

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

ГАЛКІН ОЛЕГ ВАЛЕРІЙОВИЧ

УДК 577.112.7:616

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПРОТЕАЗ У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ ЛІНІЇ U87
ЗА УМОВ ПРИГНІЧЕННЯ IRE1**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Мацелюх Богдан Павлович,
завідувач відділу генетики мікроорганізмів
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Толстановна Ганна Миколаївна,
начальник науково-дослідної частини
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Захист відбудеться «22» квітня 2019 р. о 14 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 «__» березня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протеази є важливою частиною складних регуляторних каскадів клітин і впливають на їх сигнальну мережу, яка відіграє надзвичайно важливу роль у динамічних механізмах регуляції біохімічних процесів як у нормі, так і за різних патологічних станів, а також за дії на організм різноманітних чинників. Вивчення молекулярних механізмів регуляції основних біохімічних процесів як в окремих клітинах, так і у всьому організмі на рівні окремих факторів сигнальних мереж є надзвичайно актуальним напрямком сучасних фундаментальних досліджень у біохімії та інших медико-біологічних науках. У цьому плані вивчення ролі ключових протеаз і процесів, що вони контролюють, є важливим для розуміння молекулярних механізмів розвитку патологічних станів, у тому числі й онкологічних захворювань.

До фундаментальних досліджень біології останніх двадцяти років відноситься накопичення та аналіз відомостей про фізіологічну й патологічну роль протеолізу, а також – важливість оцінки рівня активності протеаз та їх інгібіторів для клінічної практики. Протеолітичні ензими беруть участь у регуляції різноманітних біологічних процесів і забезпечують швидку відповідь організму на загальні та локальні пошкодження в умовах стресу. Це обумовлено особливістю молекулярного механізму протеолізу, який на пост-трансляційному рівні залучений до процесів утворення, інактивації і модифікації біорегуляторів протеїнової природи, забезпечуючи контроль концентрації активних молекул-регуляторів. Беручи участь у процесингу протеїнів та пептидів, протеази запускають каскадні реакції в плазмі крові і клітинах тканин, контролюючи цим велику кількість фізіологічних процесів: включаються у системи рецепції і реалізують різноманітні функції клітин; залучені до адаптаційної перебудови і морфо-генетичних перетворень клітин; беруть участь у здійсненні низки специфічних функцій клітин імунної системи (цитотоксична активність, процесинг антигенів, деяких рецепторів і цитокінів), в апоптозі, утворенні та інактивації ростових факторів і регуляторних пептидів, модифікації поверхневих білків клітин, взаємодії клітин із вірусами, а також слугують рецепторами для протеїнів матриксу.

Інтерес до вивчення протеолітичних ензимів за неопластичних процесів пояснюється їх високим рівнем біологічної активності, участю в захисних реакціях організму, процесах росту та поділу клітин, ангиогенезі, деградації сполучнотканинних структур при інвазії пухлинних клітин і метастазуванні. Протеази вважаються ключовими елементами, які запускають ті чи інші біохімічні процеси шляхом обмеженого протеолізу різноманітних поліпептидів та залучені до ампліфікаційних каскадів – «протеазної павутини».

Відомо, що протеази клітин також беруть участь у процесах онкогенної трансформації і розвитку злоякісних утворень, а також у контролі міграції та інвазії пухлинних клітин. Саме тому дослідження регуляторних функцій протеаз у розвитку онкогенезу на даний час є перспективним напрямком для створення методів ранньої діагностики онкологічних захворювань та вибору мішеней для протипухлинної терапії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2015-2018 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: “Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії”, № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.), “Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом”, № ДР 0116U001027 (2016-2020р.р.), “Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій”, ДР № 0112U002624 (2012-2016р.р.) та “Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів”, ДР № 0117U004344 (2017-2021р.р.).

Мета і завдання роботи. Метою дисертаційної роботи було дослідити зміни в експресії генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глютаміну у середовищі в залежності від IRE1 для з'ясування їх можливої ролі в опосередкованому IRE1 контролі проліферації клітин гліоми.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Вивчити експресію генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригніченням сигнального ензиму IRE1.
2. Визначити експресію генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у клітинах гліоми за умов пригніченням IRE1.
3. З'ясувати роль IRE1 в дії гіпоксії на експресію генів основних USP та CTS у клітинах гліоми.
4. Дослідити вплив дефіциту глюкози на експресію генів основних USP і CTS, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми в залежності від функції IRE1.
5. Визначити рівень експресії генів основних USP і CTS, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми за дефіциту глютаміну залежно від функції IRE1.

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми експресії генів протеаз за умов гіпоксії, а також дефіциту глюкози і глютаміну у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від сенсорно-сигнального ензиму IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума.

Предмет дослідження: експресія генів основних протеаз за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глютаміну в клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності IRE1 для виявлення можливої ролі IRE1 в гіпоксичній регуляції експресії генів.

Методи дослідження: В даній роботі використовувалися такі методи біохімії та молекулярної біології, як: вестерн-блот аналіз протеїнів, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, наноспектрофотометричне визначення кількості РНК та їх спектральних характеристик, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, культивування клітин та статистичний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримано нові дані про залежність рівня експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*,

CTSB, CTSC, CTSD, CTSF, CTSK, CTSL, CTSO, та *CTSS* у клітинах гліоми лінії U87 від активності IRE1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула.

