

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В. ПАЛЛАДИНА**

ХАРЬКОВА АНАСТАСІЯ ПАВЛІВНА

УДК 577.112.7:616

**ERN1-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ СИСТЕМИ
IGF У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Мінченко Олександр Григорович,
завідувач відділу молекулярної біології
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
професор кафедри біохімії
Національного університету біоресурсів і
природокористування України,

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Телегесв Геннадій Дмитрович,
завідувач відділу молекулярної генетики
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України

Захист відбудеться “30” січня 2017 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9) та на офіційному сайті інституту www.biochemistry.org.ua.

Автореферат розісланий “27” грудня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з найбільш актуальних проблем сучасної біохімії є дослідження механізмів онкогенної трансформації, регуляції процесів виживання та загибелі клітин під час розвитку злоякісних новоутворень на молекулярному і клітинному рівнях, а також ідентифікація генів та протеїнів, що можуть бути потенційними мішенями для пошуку нових стратегій пригнічення пухлинного росту. Дослідження ролі системи подібного до інсуліну фактора росту IGF (insulin like growth factor) у регуляції проліферації клітин гліоми людини є важливою ланкою в ланцюзі молекулярно-біологічних та біохімічних досліджень у цій галузі, оскільки гліоми є найбільш поширеними та агресивними пухлинами центральної нервової системи, що важко піддаються терапії, та лише 10% пацієнтів з таким діагнозом живуть більше двох років [Santosh V., 2010].

Процеси проліферації, апоптозу та пухлиноутворення тісно пов'язані з внутрішньоклітинними шляхами трансдукції сигналів, які є високо чутливими до впливу різноманітних сторонніх чинників. Зміна клітинного гомеостазу, вмісту йонів Ca^{2+} , нестача глюкози, амінокислот, дія хімічних токсинів, оксидативного стресу, гіпоксії, інгібіторів глікозилування, тощо викликає в клітині комплекс реакцій відомих як реакції стресу ендоплазматичного ретикулума (ER). Це є адаптивна реакція клітини на накопичення в люмені ER невірно згорнутих чи незгорнутих протеїнів [Sun H., 2016]. Ключовими сенсорами стресу ER є три сигнальні системи, локалізовані в мембрані ER: транскрипційний фактор ATF6 (activating transcription factor 6), протеїнкіназа PERK (RNA-activated protein kinase-like ER kinase) та сенсорно-сигнальний ензим ERN1 (endoplasmic reticulum to nuclei-1 signaling), відомий також як IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 α) [Nagelkerke A., 2014]. ERN1 належить до гетерогенного класу неспецифічних серин-треонінових протеїнкіназ (EC 2.7.11.1), а також має ендорибонуклеазну активність. Цей шлях є найбільш універсальним та еволюційно консервативним механізмом відповіді клітини на стрес ER. Шаперони, що за нормальних умов перебувають у комплексі з ERN1, при накопиченні у люмені ER неправильно згорнутих протеїнів дисоціюють, внаслідок чого відбувається димеризація, автофосфорилування та активація ендорибонуклеазного домену ERN1, який здійснює сплайсинг мРНК транскрипційного фактора XBP1 (X-box binding protein 1) та деградацію низки мРНК [Таоуї S., 2013]. Після трансляції мРНК XBP1 утворюється його сплайсована форма (XBP1s), що регулює експресію генів, продукти яких відповідають за фолдинг протеїнів, виживання або апоптоз в залежності від інтенсивності і тривалості стресових впливів [Clarke H., 2014].

Активація реакцій стресу ER в пухлинних клітинах, що характеризуються швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, є ознакою їх адаптації до умов гіпоксії, нестачі поживних речовин, а також свідчить про важливу роль стресу ER у регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин [Chevet E., 2015]. Важлива роль ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його активності має протипухлинні ефекти. Зокрема, було показано, що клітини гліоми лінії U87

із повним пригніченням ERN1 характеризуються меншими розмірами, нижчою щільністю, уповільненням росту, зниженням здатності до утворення пухлин на моделі курячих ембріонів, при чому пригнічення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму має ще більш виражені протипухлинні ефекти [Auf G., 2013; Minchenko O. H., 2015], але молекулярні механізми пригнічення росту пухлин шляхом інгібування ERN1 поки не до кінця з'ясовані та потребують більш детального вивчення. Логічно припустити, що певну роль тут можуть грати секреторні фактори росту та протеїни, що регулюють їх активність, зокрема система IGF, компоненти якої залучені до регуляції проліферації і диференціації клітин як у нормі, так і за багатьох патологічних станів [Lee H., 2014]. Дослідження змін експресії генів системи IGF за умов пригнічення ензиму ERN1 дозволить з'ясувати їх можливу роль у регуляції проліферації клітин гліоми із залученням сигнальної системи ERN1 і буде сприяти ідентифікації генів-мішеней для розробки нових підходів до лікування гліом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2013–2016 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011–2015 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012–2016 рр.) та «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.), на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» № ДР 0111U004648 (2011–2015 рр.).

Мета і задачі роботи. Метою дисертаційної роботи було вивчення експресії генів протеїнів системи подібного до інсуліну фактора росту у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функціональної активності ERN1, сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, для з'ясування їх ролі в опосередкованому ERN1 контролі процесів проліферації клітин гліоми.

Для досягнення мети було сформульовано такі задачі:

1. Дослідити залежність експресії генів основних компонентів системи подібного до інсуліну фактора росту (*IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IRS2*, *IGFBP1-6*) у клітинах гліоми лінії U87 від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

2. Вивчити залежність регуляції експресії *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGFBP3* від функціональної активності ендорибонуклеазного домену ERN1.

3. Дослідити вплив гіпоксії на експресію генів системи подібного до інсуліну фактора росту у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

4. Вивчити вплив дефіциту глюкози на експресію генів родини *IGFBP* в клітинах гліоми лінії U87 та роль ензиму ERN1 у цій регуляції.

5. Оцінити вплив дефіциту глутаміну на експресію генів родини *IGFBP* у нормальних та ERN1-дефіцитних клітинах гліоми лінії U87.

Об'єкт дослідження: механізми ERN1-опосередкованої проліферації клітин гліоми людини.

Предмет дослідження: рівень експресії генів, що кодують протеїни системи подібного до інсуліну фактора росту у клітинах гліоми людини лінії U87 з пригніченою функціональною активністю сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії, дефіциту глутаміну або глюкози.

