. *Experimental and Molecular Pathology* **1988**, 49(3), 297–304. doi:10.1016/0014-4800(88)90002-0.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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.
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.
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.
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.
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.
6. Hubiernatorova, A.; Gerasymchuk, D.; Kropyvko, S. Investigation of posttranscriptional regulation of genes involved in cytoskeleton dynamics. All-Ukrainian Conference of Young Scientists with international participation 2021, 37, 185–244.
7. Hubiernatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O.; Lavrynenko, K.; Syvak, L.; Verovkina, N.; et al. Tristetraprolin In Cancer: Treat Or Trick? All-Ukrainian

Conference on Molecular and Cell Biology with international participation, 2022, 127.

8. Hubiarnatorova, A.; Kropyvko, S.; Mankovska, O. Tristetraprolin in breast cancer. Conference of young scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics — 2023 2023, 39, 66.

9. Hubiarnatorova, A.; Gerasymchuk, D. MicroRNA and RBP-based regulation of genes involved in the remodelling of actin cytoskeleton. In XIth Parnas Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”; 2018; pp 77–84. doi:10.4324/9780429244506-9.