Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0825U000265

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 16-01-2025

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Губернаторова Анастасія Олександрівна
2. Anastasiia O. Hubiernatorova

Кваліфікація: 03.00.03, 091

Ідентифікатор ORCID ID: 0009-0002-6645-6396

Вид дисертації: доктор філософії

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 091

Назва наукової спеціальності: Біологія

Галузь / галузі знань: біологія

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: 091 біологія

Дата захисту: 15-01-2025

Спеціальність за освітою: Біологія

Місце роботи здобувача: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): PhD 7299

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації: Українська

Коди тематичних рубрик: 34.15.45, 34.15.51

Тема дисертації:

1. Роль тристетрапроліну в раку молочної залози людини
2. Tristetraprolin in breast cancer

Реферат:

1. 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. 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 TTP. Показано, що експресія TTP значно дисрегульована у багатьох типах раку, показано його участь у деградації мРНК, продукти яких асоційовані із міграцією та інвазією, проте на сьогодні даних щодо впливу TTP та експресію цитоскелет-асоційованих генів недостатньо. Метою роботи було вивчення особливостей впливу надекспресії TTP на експресію цитоскелет-асоційованих генів SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL в контексті клітинної рухливості та інвазії на моделі тричі-негативного РМЗ, дослідження впливу

доксорубіцину на експресію цих генів та клітинну рухливість, а також оцінка можливості використання TTP 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 TTP з мРНК генів цитоскелету SH3PXD2A, SH3PXD2B, CTTN, WIPF1 та WASL та виявлено, що вони із високою ймовірністю зв'язуватимуться з TTP. Для дослідження впливу TTP 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 виявилено, що надекспресія ZFP36 знижує рівень мРНК SH3PXD2A та CTTN та підвищує рівень мРНК SH3PXD2B. Подальші дослідження за допомогою конфокальної мікроскопії фіксованих зразків виявили, що модифіковані клітини MDA-MB-231 з надекспресією TTP мали значно меншу площу, більш короткі та широкі актинові філаменти та скупчення актину в кортикальній частині клітин, що в цілому може свідчити про порушення в організації філаментів. 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. Отримані дані підтримують наявні дослідження та розширюють сьогоднішні уявлення про можливі шляхи прямої або опосередкованої участі TTP в інгібуванні метастазування. За допомогою досліджень зразків пухлин РМЗ 5 молекулярних типів виявлено, що 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 за допомогою дослідження публічно доступної інформації щодо виживаності пацієнтів у когортах з низькою і високою експресією ZFP36, що надається базою даних GEPIA, 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. Отримані в цьому дослідженні дані свідчать про те, що TTP 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 представленій роботі також показано можливість індукції експресії 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 експресії ZFP36 як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну 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 TTP 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. Отримані результати дозволяють поставити під сумнів використання TTP як виключно позитивного прогностичного маркера для пацієнтів із РМЗ принаймні із ТНРМЗ та розширюють сучасні уявлення щодо впливу доксорубіцину на цитоскелет. Представлені результати розширюють уявлення про вплив TTP на інвазивний потенціал клітин ТНРМЗ, розкривають нові потенційні аспекти його функціонування як регулятора морфології та рухливості цих клітин, характеризують зміни експресії SH3PXD2A, SH3PXD2B та CTTN під впливом конститутивної надекспресії TTP в клітинах ТНРМЗ, а також під впливом DXR. Крім того, дане дослідження виявляє спірність застосування TTP як суто позитивного прогностичного біомаркеру РМЗ.

2. 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. 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, while SH3PXD2B mRNA levels increased. 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. Moreover, time-lapse live-cell imaging revealed that modified cells had decreased motility and directed movement capacity and demonstrated reduced invasive potential. 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 was 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. 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 TNBC, 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 μM). 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. The data obtained may limit the use of TTP as a purely positive prognostic marker for BC patients, particularly those with the TNBC, and expand current understanding of the effects of doxorubicin on the cytoskeleton. The presented results 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.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки: Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності: Впровадження нових технологій та обладнання для якісного медичного обслуговування, лікування, фармацевтики

Підсумки дослідження: Теоретичне узагальнення і вирішення важливої наукової проблеми

Публікації:

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Наукова (науково-технічна) продукція: методи, теорії, гіпотези

Соціально-економічна спрямованість: поліпшення якості життя та здоров'я населення, ефективності діагностики та лікування хворих

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації: Планується до впровадження

Зв'язок з науковими темами: 0121U110628, НФДУ № 2020.01/0021

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Кропивко Сергій Вікторович

2. Sergii V. Kropyvko

Кваліфікація: к. б. н., с.н.с., 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-2685-080X

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гарманчук Людмила Василівна

2. Liudmila Garmanchuk

Кваліфікація: д.б.н., с.н.с., 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-1527-2346

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Код за ЄДРПОУ: 02070944

Місцезнаходження: вул. Володимирська, буд. 60, Київ, 01033, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Задворний Тарас Володимирович

2. Taras Zadvornyi

Кваліфікація: к.б.н., н.с., 14.01.07

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0003-3033-3976

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05416946

Місцезнаходження: вул. Васильківська, буд. 45, Київ, 03022, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Геращенко Ганна Володимирівна

2. Ganna Gerashchenko

Кваліфікація: д. б. н., с.д., 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0002-4700-5736

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Телегєєв Генадій Дмитрович
2. Gennady Telegeev

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.03

Ідентифікатор ORCID ID: 0000-0003-0270-4397

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, Київ, 03143, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	Філоненко Валерій Вікторович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	Філоненко Валерій Вікторович
Відповідальний за підготовку облікових документів	Крупська І.В.
Реєстратор	УкрІНТЕІ
Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності	Юрченко Тетяна Анатоліївна