Методи дослідження: культивування клітин гліоми лінії U87 та її субліній, виділення тотальної РНК із культури клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості та спектральних характеристик РНК, електрофорез нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції, полімеразна ланцюгова реакція, у тому числі кількісна полімеразна ланцюгова реакція для оцінки рівня експресії генів, отримання цитозольних та ядерних фракцій протеїнів із культури клітин, осадження секреторних протеїнів з культурального середовища, спектрофотометричне визначення кількості протеїнів, електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі, імуноблотинг, комп'ютерний аналіз результатів, отриманих за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції, статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що експресія генів *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6* та *IGF2BP3* залежить від функціональної активності ERN1 і може відігравати роль у контролі проліферації клітин гліоми. Встановлено, що рівень експресії генів основних пропроліферативних факторів (*IGF1*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3*) знижується за пригнічення ERN1 у клітинах гліоми, причому знижується також і рівень протеїнів *IGF2*, *IGFBP2* та *IGF2BP3*. У той же час, рівень експресії генів антипроліферативних факторів (*IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP5*) підвищується за умов пригнічення активності ензиму ERN1, причому *IGFBP3*, як основний інгібітор IGF, може грати ключову роль у пригніченні проліферації клітин гліоми за умов інгібування ензиму ERN1. Виявлено, що гіпоксія посилює експресію генів *IRS2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* і *IGFBP6*, але пригнічує експресію *IGF2* та *IRS1*, не впливаючи на рівень експресії *IGF1*, *IGF1R* і *IGFBP5* у клітинах гліоми. Вперше показано, що пригнічення ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії на експресію частини досліджених генів, а це свідчить про різні механізми гіпоксичної регуляції експресії генів системи IGF. Показано, що за умов дефіциту глутаміну або глюкози експресія гена *IGFBP3* залежить від активності ензиму ERN1, експресія гена *IGFBP1* залежить від активності ERN1 лише за відсутності глюкози, а *IGFBP5* – за відсутності глутаміну. Отримані результати допомагають визначити роль ключових регуляторних протеїнів системи IGF у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ER ERN1 та протипухлинні ефекти на рівні клітини, а також молекулярні механізми впливу гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну на ERN1, основну сигнальну систему відповіді клітини на стрес ER.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції експресії ключових факторів росту, їх рецепторів та регуляторних протейнів необхідно для з'ясування механізмів контролю проліферації і виявлення перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин, окрім того, отримані результати вказують на взаємозв'язок сигнальної системи стресу ER з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин у регуляції експресії генів, залучених до контролю процесів проліферації, що необхідно враховувати при розробці нових підходів до терапії злоякісних новоутворень.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, яке було сплановано та виконано автором відповідно до програми експериментальних досліджень, проведених протягом 2013-2016 рр. Дисертантом було самостійно виконано аналіз літературних даних за темою роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню експресії генів, що кодують основні компоненти системи подібного до інсуліну фактора росту, проведено статистичну обробку отриманих даних. Окремі дослідження по роботі з культурами клітин евкаріот та вивченню експресії окремих генів проводились за участі н.с., к.б.н. Карбовського Л. Л., н.с., к.м.н. Мінченка Д. О., м.н.с. Цимбал Д. О.; планування експерименту, розробка методології, аналіз та обговорення результатів було проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф. Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на Всеукраїнських та Міжнародних форумах, з'їздах та конференціях: 3rd meeting of the EASD Study Group for the Genetics of Diabetes «The Genetics of Diabetes in the Post-Genome Wide Association Era», Smolenice Castle, Slovakia, 2011; Bridges in life sciences 7th annual conference «Science and Art for the Advancement in Medicine» Budapest, Hungary, 2012; XI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна», Київ, Україна, 2013; II Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», Дніпропетровськ, Україна, 2013; 7th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, Lviv, Ukraine, 2013; III Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», Донецьк, Україна, 2014; FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014; XI Український біохімічний конгрес, Київ, Україна, 2014; XI International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology», Lviv, Ukraine, 2015; III Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», Дніпропетровськ, Україна, 2015; конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016», Київ, Україна, 2016; а також на розширеному засіданні кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2016) та науковому семінарі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Київ, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 робіт (з них 9 експериментальних та 2 оглядові статті) в іноземних та вітчизняних фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 12 тез доповідей у матеріалах міжнародних та Всеукраїнських конференцій та форумів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках друкованого тексту та складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних джерел, що включає 238 посилань. Робота містить 30 рисунків, 6 таблиць та 3 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури наведено сучасні відомості про молекулярні механізми регуляції проліферації та онкогенної трансформації клітин за участі системи подібного до інсуліну фактора росту (IGF). Проаналізовано основні ефекти факторів росту IGF1 та IGF2 на рівні клітини, механізми передачі сигналу від їх рецептора (IGF1R) в середину клітини та регуляції активності IGF за допомогою протеїнів родини IGFBR. Особлива увага приділяється також незалежним від IGF ефектам IGFBR та диференційній ролі окремих протеїнів цієї родини у регуляції клітинної проліферації, міграції та апоптозу. Окремий розділ присвячено молекулярним механізмам відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума як важливого фактора регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин, а також ролі сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на клітинах гліоми людини лінії U87, отриманих із АТСС (США). У роботі використовували три сублінії цієї лінії клітин. Перша (контрольна) сублінія була отримана шляхом відбору стабільно трансфектованих клонів із надекспресією «пустого» вектора рсDNA3.1+, який було використано для створення домінант-негативних конструкцій ензиму ERN1. Клітини другої сублінії мали пригнічену протеїнказну та ендорибонуклеазну активності ERN1, третьої – пригнічену лише ендорибонуклеазну активність ERN1 завдяки надекспресії відповідної домінант-негативної конструкції. Для порівняння пухлинних клітин гліоми з нормальними використовували лінію нормальних астроцитів людини NHA/TS, отриману від проф. Sasai K. та Tanaka S. (Японія). Для культивування клітин використовували повноцінне поживне середовище DMEM (Gibco, США), що містило 2 мМ глютаміну та 4,5 г/л глюкози, та середовище DMEM без глютаміну або глюкози. Клітини в цьому середовищі культивували протягом 16 год. Для створення умов гіпоксії *in vitro*, клітини культивували в інкубаторі в атмосфері 3% O₂, 5% CO₂ та 92% N₂ протягом 16 год. Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума до культури клітин вносили тунікаміцин (0,01 мг/мл) та інкубували протягом 2 год.

Екстракцію тотальної РНК з клітин гліоми здійснювали за допомогою «TRIzol Reagent» (Invitrogen, США) [Minchenko O. H., 2004]. Концентрацію РНК

вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) за довжини хвилі 260 нм. Синтез комплементарної ДНК методом зворотної транскрипції [Minchenko O. H., 2008] проводили за допомогою набору «Quantitect Reverse Transcription» (Qiagen, Німеччина). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували набір «HotStartTaq Master Mix Kit» (Qiagen, Німеччина), кількісної ПЛР – набір «2xSYBR Green Mix» (AB gene, Thermo Fisher Scientific, Великобританія), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина). Кількісну ПЛР проводили на ампліфікаторах Mx 3000P QPCR (Stratagene, США) та 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Аналіз результатів кількісної ПЛР виконували за допомогою програми “Differential expression calculator”, статистичний аналіз – у програмі STATISTICA v.7. Результати виражали як $M \pm m$. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за умови $P < 0,05$. Аналіз вмісту протеїнів у ядерних та цитозольних екстрактах, виділених із клітин гліоми [Armstead V., 1997], а також секреторних протеїнів із культурального середовища проводили методом електрофорезу у поліакриламідному гелі та імуноблотингу.

Результати досліджень та їх обговорення

Експресія альтернативного сплайс-варіанту транскрипційного фактора XBP1 у клітинах гліоми лінії U87 за стресу ендоплазматичного ретикулула. Доказом реакції клітин на індукований тунікаміцином стрес ER із залученням сигнального шляху ERN1 є підвищення кількості сплайсованої форми транскрипційного фактора XBP1 (XBP1s) у цитозольній і, особливо, в ядерній фракції протеїнів, отриманих із клітин гліоми лінії U87 після їх інкубації із тунікаміцином (рис. 1). Неактивна форма ERN1, що не містить протеїнкіназного та ендорибонуклеазного доменів, не може каталізувати сплайсинг мРНК XBP1. Надекспресія цієї форми ERN1 у клітинах сублінії dnERN1, трансфекованих домінант-негативною конструкцією, призводить до конкурентного витіснення активної форми ERN1 через значно більший вміст неактивної форми в клітині.

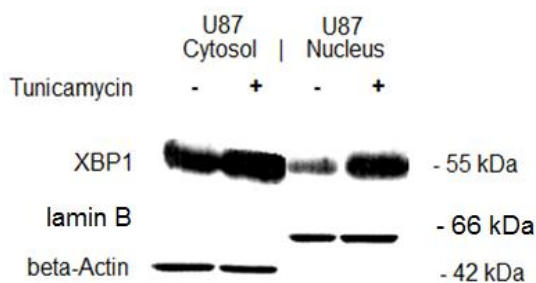


Рис. 1. Блотограма транскрипційного фактора XBP1 у цитозольній (Cytosol) та ядерній (Nucleus) фракції протеїнів клітин гліоми лінії U87 за умов індукції стресу ER тунікаміцином. Тут і далі β-актин (beta-Actin) та ламін В (lamin B) використовували в якості контролю кількості протеїну в цитозолі та ядрі відповідно

Для підтвердження відсутності активного ензиму ERN1 у клітинах сублінії dnERN1 також було досліджено утворення сплайсованої форми мРНК XBP1 у клітинах цієї сублінії та в нормальних клітинах гліоми лінії U87. Для цього було

проведено ПЛР з парою праймерів, що гібридизувались на кДНК ХВР1, оточуючи нуклеотидну послідовність, яка після сплайсингу не входить до складу зрілої молекули мРНК ХВР1s. Сплайсинг мРНК ХВР1 відбувається в нормальних клітинах гліоми лінії U87, тоді як в сублінії dnERN1 сплайсингу не відбувалось (сплайс форма мРНК є на 26 нуклеотидів меншою, рис. 2).

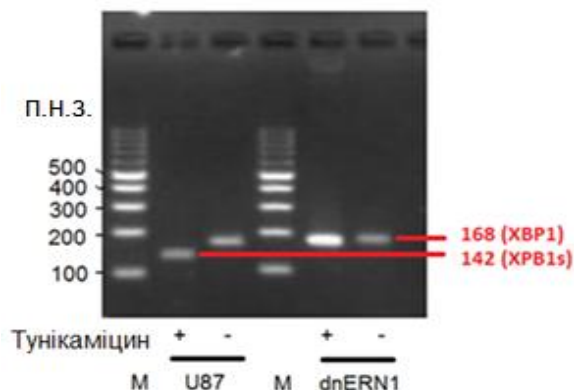


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР кДНК ХВР1 з використанням специфічних праймерів.