Показано, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1, USP10, USP14, CTSC, CTSL, CTSO* та *CTSS* у контрольних клітинах гліоми, тоді як інших генів – підвищує. Пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у цих клітинах по-різному змінювало ефект гіпоксії на експресію більшості досліджених генів, що вказує на геноспецифічний характер цих змін та залежність гіпоксичної регуляції їх експресії від активності IRE1.

Виявлено, що дефіцит глютаміну та глюкози впливає на експресію більшості генів специфічних до убіквітину пептидаз та катепсинів, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми лінії U87, причому пригнічення активності сигнального ензиму IRE1 по-різному змінювало чутливість їх експресії до дефіциту як глютаміну, так і глюкози.

Отримані дані розкривають певні молекулярні механізми IRE1-опосередкованої регуляції проліферації пухлинних клітин через специфічні зміни в експресії генів досліджених протеаз, а також через модулюючу роль цього сигнального ензиму на ефекти гіпоксії, дефіциту глюкози та глютаміну.

Практичне значення роботи полягає у з'ясуванні можливої ролі протеаз у механізмах пригнічення проліферації клітин гліоми, що спостерігається за умов пригнічення основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула і що важливо для розробки принципово нових підходів до створення антипухлинних препаратів на основі виявлених нами змін в експресії генів ключових катепсинів та специфічних до убіквітину протеаз за умов пригнічення IRE1. Отримані результати є підґрунтям для можливого використання специфічних інгібіторів протеаз в якості протипухлинних терапевтичних засобів, зокрема до *USP14, CTSC, CTSL* та *CTSS*, і були використані у лекціях по спецкурсам “Конструювання генів” та “Сучасні біотехнології” для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом було самостійно виконано аналіз даних літератури по темі роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню експресії генів *USP1, USP4, USP10, USP14, USP22, USP25, CTSA, CTSB, CTSC, CTSD, CTSF, CTSK, CTSL, CTSO, CTSS* та *HTRA1*. Дослідження експресії деяких генів проводили за участі к.мед.н. Д. О. Мінченка, к.б.н. Ратушної О. О., к. б. н. Харькової А. П. та провідного інженера Рябовол О. О., розробка методології, аналіз та обговорення результатів здійснювались за участі наукового керівника, д. б. н., проф., члена-кор. НАН України Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 2016; VI Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна: Біологія- 2016”, КНУ ім. Тараса Шевченка, 2016; XIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 2017 р.; IV Міжнародній науковій

конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», м. Дніпро, 2017 р., а також на Науковому семінарі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України «Актуальні проблеми сучасної біохімії».

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, із них 7 статей у вітчизняних та іноземних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів та конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, списку опублікованих робіт за темою дисертації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів досліджень, заключення, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 187 джерел. Робота викладена на 149 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 51 рисунком та містить 9 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури відображені основні сучасні відомості про гени протеаз та їх участь у регуляції процесів проліферації за онкологічних захворювань. Описано основні сенсорно-сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума, а також їх участь у молекулярних механізмах контролю експресії генів за канцерогенезу. Проаналізовано дані про роль гіпоксії в рості злоякісних пухлин та молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на клітинах гліоми людини лінії U87, отриманих від компанії ATCC (American Type Culture Collection, США), які вирощували згідно рекомендацій фірми-виробника. В цій роботі використовували 2 сублінії цих клітин гліоми. Одна сублінія представляла собою клон з надекспресією вектора pCDNA3.1+, який було використано для створення домінантно/негативної конструкції сигнального ензиму IRE1 (dnERN1). Ця сублінія була використана як контроль-1. Друга сублінія представляла собою клон з надекспресією dnERN1 і мала пригнічені протеїн-кіназу та ендорибонуклеазну активності IRE1.

Для виконання даної роботи було використано методи виділення РНК, спектрофотометричного визначення кількості та спектральних характеристик РНК, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, а також методи електрофоретичного аналізу нуклеїнових кислот, отримання екстрактів протеїнів із клітин, вестерн-блот аналізу протеїнів та статистичного аналізу даних.

Клітини гліоми росли у середовищі DMEM з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂.

Тотальну РНК з клітин виділяли за допомогою реагенту Trizol, який містив ізотіоціанат гуанідину, буфер та фенол (Invitrogen, США), згідно з протоколом виробника. Для цього клітини, що виростили в культуральній чашці, спочатку промивали забуференим фізіологічним розчином і для лізису клітин до чашки з клітинами додавали 1 мл реагенту Trizol. Витримували протягом 5 хвилини при 4°C. Після цього лізат клітин переносили до центрифужних пробірок і додавали до нього по 0,2 мл хлороформу, перемішували і інкубували зразки при 4°C протягом 5 хвилин. Отриману суміш центрифугували при 12000 g і температурі 4°C протягом 10 хвилин. Верхню водну фазу, що містила РНК, відбирали та переносили в нові мікропробірки. Осаджували РНК рівним об'ємом ізопропанолу. Зразки інкубували 10 хвилин при 4°C і центрифугували протягом 20 хвилин при 16000 g і температурі 4°C. Супернатант зливали, а осад РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у стерильній воді, що не містить домішок рибонуклеаз. Після цього для видалення можливих залишків фенолу РНК переосаджували етанолом у присутності 0,2 М ацетату натрію, центрифугували, осад промивали 75 % етанолом і розчиняли у стерильній воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop при довжині хвилі 260 нм, а їх чистоту оцінювали по співвідношенню A260/A280 та A260/A230, які були більше двох. Чистоту і стабільність препаратів РНК із клітин гліоми перевіряли також електрофорезом в агарозному гелі.