Примітки: F – прямий праймер; R – зворотній праймер; uXBP1 – повнорозмірна (несплайсована) форма транскрипційного фактора ХВР1; sXBP – сплайсована форма ХВР1; М – маркери молекулярної маси

Таким чином, було показано, що клітини гліоми людини лінії U87 адекватно реагують на додавання до культурального середовища інгібітору глікозилювання антибіотика тунікаміцину, який моделює стрес ER і це проявляється у збільшенні відносної кількості протеїнів ERN1 та sXBP у цитозольній фракції протеїнів, а також функціонально активної сплайсованої форми транскрипційного фактора sXBP1 в ядрі. Доведено, що клітини гліоми сублінії dnERN1, трансфіковані домінант-негативною конструкцією, експресують ERN1 без ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей, оскільки автофосфорилування ERN1 та утворення альтернативного сплайс варіанту мРНК (sXBP1) транскрипційного фактора ХВР1 в них не відбувається.

Експресія генів, що кодують основні компоненти системи подібного до інсуліну фактора росту в клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1. Ліганди, рецептори та регуляторні протеїни, що входять до системи IGF, за їх основними ефектами на рівні клітини можна розділити на дві великі групи: пропроліферативні (IGF1 та IGF2, які власне є факторами росту; IGF1R – їх рецептор; внутрішньоклітинні адаптерні протеїни IRS1 та IRS2, що передають сигнал від рецептора всередину клітини; IGF2BP3 – активатор трансляції мРНК IGF2; IGFBP1, IGFBP2 та IGFBP6, що концентрують IGF біля поверхні клітини, підсилюючи в такий спосіб їх ростові ефекти) та антипроліферативні (IGFBP3, IGFBP4 та IGFBP5, які зв'язують розчинні IGF у неактивні комплекси, виступаючи їх антагоністами). За відсутності функціонально активного ензиму ERN1 було показано зниження рівня експресії генів *IGF1* (на 57%), *IGF2* (на 38%), *IGFBP1* (на 54%), *IGFBP2* (на 54%), *IGFBP6* (на 54%) та *IGF2BP3* (на 60%) на рівні мРНК, в той же час спостерігали підвищення експресії генів *IGF1R* (на 26%), *IRS2* (на 270%), *IGFBP3* (на 694%), *IGFBP4* (на 438%), *IGFBP5* (на 475%), при цьому достовірних змін відносного рівня експресії гена *IRS1* за даних експериментальних умов виявлено не було (рис. 3).

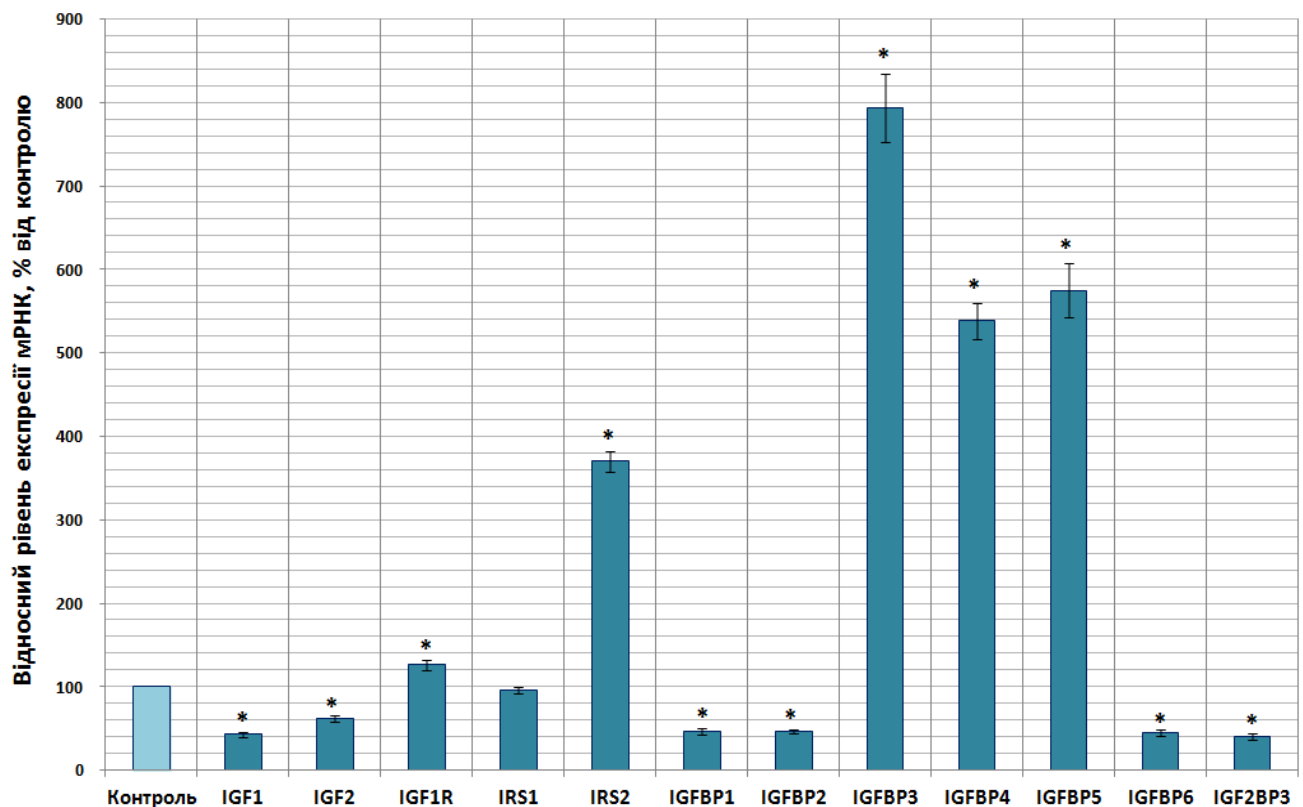


Рис. 3. Рівень експресії генів основних компонентів системи IGF на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1. Тут і далі експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); контроль – клітини гліоми лінії U87, трансфіковані пустим вектором; $n = 3$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Особливу увагу тут привернуло значне зростання (на 694%) експресії *IGFBP3* – головного негативного регулятора активності IGF1 та IGF2. За умов пригнічення активності ензиму ERN1 було показано також значне зростання кількості протеїну *IGFBP3* як у цитозольній фракції протеїнів клітин гліоми лінії U87 та її сублінії dnERN1 (рис. 4, А), так і при аналізі вмісту цього протеїну в культуральному середовищі (рис. 4, Б). На останній блотограмі також показано, що кількість *IGFBP3*, що секретується клітинами гліоми у поживне середовище, у порівнянні з нормальними астроцитами є значно нижчою.

Оскільки існує багато свідчень того, що ріст гліоми специфічно регулюється IGF2, особливу увагу ми також звернули на вивчення експресії цього гена та генів, які кодують синтез специфічних регуляторів активності IGF2, як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну. Зокрема, було показано зниження відносного рівня експресії гена ростового фактора IGF2 та одночасно – зниження відносного рівня експресії гена позаклітинного позитивного регулятора активності IGF2 – *IGFBP2*, а також внутрішньоклітинного активатора транскрипції мРНК IGF2 – *IGF2BP3* у клітинах гліоми людини лінії U87 за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу ER ERN1.

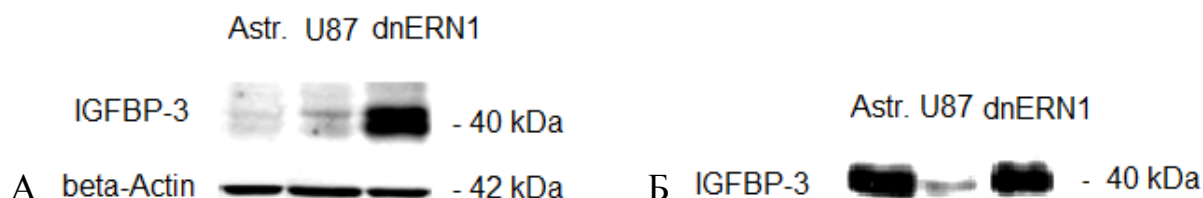


Рис. 4. А – блотограма протеїну IGFBP3 у цитозольній фракції протеїнів нормальних астроцитів (Astr.), клітин гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1 (dnERN1); Б – блотограма протеїну IGFBP3 в культуральному середовищі після інкубування нормальних астроцитів (Astr.), клітин гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1 (dnERN1) в середовищі DMEM без ембріональної сироватки теляти протягом 48 год.

Дослідження кількості відповідних протеїнів показало, що кількість IGF2 (рис. 5), IGFBP2 (рис. 6, А) та IGF2BP3 (рис. 6, Б) у ERN1-дефіцитних клітинах знижується і що вміст протеїнів IGF2 та IGF2BP3 не залежить від стресу EP, який моделювали шляхом додавання до культурального середовища інгібітора глікозилування антибіотика тунікаміцину (рис. 5 і рис. 6, Б).

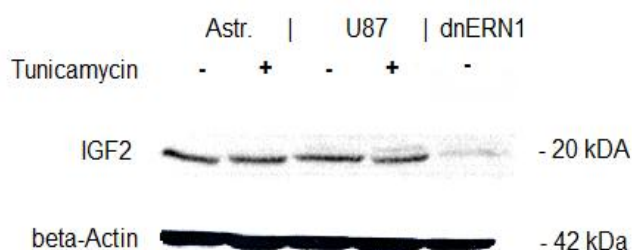


Рис. 5. Блотограма протеїну IGF2 в цитозольній фракції протеїнів нормальних астроцитів (Astr.), контрольних клітин гліоми (U87) та клітин з пригніченням активності ензиму ERN1 (dnERN1)

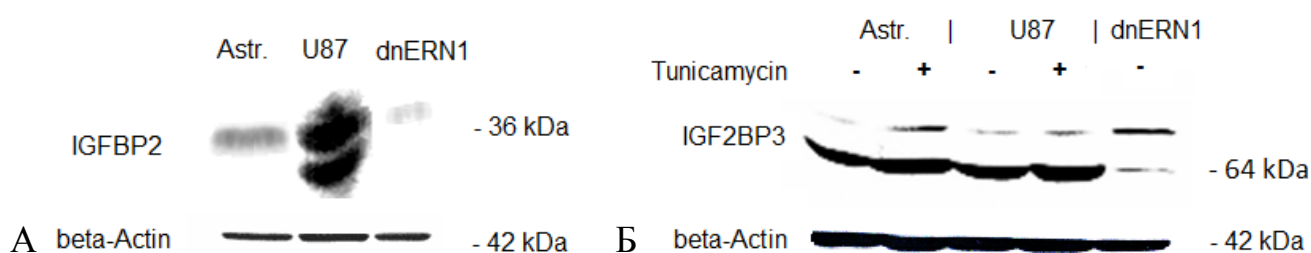


Рис. 6. А – блотограма протеїну IGFBP2 у цитозольній фракції протеїнів нормальних астроцитів (Astr.), клітин гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1 (dnERN1); Б – блотограма протеїну IGF2BP3 в цитозольній фракції протеїнів нормальних астроцитів (Astr.), контрольних клітин гліоми (U87) та клітин гліоми з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1 (dnERN1)

Таким чином, за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу EP ERN1 у клітинах гліоми людини лінії U87 спостерігається підвищення

відносного рівня експресії генів *IGFBP3* та *IGFBP5*, продукти яких є основними негативними регуляторами активності IGF1, із одночасним зниженням експресії генів *IGF1* та *IGF2*, а також підвищення експресії гена основного негативного регулятора активності IGF2 – *IGFBP4* при зниженні експресії гена активатора трансляції мРНК IGF2 – *IGF2BP3*. Дані про зміну експресії *IGFBP3*, *IGF2*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* на рівні мРНК також підтверджені на рівні протеїну.

Отже, важлива роль в інгібуванні проліферації клітин гліоми за умов пригнічення ензиму ERN1 може належати головному інгібітору IGF – протеїну IGFBP3, рівень якого за цих умов знижується як в цитозольній фракції протеїнів, так і в культуральному середовищі, а також групі протеїнів IGF2, IGFBP2 та IGF2BP3, які є активаторами проліферації та відносна кількість яких за даних експериментальних умов значно знижується. Не виключено, що зниження експресії пропроліферативних генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGFBP6* може бути причетним до пригнічення проліферації клітин гліоми за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ERN1 (рис. 7).

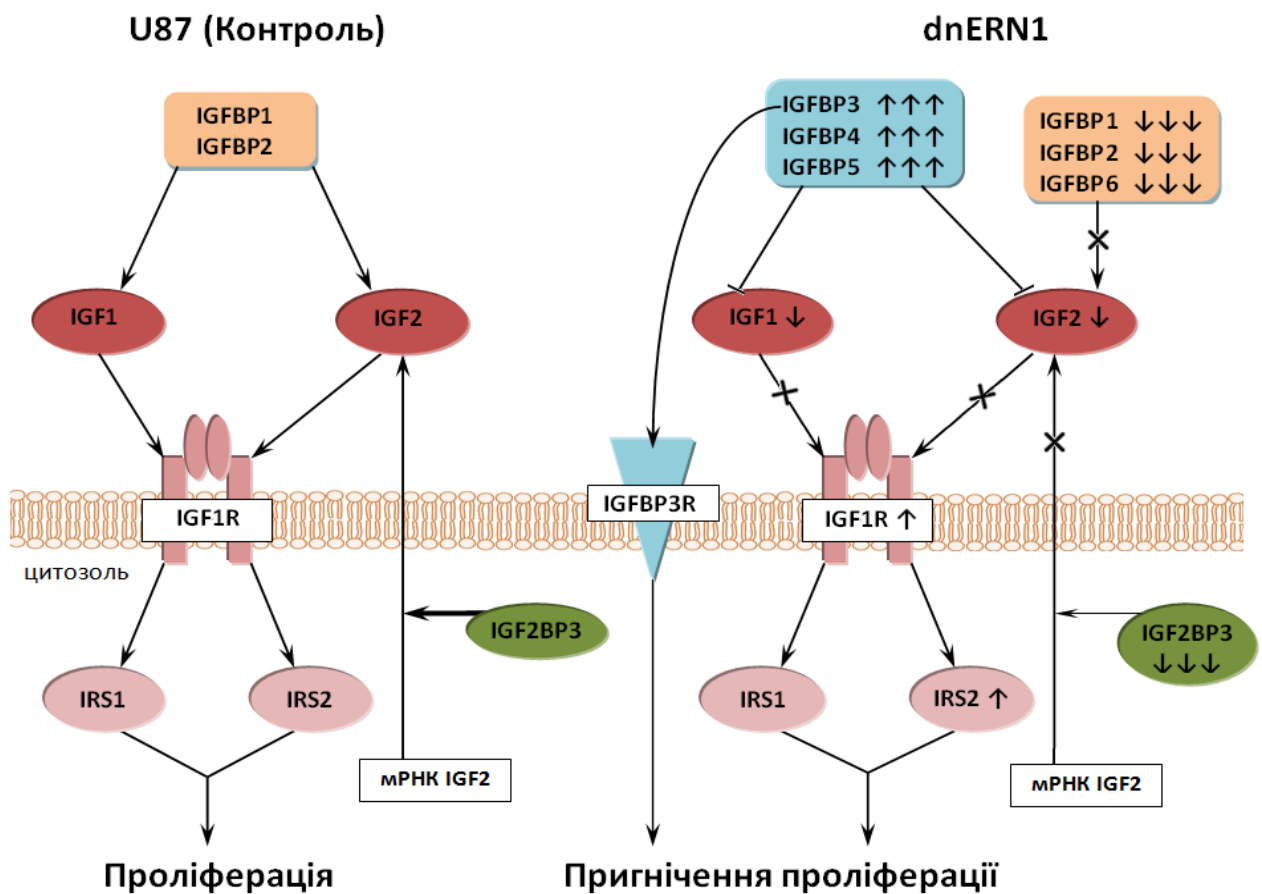


Рис. 7. Зміни у функціонуванні системи IGF та їх можливі ефекти на рівні клітини в нормі (U87) та за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 (dnERN1)

Залежність експресії *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGFBP3* від функціональної активності ендорибонуклеазного домену ERN1. За умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 спостерігається зростання рівня

експресії *IGFBP1* на 701% (dnrERN1 порівняно з контролем на рис. 8), а при моделюванні стресу EP тунікамідом спостерігається ще більше посилення експресії цього гена (на 146% – dnrERN1+t у порівнянні з dnrERN1 на рис. 8), що свідчить про незалежність його експресії за умов стресу EP від ендорибонуклеазної активності ERN1 та можливу участь інших сенсорно-сигнальних систем стресу EP у регуляції експресії гена *IGFBP1*.