У дослідах з гіпоксією клітини поміщали у спеціальну камеру з 3% кисню, 5% діоксиду карбону та 92% азоту на 16 годин. Дефіцит глюкози та глутаміну створювали шляхом заміни середовища на таке, в якому була відсутня глюкоза або глутамін (Gibco, США) і витримували протягом 16 годин.

Синтез комплементарних ДНК проводили за допомогою набору «Quantitect Reverse Transcription» (Qiagen, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Для ампліфікації кДНК ХВР1 брали 1 мкл продукту реакції зворотної транскрипції (кДНК), 10 мкл двократної реакційної суміші для ПЛР HotStartTaq Master Mix (Qiagen, Німеччина), 1 мкл суміші прямого та зворотного праймерів та доводили об'єм суміші водою вільною від рибонуклеаз до 20 мкл. Реакцію проводили в "MasterCycler Personal" (Eppendorf, Німеччина). Ампліфікацію проводили з такими праймерами: прямий – 5'-GGAGTTAAGACAGCGCTTGG-3' і зворотний – 5'-TCACCCCTCCAGAACATCTC-3' (Sigma-Aldrich, США). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 441 – 460 та 608 – 589 у кДНК ХВР1 (GenBank NM_005080). Розмір ампліфікованих фрагментів ХВР1 - 168 пар нуклеотидів для основного варіанту ХВР1, а для альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 – 142 пари нуклеотидних залишків.

Для проведення ПЛР у реальному часі брали 2 мкл кДНК, 10 мкл 2xSYBRGreen, 2 мкл суміші прямого та зворотного праймерів (з концентрацією по 10 мкМ кожного) та доводили об'єм суміші водою, що не містила рибонуклеаз, до 20 мкл. Реакцію проводили в "Mx 3000P QPCR" компанії Stratagene (США) або в "QuantStudio 5 Real-Time PCR System" (Applied Biosystems, США), використовуючи специфічні для кожного гена пари праймерів.

Аналіз результатів дослідження експресії генів протеаз методом ПЛР виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «Differential expression calculator», а для статистичного аналізу використовували двовибірковий *t*-тест для середнього, обчислення проводили в програмному пакеті Excel (Гланц С., 1998). Результати виражали як $M \pm m$. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Експресія генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* та *HTRA1* у клітинах гліоми лінії U87 із пригніченими функціями ензиму IRE1.

Для того, щоб дослідити зміни рівня експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1 ми виміряли рівень експресії мРНК цих генів за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у клітинах гліоми лінії U87, що містили конструкцію dnIRE1 та порівняли їх із контролем. Результати показали, що пригнічення сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми призводить до посилення рівня експресії всіх досліджених генів специфічних до убіквітину протеаз, окрім *USP14* (рис.1).

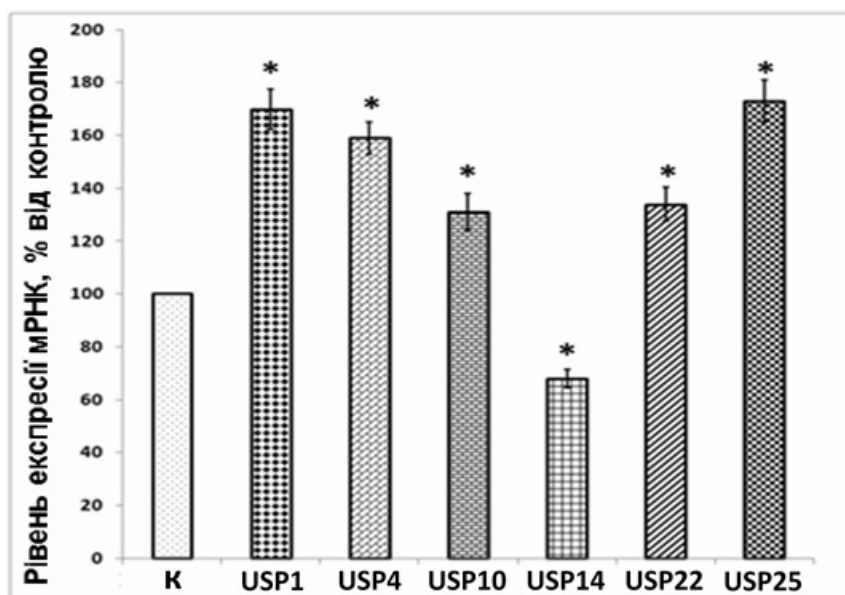


Рис. 1. Рівень експресії генів специфічних до убіквітину протеаз у клітинах гліоми U87 за умов пригнічення функцій IRE1. Тут і на всіх рисунках нижче рівень експресії мРНК нормалізували по експресії β -актину і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$, * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем (К).