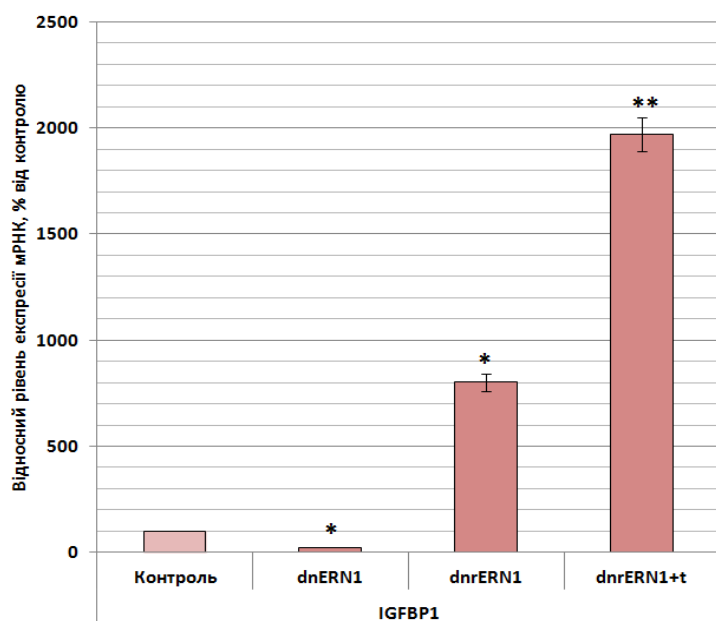


Рис. 8. Експресія *IGFBP1* на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми лінії U87 (Контроль) та її сублініях – з повним пригніченням ензиму ERN1 (dnERN1), з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) та при додаванні тунікаміцину (dnrERN1+t). Тут і далі * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з dnrERN1

За умов інгібування ендорибонуклеазної активності ERN1 спостерігається значне зростання відносної кількості мРНК *IGFBP2* (на 1122% порівняно з контрольними клітинами гліоми). Відносний рівень експресії мРНК *IGFBP2* за індукції стресу EP тунікамідом у цій сублінії клітин не змінюється (dnrERN1+t у порівнянні з dnrERN1 на рис. 9), що свідчить про участь ендорибонуклеазного домену ERN1 у регуляції експресії гена *IGFBP2*.

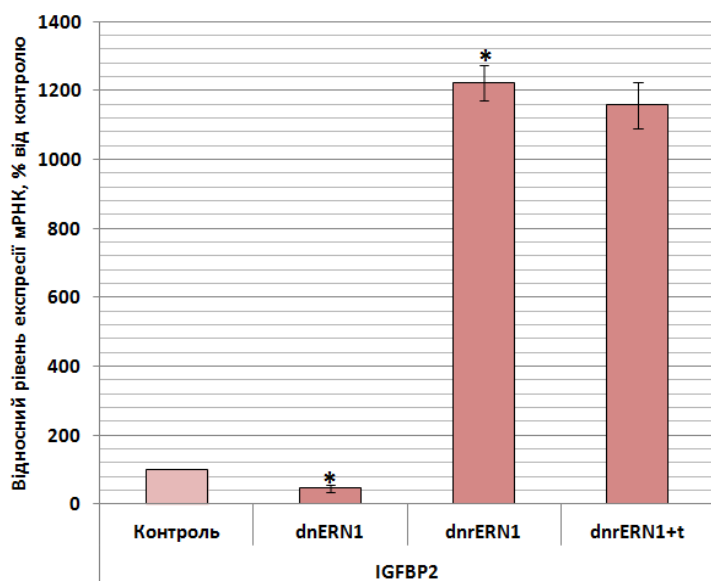


Рис. 9. Експресія *IGFBP2* на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми лінії U87 (Контроль) та її сублініях – з повним пригніченням ензиму ERN1 (dnERN1), з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) та при додаванні тунікаміцину (dnrERN1+t)

За умов пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 (сублінія клітин dnrERN1), статистично достовірних змін відносного рівня експресії *IGFBP3* на рівні мРНК в нативних (контрольних) клітинах гліоми лінії U87 не спостерігається (рис. 10), що може свідчити про важливу роль кіназного домену ERN1 в регуляції експресії гена *IGFBP3* за нормальних умов.

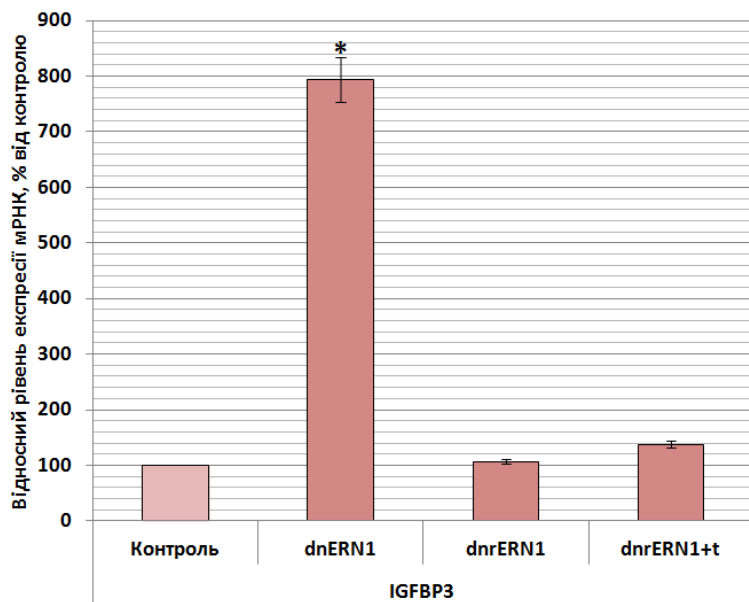


Рис. 10. Експресія *IGFBP3* на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми лінії U87 (Контроль) та її сублініях – з повним пригніченням ензиму ERN1 (dnERN1), з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) та при додаванні тунікаміцину (dnrERN1+t)

Нечутливість експресії гена *IGFBP3* до стресу EP, викликаного додаванням до культурального середовища інгібітору глікозилювання тунікаміцину, що проявляється у відсутності зміни відносного рівня мРНК *IGFBP3* (dnrERN1+t у порівнянні з dnrERN1 на рис. 10), може свідчити про те, що регуляція його експресії за умов стресу EP здійснюється саме за участі ендорибонуклеазного домену ERN1.

Вплив гіпоксії на експресію генів системи подібного до інсуліну фактора росту у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1. За умов гіпоксії спостерігається підвищення відносного рівня експресії генів *IRS2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP6*, пригнічення експресії *IGF2* та *IRS1*, а також відсутність змін відносного рівня експресії *IGF1*, *IGF1R* та *IGFBP5*. Також було показано, що за умов гіпоксії в сублінії клітин гліоми dnERN1, що експресує функціонально неактивний ензим ERN1 спостерігається підвищення відносного рівня експресії генів *IRS1*, *IRS2*, *IGFBP1*, *IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP6*, зниження рівня експресії генів *IGF2* та *IGF2BP3*, а також відсутність змін експресії генів *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP2* та *IGFBP5* (рис. 11). Отримані дані свідчать про відсутність залежності експресії досліджуваних генів, окрім *IRS1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3*, за умов гіпоксії від активності ERN1.

Оскільки *IGFBP3* є основним інгібітором активності IGF1 та IGF2 в організмі та в культурі клітин, дослідження регуляції його експресії потребує особливої уваги. Промотор гена *IGFBP3* містить сайт зв'язування фактора транскрипції HIF-1, який за умов гіпоксії активує його експресію. За гіпоксії нами було показано суттєве зростання відносного рівня експресії *IGFBP3* на рівні мРНК (рис. 12, А).