Було визначено також рівень експресії мРНК генів катепсинів та *HTRA1* як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченою активністю IRE1. Встановлено, що рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSO* і *HTRA1* за цих експериментальних умов підвищувався. В той же час, для генів *CTSC*, *CTSK*,

CTSL і *CTSS* спостерігалася негативна регуляція рівня експресії їх мРНК за умов пригнічення функціональної активності IRE1 (рис.2).

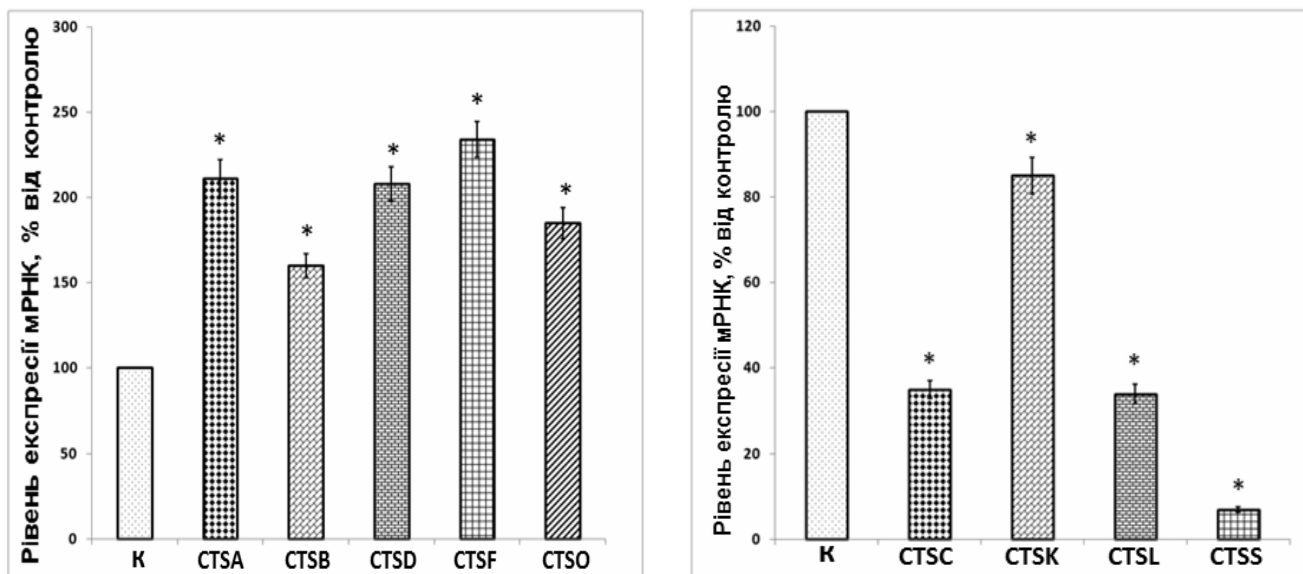


Рис. 2. Рівні експресії катенсинів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS* у клітинах гліоми *U87* за умов пригнічення активності IRE1.

Молекулярні механізми зниження рівня експресії генів *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS* за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму IRE1 ще остаточно не з'ясовані. Одним із можливих механізмів IRE1-залежної регуляції експресії цих генів може бути наявність в їх промоторних ділянках специфічних сайтів зв'язування транскрипційного фактора ХВР1. За допомогою біоінформатичного аналізу такі сайти були виявлені в промоторних ділянках генів *USP14* та *CTSC* (таблиця 1).

Таблиця 1.

Послідовності ССАСG/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1 (ХВР1-responsive element), в промоторних ділянках генів

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послід. промотора та GenBank номер
<i>USP14</i>	-420 до -424	gaCCACGtg	1; NC_000018.10
<i>USP14</i>	-417 до -421	caCGTGGcc	1; NC_000018.10
<i>CTSC</i>	-1 до -5	gcCCACGgg	2; NC_000011.10
<i>CTSC</i>	40 до 44	ctCGTGGtg	2; NC_000011.10
<i>CTSK</i> , <i>CTSL</i> , <i>CTSS</i>		Не ідентифіковано	

1 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_709011/

2 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_712246/

Так як у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1 рівень експресії мРНК генів *USP1* та *USP14* збільшувався найбільш виражено у порівнянні з іншими дослідженими генами убіквітин-специфічних протеаз, нами було проведено визначення рівня протеїнів USP1 і USP14 у цих клітинах гліоми методом вестерн-блот аналізу із специфічними до них антитілами (рис. 3). Аналізуючи ці дані можна сказати, що рівень експресії генів цих протеаз по мРНК узгоджується з даними рівня продукції відповідних протеїнів.

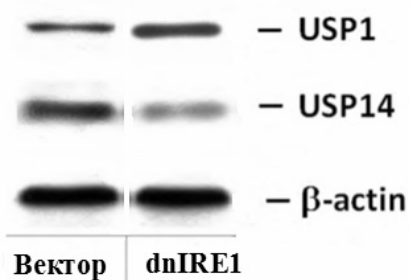


Рис. 3. Рівень протеїнів *USP1* та *USP14* у клітинах гліоми із пригніченими функціями IRE1 (*dnIRE1*). У якості контролю кількості проаналізованих протеїнів використовували β -актин (β -actin).

Отже, виявлена чітка залежність рівня експресії досліджених генів специфічних до убіквітину протеаз та катепсинів від пригнічення активності сигнального ензиму IRE1.

2. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз, катепсинів та *STC2* у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функціональної активності ензиму IRE1

Показано, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1*, *USP10* та *USP14* як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченим IRE1, а гена *USP25* – підвищує, причому ефект гіпоксії на експресію цього гена залежить від функції сигнального ензиму IRE1 (рис. 4, табл. 2). Крім цього, гіпоксія збільшує експресію генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF* та *CTSK* і знижує експресію генів *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у контрольних (трансфікованих вектором без вставки) клітин гліоми. Пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у цих клітинах змінювало ефект гіпоксії на експресію більшості досліджених генів: знімало ефект гіпоксії на експресію генів *CTSA*, міняло напрям змін на експресію генів *CTSD* та *CTSS* (рис. 5, табл. 2), послаблювало – на експресію генів *CTSF* та *CTSK* і посилювало – на експресію генів *CTSB* та *CTSL*. Таким чином, гіпоксія змінювала рівень експресії більшості досліджених генів залежно від функціональної активності ензиму IRE1, центрального медіатора стресу ендоплазматичного ретикулула, який контролює проліферацію клітин та ріст пухлин.

Оскільки вплив гіпоксії на експресію більшості залежних від неї генів контролюється транскрипційним фактором HIF, то нами були проведені дослідження по вивченню впливу гіпоксії на рівень протеїну HIF-1 α у контрольних клітинах гліоми і в клітинах із пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1. Як видно із даних, представлених на рис. 6, рівень протеїну HIF-1 α виражено збільшується за умов гіпоксії в обох типах клітин, хоча в клітинах із *dnIRE1* він істотно знижується.

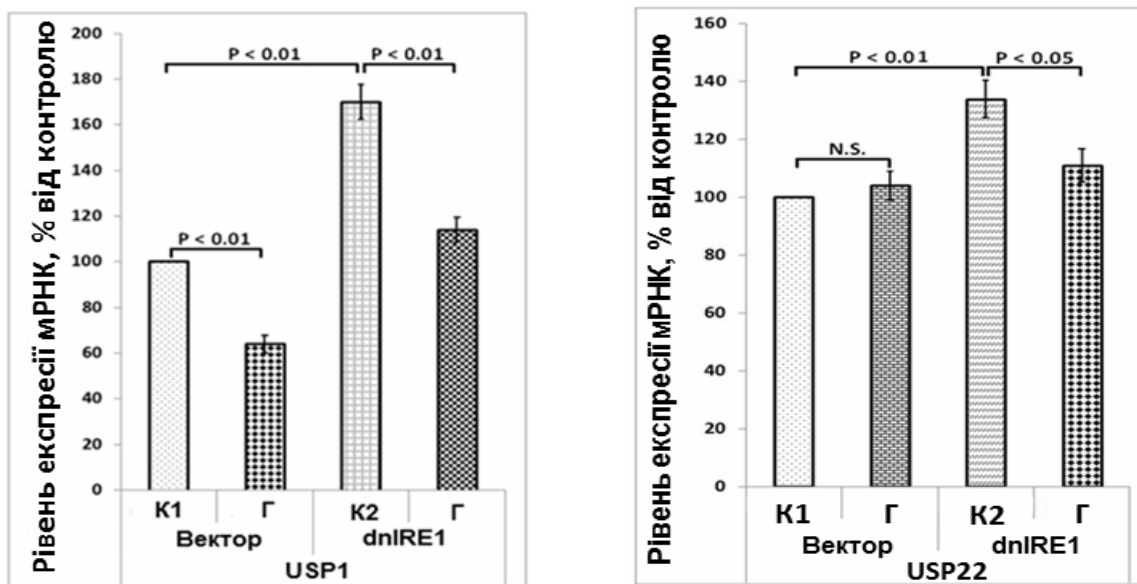


Рис. 4. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії генів USP1 і USP22 у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором *pcDNA3.1* (Вектор) та клітин, трансфікованих *dnIRE1*. Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β -актину; $n = 4$. Контроль 1 (K1) – клітини, трансфіковані вектором *pcDNA3.1*; Контроль 2 (K2) – клітини, трансфіковані *dnIRE1*; Г – гіпоксія.