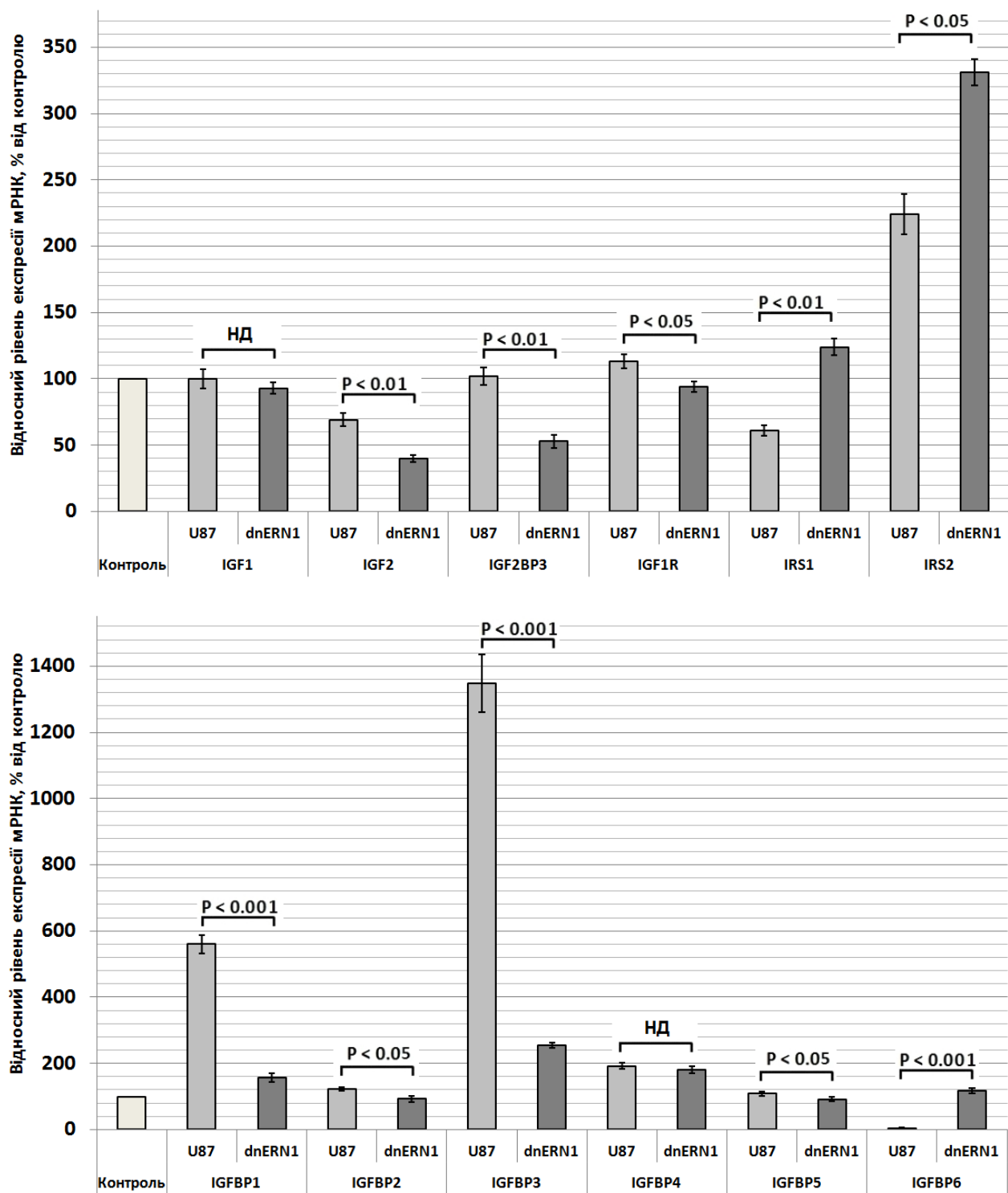


Рис. 11. Рівень експресії генів основних компонентів системи IGF на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) за умов гіпоксії у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1

За умов гіпоксії на рівні протеїну, що секретується клітинами гліоми у культуральне середовище, також було показано значне підвищення кількості IGFBP3 як у нормальних астроцитах людини, так і в контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих пустим вектором, а також у сублінії клітин гліоми з пригніченням ензиму ERN1 (рис. 12, Б).

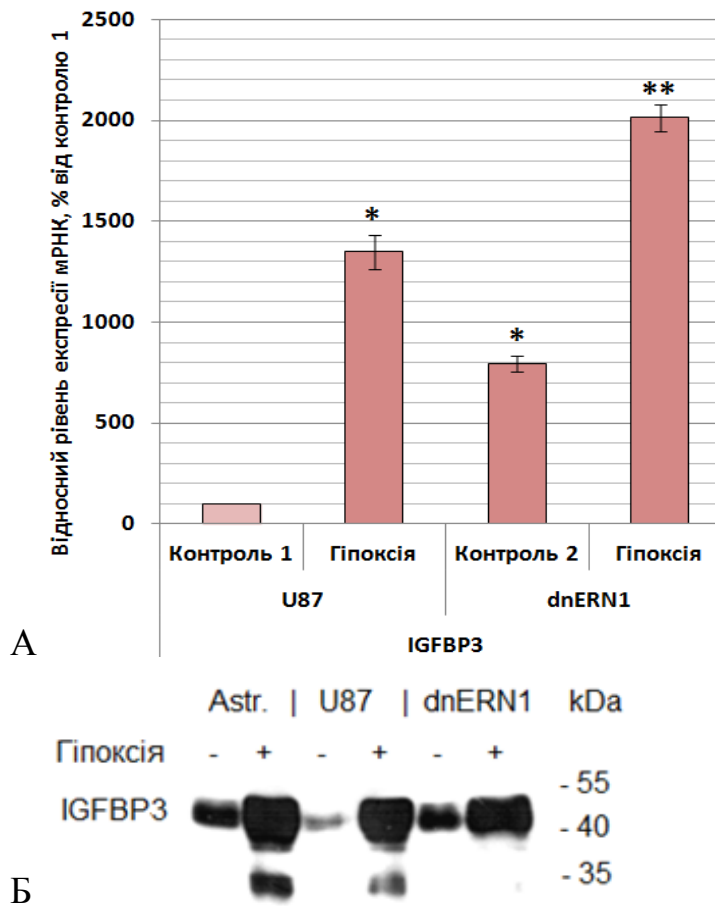


Рис. 12. А – експресія *IGFBP3* на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1 (dnERN1); Б – блотограма протеїну IGFBP3 в культуральному середовищі після інкубування нормальних астроцитів (Astr.), клітин гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченням функціональної активності ензиму ERN1 (dnERN1) в середовищі DMEM без ембріональної сироватки теляти протягом 48 год. за нормальних умов та умов гіпоксії

Вплив дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів *IGFBP* залежно від активності ензиму ERN1. В організмі та в культурі клітин глюкоза є головним субстратом катаболізму, джерелом енергії та вуглецю для процесів біосинтезу, а глутамін є основним донором біогенного азоту. Пухлина, що росте, перебуває в умовах гіпоксії та дефіциту поживних речовин, в тому числі глюкози та глутаміну, що призводить до функціональних перебудов її метаболізму та репрограмування геному з метою адаптації до цих умов. Дослідження залежності експресії генів, що кодують протеїни родини IGFBP за умов дефіциту поживних речовин від активності ензиму ERN1 дозволяє пояснити, чому ERN1-дефіцитні клітини втрачають такі адаптивні властивості. За відсутності глюкози спостерігається зниження відносного рівня експресії генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* та підвищення експресії *IGFBP4* як у контрольних, так і в ERN1-дефіцитних клітинах гліоми. Експресія генів *IGFBP5* та *IGFBP6* не залежить від дефіциту глюкози у нормальних, так і в ERN1-дефіцитних клітинах гліоми. У контрольних клітинах лінії U87 відносний рівень експресії генів *IGFBP1* та *IGFBP3* за умов дефіциту глюкози зростає, а за пригнічення ензиму ERN1 експресія цих генів не залежить від нестачі глюкози (табл. 1).

За умов дефіциту глутаміну спостерігається зростання відносного рівня експресії генів *IGFBP1* та *IGFBP4* як у контролі, так і за відсутності функціонально активного ензиму ERN1, експресія генів *IGFBP2* та *IGF2BP3* не залежить від дефіциту глутаміну як у контрольних, так і в ERN1-дефіцитних клітинах гліоми лінії U87. Експресія генів *IGFBP3* та *IGFBP5* за умов дефіциту глутаміну залежить від функціональної активності ензиму ERN1 (табл. 2).

Таблиця 1

Вплив дефіциту глюкози на відносний рівень експресії мРНК різних IGFBP за умов пригнічення ензиму ERN1 в клітинах гліоми

Гени	U87		dnERN1	
	Контроль1	Дефіцит глюкози*	Контроль2*	Дефіцит глюкози **
<i>IGFBP1</i>	100%	↑ (24%)	↓ (54%)	-
<i>IGFBP2</i>	100%	↓ (18%)	↓ (54%)	↓ (33%)
<i>IGFBP3</i>	100%	↑ (33%)	↑ (694%)	-
<i>IGFBP4</i>	100%	↑ (50%)	↑ (438%)	↑ (63%)
<i>IGFBP5</i>	100%	-	↑ (575%)	-
<i>IGFBP6</i>	100%	-	↓ (54%)	-
<i>IGF2BP3</i>	100%	↓ (17%)	↓ (60%)	↓ (35%)

Примітки (тут і далі): ↑ – відносний рівень експресії зростає; ↓ – відносний рівень експресії знижується; * – відносно контролю 1; ** – відносно контролю 2; сірим виділено гени, експресія яких за експериментальних умов залежить від активності ензиму ERN1.

Таблиця 2

Вплив дефіциту глутаміну на відносний рівень експресії мРНК різних IGFBP за умов пригнічення ензиму ERN1 в клітинах гліоми

Гени	U87		dnERN1	
	Контроль1	Дефіцит глутаміну*	Контроль2*	Дефіцит глутаміну**
<i>IGFBP1</i>	100%	↑ (121%)	↓ (54%)	↑ (161%)
<i>IGFBP2</i>	100%	-	↓ (54%)	-
<i>IGFBP3</i>	100%	↑ (147%)	↑ (694%)	-
<i>IGFBP4</i>	100%	↑ (150%)	↑ (438%)	↑ (149%)
<i>IGFBP5</i>	100%	-	↑ (575%)	↓ (57%)
<i>IGF2BP3</i>	100%	-	↓ (60%)	-

Таким чином, відсутність залежності змін у регуляції експресії більшості генів системи IGF від активності ензиму ERN1 за умов гіпоксії та дефіциту поживних речовин (глутаміну та глюкози), є свідченням нездатності клітин гліоми у повній мірі перебудувати свій метаболізм для адаптації до пригнічення цього ензиму, що у свою чергу свідчить на користь можливості вважати ензим ERN1 перспективною мішенню для протипухлинної терапії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено нові дані щодо механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов інгібування функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1, зокрема виявлено зміни в експресії генів системи подібного до інсуліну фактора росту за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87, а

також залежність змін в експресії окремих генів цієї системи від гіпоксії та умов дефіциту глюкози або глутаміну.

1. Встановлено, що за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 знижується рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP6* та *IGF2BP3*, генів *IGF1R*, *IRS2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP5* – підвищується, що свідчить про важливу роль протеїнів системи IGF у пригніченні росту клітин гліоми лінії U87 за цих умов.

2. Показано, що рівень експресії *IGFBP3*, основного негативного регулятора активності IGF, зростає як на рівні мРНК, так і протеїну у клітинах та в культуральному середовищі за умов пригнічення ензиму ERN1.

3. Встановлено, що рівень експресії гена *IGF2*, продукт якого є основним позитивним регулятором проліферації клітин гліоми, знижується як на рівні мРНК, так і протеїну за умов інгібування ензиму ERN1, причому знижується експресія і його позитивних регуляторів *IGFBP2* та *IGF2BP3*, що свідчить про можливий їх внесок у пригнічення проліферації клітин гліоми за даних експериментальних умов.

4. Виявлено, що пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 посилює експресію генів *IGFBP1* та *IGFBP2* і не впливає на експресію *IGFBP3* у клітинах гліоми, а індукція стресу ендоплазматичного ретикулума тунікамідіном збільшує рівень експресії лише гена *IGFBP1*, а це свідчить про участь інших систем стресу в регуляції експресії цього гена.

5. Показано, що за умов гіпоксії спостерігається підвищення відносного рівня експресії генів *IRS2*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4* та *IGFBP6*, пригнічення експресії *IGF2* та *IRS1* за відсутності істотних змін в експресії генів *IGF1*, *IGF1R* і *IGFBP5* у контрольних клітинах гліоми лінії U87.

6. Виявлено залежність ефектів гіпоксії на експресію частини досліджених генів від пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми, що свідчить про різні механізми гіпоксичної регуляції експресії генів системи IGF.

7. Встановлено, що за умов дефіциту глюкози або глутаміну пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 не впливає на регуляцію експресії більшості генів родини *IGFBP*, окрім гена *IGFBP3*, експресія якого залежить від активності ензиму ERN1 за умов відсутності у поживному середовищі глутаміну або глюкози, а також генів *IGFBP1* – лише за відсутності глюкози та *IGFBP5* – лише за відсутності глутаміну.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Insulin receptor, *IRS1*, *IRS2*, *INSIG1*, *INSIG2*, *RRAD*, and *BAIAP2* gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation / D. O. Minchenko, **A. P. Kharkova**, O. V. Hubenia, O. H. Minchenko // *Endocr. Regul.* – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 15 – 26. (Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів *IRS1*, *IRS2*, *INSIG1* та *INSIG2* у ERN1-дефіцитних клітинах гліоми, опрацьовано літературу, підготовлено матеріали до друку).

2. Експресія генів *IGFBP1*, *IGFBP2* та *IGF2BP3* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за умов дефіциту глутаміну і глюкози /

А. П. Харькова, Д. О. Мінченко, Д. О. Цимбал, О. Г. Мінченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2014. – № 3(68). – С. 24 – 29. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів IGFBP1, IGFBP2 та IGF2BP3 у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

3. Effect of hypoxia on the expression of genes that encode some IGFBP and CCN proteins in U87 glioma cells depends on IRE1 signaling / О. Н. Minchenko, **А. Р. Kharkova**, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy / Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, N 6. – P. 52 – 63. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії деяких генів родин IGFBP та CCN у клітинах гліоми за гіпоксії в залежності від пригнічення функціональної активності ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

4. Expression of insulin-like growth factor binding protein genes and its hypoxic regulation in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress / D. O. Minchenko, **А. Р. Kharkova**, L. L. Karbovskiy, О. Н. Minchenko // Endocr. Regul. – 2015. – Vol. 49, N 2. – P. 73 – 83. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії окремих генів родини IGFBP у клітинах гліоми за гіпоксії в залежності від пригнічення функціональної активності ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

5. IRE1 inhibition affects the expression of insulin-like growth factor binding protein genes and modifies its sensitivity to glucose deprivation in U87 glioma cells / D. O. Minchenko, **А. Р. Kharkova**, D. O. Tsybmal, L. L. Karbovskiy, О. Н. Minchenko / Endocr. Regul. – 2015. – Vol. 49, N 4. – P. 185 – 197. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії окремих генів родини IGFBP у клітинах гліоми за дефіциту глюкози в залежності від пригнічення функціональної активності ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

6. Effect of hypoxia on the expression of genes encoding insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without IRE1 function / D. O. Minchenko, **А. Р. Kharkova**, О. V. Halkin, L. L. Karbovskiy, О. Н. Minchenko / Endocr. Regul. – 2016. – Vol. 50, N 2. – P. 43 – 54. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів IGF на рівні мРНК та протеїну у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1 за умов гіпоксії, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено ілюстрації).*

7. Expression of IGFBP6, IGFBP7, NOV, CYR61, WISP1 and WISP2 genes in U87 glioma cells in glutamine deprivation conditions / О. Н. Minchenko, **А. Р. Kharkova**, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, N 3. – P. 66 – 77. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії окремих генів родин IGFBP та CCN у клітинах гліоми за дефіциту глутаміну залежності від пригнічення активності ERN1, опрацьовано літературу за темою, підготовлено ілюстрації).*

8. Експресія генів подібних до інсуліну факторів росту та їх рецептора у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1 за умов дефіциту глюкози / **А. П. Харькова**, О. Г. Мінченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2016. – № 1(20). – С. 44 – 49. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів*

подібних до інсуліну факторів росту та їх рецептора у клітинах гліоми за дефіциту глюкози в залежності від пригнічення функціональної активності ERN1, підготовлено матеріали до друку).

9. Експресія генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* у клітинах гліоми лінії U87 за умов дефіциту глутаміну / **А. П. Харькова**, О. Г. Мінченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2016. – № 1(71). – С. 41 – 45. (Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів рецептора подібного до інсуліну фактора росту та *IGFBP* у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1 за дефіциту глутаміну, підготовлено матеріали до друку).

10. Стрес ендоплазматичного ретикулула, його сенсорно-сигнальні системи та роль у регуляції експресії генів за зляклого росту і гіпоксії / О. Г. Мінченко, **А. П. Харькова**, Т. В. Бакалець, І. В. Кривдюк // Укр. біохім. ж. – 2013. – Т. 85, N 5. – С. 5 – 16. (Здобувачем особисто опрацьовано відповідну літературу та підготовлено частину матеріалів до друку).

11. Endoplasmic reticulum stress and angiogenesis in cancer / D. O. Minchenko, K. I. Kubaichuk, O. V. Hubenia, I. V. Kryvdiuk, **A. P. Kharkova**, R. M. Herasymenko, R. V. Sulik, L. L. Karbovskiyi, O. H. Minchenko // Int. J. Physiol. Pathophysiol. – 2014. – Vol. 5, N 3. – P. 261 – 281. (Здобувачем особисто опрацьовано літературу та підготовлено частину матеріалів до друку).

12. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the insulin receptor, IRS1, IRS2 and RRAD mRNA expression in glioma U87 cells with ERN1 loss of function / O. Minchenko, **A. Kharkova**, M. Moenner, D. Minchenko // The Genetics of diabetes in the Post-Genome Wide Association Era. Third Meeting of the EASD Study Group for the Genetics of Diabetes (EASD-SGGD), September 30 – October 3, Smolenice Castle, 2011. – P. 150.

13. ERN1 signaling system as a new target for anticancer therapy / S. V. Danilovskiyi, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiyi, **A. P. Kharkova**, O. H. Minchenko // Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference Science and Art for the Advancement in Medicine March 30 – April 1, 2012, Budapest. – Biopolymers and Cell. – 2012. – Vol. 28, N 2. – P. 212.