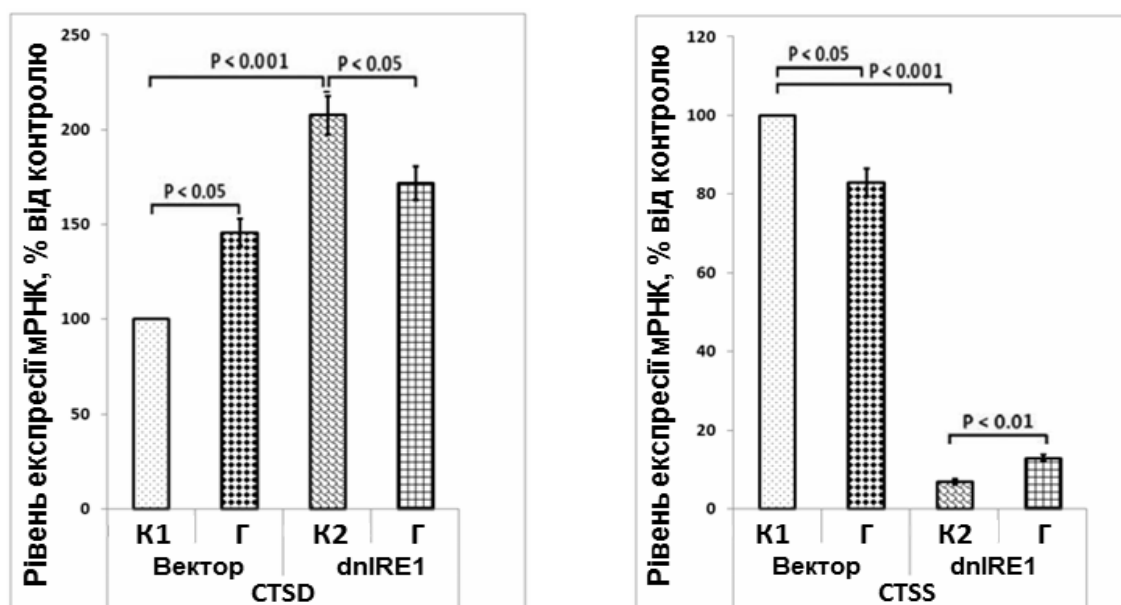


Рис. 5. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії генів CTSD (зліва) та CTSS (справа) в клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором *pcDNA3.1* (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (*dnIRE1*). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β -актину; $n = 4$. Контроль 1 (K1) – клітини, трансфіковані вектором *pcDNA3.1*; Контроль 2 (K2) – клітини, трансфіковані *dnIRE1*; Г – гіпоксія.

Вплив гіпоксії на експресію генів протеаз за умови виключення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	ID	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Гіпоксія у порівнянні із контролем	Гіпоксія + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>USP1</i>	NC_000001.11	в 1.7 рази більше	в 1.56 рази менше	в 1.49 рази менше
<i>USP4</i>	NC_000003.12	в 1.56 рази більше	Без змін	Без змін
<i>USP10</i>	NC_000016.10	в 1.31 рази більше	в 1.51 рази менше	в 1.32 рази менше
<i>USP14</i>	NC_000018.10	в 1.47 рази менше	в 1.26 рази менше	в 1.33 рази менше
<i>USP22</i>	NC_000017.11	в 1.34 рази більше	Без змін	в 1.2 рази менше
<i>USP25</i>	NC_000021.9	в 1.73 рази більше	в 1.18 рази більше	в 1.25 рази більше
<i>CTSA</i>	NC_000020.11	в 2.11 рази більше	в 1.33 рази більше	Без змін
<i>CTSB</i>	NC_000008.11	в 1.6 рази більше	в 1.25 рази більше	в 1.43 рази більше
<i>CTSC</i>	NC_000011.10	в 2.85 рази менше	в 2.12 рази менше	в 2.18 рази менше
<i>CTSD</i>	NC_000011.10	в 2.08 рази більше	в 1.46 рази більше	в 1.2 рази менше
<i>CTSF</i>	NC_000011.10	в 2.34 рази більше	в 1.52 рази більше	в 1.18 рази більше
<i>CTSK</i>	NC_000001.11	в 1.17 рази менше	в 1.43 рази більше	в 1.28 рази більше
<i>CTSL</i>	NC_000009.12	в 2.94 рази менше	в 1.19 рази менше	в 1.36 рази менше
<i>CTSO</i>	NC_000004.12	в 1.85 рази більше	в 1.49 рази менше	в 1.44 рази менше
<i>CTSS</i>	NC_000001.11	в 14.28 разів менше	в 1.2 рази менше	в 1.95 рази більше
<i>STC2</i>	NC_000005.10	в 6.07 разів більше	в 6.98 разів більше	в 4.2 рази більше
<i>HTRA1</i>	NC_000010.11	в 5.45 разів більше	Без змін	в 1.1 рази більше

Примітка: Наведені тут і у всіх таблицях нижче дані про зміни в експресії генів є статистично достовірними ($n = 4$, $P < 0,05$) за винятком даних, позначених “Без змін” ($n = 4$, $P > 0,05$).



Рис. 6. Вплив гіпоксії на рівень протеїну HIF-1 α у клітинах гліоми із dnIRE1 і у клітинах з нативним IRE1 (Вектор). В якості контролю використовували β -актин (β -actin). К – контроль (нормоксія); Г – гіпоксія.

Наступним етапом даної роботи було дослідити, як зміниться рівень експресії генів протеаз за дефіциту глутаміну в залежності від функціонального стану IRE1.

3. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* і *HTRA1* у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму IRE1

Глюкоза є важливим субстратом для гліколізу, який є необхідним для розвитку гліоми та обумовлює її агресивну поведінку. Краща обізнаність щодо відповіді пухлини на умови дефіциту глюкози необхідна для розвитку ефективних терапевтичних стратегій клітинної сенсibiliзації, що базується на блокаді механізмів виживання.

Для в'яснення ролі дефіциту глюкози у регуляції експресії генів протеаз, ми дослідили вплив дефіциту глюкози на експресію генів, що кодують специфічні до убіквітину протеази, катепсини та *HTRA1* у клітинах гліоми лінії U87 за умов інгібування сигнального ензиму IRE1, який є основним компонентом процесу відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула (таблиця 3).

Таблиця 3.

Вплив дефіциту глюкози на експресію генів катепсинів та *HTRA1* за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	ID	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глюкози у порівнянні із контролем	Дефіцит глюкози + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>CTSA</i>	NC_000020.11	в 2.11 рази більше	в 1,49 рази більше	Без змін
<i>CTSC</i>	NC_000011.10	в 2.85 рази менше	Без змін	в 1,23 рази більше
<i>CTSD</i>	NC_000011.10	в 2.1 рази більше	в 1,6 рази більше	в 1,55 рази більше
<i>CTSF</i>	NC_000011.10	в 2.34 рази більше	Без змін	Без змін
<i>CTSK</i>	NC_000001.11	в 1,17 рази менше	в 2.13 рази більше	в 1,47 рази більше
<i>CTSL</i>	NC_000009.12	в 2.94 рази менше	в 1,16 рази більше	в 1,74 рази більше
<i>CTSO</i>	NC_000004.12	в 1,85 рази більше	в 1,24 рази більше	Без змін
<i>CTSS</i>	NC_000001.11	в 14.3 рази менше	Без змін	в 1,85 рази більше
<i>HTRA1</i>	NC_000010.11	в 5.45 рази більше	Без змін	в 1,02 рази менше
<i>USP4</i>	NC_000003.12	в 1,59 рази більше	в 1,25 рази більше	в 1,35 рази більше
<i>USP22</i>	NC_000017.11	в 1,34 рази більше	Без змін	в 1,23 рази менше
<i>USP25</i>	NC_000021.9	в 1,73 рази більше	в 1,41 рази більше	в 1,62 рази більше

Встановлено, що рівень експресії катепсинів А та В зростає у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози, але пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 знімає чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози. Можливо, що регуляція експресії генів *CTSA* і *CTSB* дефіцитом глюкози опосередкована IRE1 і блокування функцій цього сигнального ензиму знижує чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози. Дефіцит глюкози також індукує експресію генів *CTSD*, *CTSK*, *CTSL* і *CTSO* у контрольних клітинах гліоми, але експресія *CTSC*, *CTSF* та *CTSS* є нечутливою до дефіциту глюкози. У той же час, пригнічення IRE1 має різний вплив на чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози. Також показано, що дефіцит глюкози впливає на експресію більшості генів, які кодують убіквітин-специфічні протеази та *HTRA1* IRE1-залежним шляхом, і ці гени можливо залучені до регуляції клітинної проліферації, апоптозу та метастазування.

Виявлено, що більшість досліджуваних генів є чутливими до дефіциту глюкози в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1 і потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, метастазування та апоптозу через різноманітні сигнальні шляхи, а зміни експресії досліджуваних генів частково узгоджуються зі сповільненням рівня проліферації клітин гліоми, які містили dnIRE1 (рис. 7).