14. Залежність експресії генів протеїнів, що зв'язуються з подібним до інсуліну фактором росту, від функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87: вплив дефіциту глутаміну та глюкози / **А. П. Харькова**, Д. О. Мінченко, В. В. Яворський, Р. В. Сулік, О. Г. Мінченко // XI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна-2013»: Біологічні науки, 18-22 березня 2013 р.: Матеріали конференції. – Київ, 2013. – С. 100.

15. Роль стресу ендоплазматичного ретикулула в нормі та за патологічних станів / О. Г. Мінченко, І. В. Кривдюк, **А. П. Харькова**, Ю. М. Башта, Д. О. Мінченко // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології. II Міжнародна наукова конференція, 24-25 вересня 2013 р.: Матеріали конференції. – Дніпропетровськ, 2013. – С. 23.

16. Endoplasmic reticulum stress dependent expression of insulin-like growth factor binding protein genes in glioma U87 cells / **A. Kharkova**, D. Minchenko, T. Bakalets, G. Kustkova, R. Sulik, O. Minchenko // 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 23-24 May, Lviv, 2013: Abstract Book. – P. 72.

17. Експресія генів *IGFR2*, *IGFBP4* та *IGFBP6* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула / **А. П. Харькова**, О. Г. Мінченко // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології. III Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих учених, 24-27 лютого, 2014: Збірник тез. – Донецьк, 2014. – С. 289 – 290.

18. Expression of *IGFBP7*, *CTGF*, *NOV*, and *CYR61* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells / **А. П. Kharkova**, D. O. Minchenko, I. A. Garmash, L. L. Karbovskiy, O. H. Minchenko // 50th FEBS EMBO Conference, 30 August – 4 September, Paris, 2014: FEBS J. – Vol. 281, Suppl. 1. Late abstracts. – P. 43.

19. Стрес ендоплазматичного ретикулула в нормі та за патологічних станів / О. Г. Мінченко, **А. П. Харькова**, Д. О. Мінченко, Н. М. Липова // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., Київ, Україна – Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5, Suppl. 1. – P. 107.

20. Роль протеїнів родини IGFBP у механізмах пригнічення проліферації клітин в умовах виключення опосередкованого ERN1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула / **А. П. Харькова**, Л. Л. Карбовський, О. Г. Мінченко // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., Київ. – Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5, Suppl. 1. – P. 119.

21. ERN1-dependet hypoxic regulation of IGFBP genes expression in U87 glioma cells / **А. Kharkova**, L. Karbovskiy, O. Minchenko // Youth and progress of biology. Book of abstracts of XI International scientific conference for students and PhD students, Lviv, 20-23 April, 2015. – Lviv, 2015. – P. 48 – 49.

22. IRE1-залежний механізм репрограмування геному за умов злякисного росту / О. Г. Мінченко, Д. О. Цимбал, І. В. Кривдюк, **А. П. Харькова**, Д. О. Мінченко, Я. А. Гармаш, Т. В. Бакалець // Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології. III Міжнародна наукова конференція, 24-25 вересня 2015 р.: Матеріали конференції. – Дніпропетровськ, 2015. – С. 51 – 53.

23. Роль IGF та IGFBP у залежній від сигнального ензиму ERN1 регуляції процесів проліферації клітин гліоми / **А. П. Харькова**, Л. Л. Карбовський // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2016. Конференція-конкурс молодих учених, 26-27 травня 2016 р.: Тези доповідей. – Київ, 2016. – С. 56.

АНОТАЦІЯ

Харькова А. П. ERN1-залежна регуляція експресії генів системи IGF у клітинах гліоми. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню експресії генів, що кодують основні компоненти системи подібного до інсуліну фактора росту, у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функціональної активності ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, а також за умов гіпоксії

та дефіциту поживних речовин (глюкози або глутаміну), для встановлення можливої ролі цих генів в опосередкованому ERN1 контролі проліферації клітин гліоми.

Вперше показано, що експресія генів *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6* та *IGF2BP3* залежить від активності ERN1 і може грати роль у контролі проліферації клітин гліоми. Встановлено, що рівень експресії генів основних пропроліферативних факторів системи IGF знижується за пригнічення ERN1 у клітинах гліоми на рівні мРНК та протеїну. Рівень експресії генів антипроліферативних факторів підвищується за умов пригнічення ензиму ERN1. IGFBP3, як основний інгібітор IGF, може відігравати ключову роль у пригніченні проліферації клітин гліоми за цих умов. Вперше показано, що пригнічення ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії, а також дефіциту глутаміну на експресію частини досліджених генів.

Отримані результати свідчать про роль регуляторних протеїнів системи IGF у ланцюжку подій, що пов'язують пригнічення функціональної активності ERN1 та протипухлинні ефекти на рівні клітини, а також молекулярні механізми впливу гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на ERN1, основну сигнальну систему відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума.

Ключові слова: експресія генів, гліома, стрес ендоплазматичного ретикулума, IGF, IGFBP, ERN1, гіпоксія, дефіцит глюкози, дефіцит глутаміну.

АННОТАЦІЯ

Харькова А. П. ERN1-зависимая регуляция экспрессии генов системы IGF в клетках глиомы. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию экспрессии генов, которые кодируют основные компоненты системы инсулиноподобного фактора роста, в клетках глиомы линии U87 при ингибировании функциональной активности ERN1, основного сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума, а также в условиях гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина, для установления возможной роли этих генов в опосредованном ERN1 контроле пролиферации клеток глиомы.

Впервые показано, что экспрессия генов *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6* и *IGF2BP3* зависит от активности ERN1 и может играть роль в контроле пролиферации клеток глиомы. Установлено, что уровень экспрессии генов основных пропролиферативных факторов системы IGF понижается при ингибировании ERN1 в клетках глиомы, причем снижается также уровень протеинов IGF2, IGFBP2 и IGF2BP3. В то же время уровень экспрессии генов антипролиферативных факторов повышается при ингибировании ERN1, причем IGFBP3, как основной ингибитор IGF, может играть ключевую роль в подавлении пролиферации клеток глиомы при ингибировании энзима ERN1.

Впервые показано, что ингибирование энзима ERN1 модифицирует эффекты гипоксии на экспрессию части исследуемых генов, что свидетельствует о разных механизмах гипоксической регуляции экспрессии генов системы IGF.

Важным фактом, установленным в работе, является то, что в условиях дефицита глутамина или глюкозы экспрессия гена *IGFBP3* зависит от активности энзима ERN1, экспрессия гена *IGFBP1* зависит от активности ERN1 только при отсутствии глюкозы, а *IGFBP5* – только при отсутствии глутамина. Направление регуляции экспрессии генов других IGFBP не зависит от активности энзима ERN1 при дефиците глутамина или глюкозы.

Полученные результаты помогают определить роль регуляторных протеинов системы IGF в цепи событий, которые связывают ингибирование функциональной активности сенсорно-сигнального энзима ERN1 и противоопухолевые эффекты на уровне клетки, а также молекулярные механизмы влияния гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина на одну из основных сигнальных систем клеточного ответа на стресс эндоплазматического ретикулума – ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, глиома, стресс эндоплазматического ретикулума, инсулиноподобный фактор роста (IGF), IGFBP, ERN1, гипоксия, дефицит глюкозы, дефицит глутамина.

ANNOTATION

Kharkova A. P. ERN1-dependent regulation of IGF system genes expression in glioma cells. - Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The main goal of thesis is to investigate pro-proliferative and anti-proliferative IGF system factors gene expression in glioma cell lines U87 with ERN1 inhibition at hypoxia and glucose or glutamine deprivation conditions, in order to identify the possible role of these genes in ERN1-mediated proliferation of glioma cells.

It was shown that the expression of *IGF1*, *IGF2*, *IGF1R*, *IRS1*, *IGFBP1*, *IGFBP2*, *IGFBP3*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, *IGFBP6* and *IGF2BP3* genes depends on ERN1 functional activity and changes in their expression correlates with suppression of proliferation of glioma cell with ERN1 blockade. We also established that the expression of pro-proliferative genes was reduced in glioma cells with suppressed function of ERN1. At the same time, the level of gene expression of anti-proliferative factors was increased in cells with ERN1 blockade. It was also shown that hypoxia, as well as glucose and glutamine deprivation influenced the expression of pro- and anti-proliferative genes expression. Thus, these results unveil molecular mechanisms of IGF system function upon hypoxia and glucose or glutamine deprivation in response to ERN1 inhibition in glioma cells.

Keywords: gene expression, glioma, endoplasmic reticulum stress, insulin like growth factor (IGF), IGFBP, ERN1, hypoxia, glucose deprivation, glutamine deprivation.