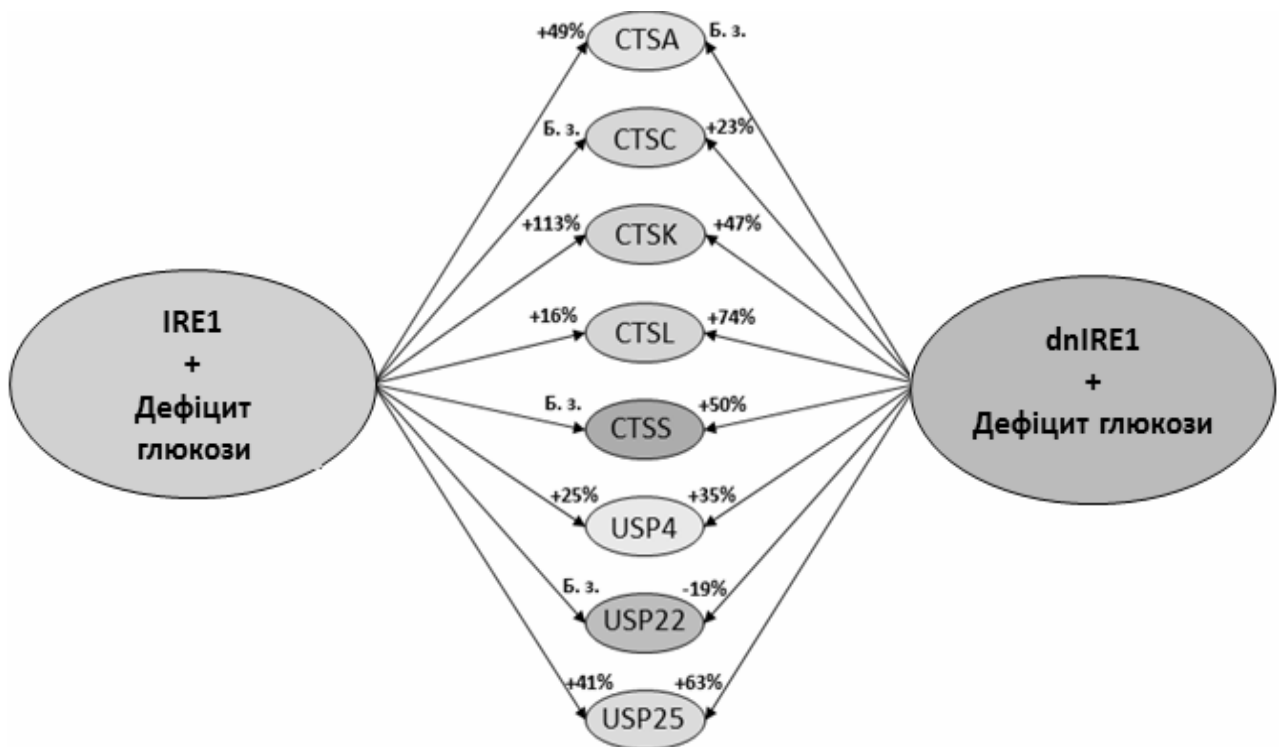


Рис. 7. Схематичне зображення впливу дефіциту глюкози на зміну рівнів експресії протеаз за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1. Б. з. – змін не виявлено.

4. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз, катепсинів та *HTRA1* за умови дефіциту глутаміну у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму IRE1

Глутамін є однією із найважливіших амінокислот в організмі і є необхідним для забезпечення метаболізму. Після транспортування до клітин глутамін діє як попередник синтезу багатьох амінокислот, протеїнів, нуклеотидів та інших біологічно важливих молекул, а також забезпечує утворення NADPH⁺ і GSH (глутатіон), підтримуючи гомеостаз клітин, тому він відіграє надзвичайно важливу роль у процесах росту та розмноження клітин. Існують дані, що кількість глутаміну в значній мірі збільшується і активно використовується у більшості пухлинних клітин різних типів у порівнянні з нормальними тканинами. Було доведено, що пригнічення обміну глутаміну є ефективним підходом для сповільнення рівня росту пухлинних клітин, тоді як додавання глутаміну може індукувати або блокувати апоптоз в залежності від типу клітини.

У зв'язку з цим, було досліджено вплив дефіциту глутаміну у середовищі на експресію генів, що кодують низку специфічних до убіквітину протеаз та катепсинів, а також протеазу *HTRA1/PRSS11*, у клітинах гліоми лінії U87, які відрізнялися функціональною активністю IRE1, основного компонента відповіді на незгорнуті протеїни. Отримані результати наведені у табл. 4.

Таблиця 4.

Вплив дефіциту глутаміну на експресію генів USP за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	ID	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глутаміну у порівнянні із контролем	Дефіцит глутаміну + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>USP1</i>	NC_000001.11	в 1,7 рази більше	в 1,15 рази менше	в 1,47 рази менше
<i>USP4</i>	NC_000003.12	в 1,59 рази більше	Без змін	в 1,27 рази менше
<i>USP14</i>	NC_000003.12	в 1,47 рази менше	Без змін	в 1,17 рази менше
<i>USP25</i>	NC_000021.9	в 1,75 рази більше	в 1,22 рази більше	в 1,17 рази більше
<i>CTSD</i>	NC_000011.10	в 2.1 рази більше	в 1,64 рази більше	в 1,38 рази більше
<i>CTSF</i>	NC_000011.10	в 2.34 рази більше	в 1,34 рази більше	в 1,4 рази більше
<i>CTSK</i>	NC_000001.11	в 1,17 рази менше	в 1,17 рази менше	в 1,23 рази менше
<i>CTSL</i>	NC_000009.12	в 2.94 рази менше	Без змін	в 1.35 рази більше
<i>CTSS</i>	NC_000001.11	в 14.3 разів менше	в 1,27 рази більше	в 1,57 рази більше
<i>HTRA1</i>	NC_000010.11	в 5.45 разів більше	в 1.23 рази менше	в 1.06 рази більше

У цій серії дослідів показано, що експресія генів убіквітин-специфічних протеаз *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* є нечутливою до дефіциту глутаміну у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором), так як він не змінював рівень експресії досліджуваних генів. У контрольних клітинах гліоми дефіцит глутаміну впливав лише на експресію генів *USP1* та *USP25*. Пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 збільшує вплив дефіциту глутаміну на експресію гена *USP1* і вводить чутливість до цих умов для генів *USP4* та *USP14*. Окрім цього, пригнічення функцій ензиму IRE1 у клітинах гліоми U87 змінює вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *HTRA1*, *CTSD*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS*, а для генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSF* та *CTSK* зберігає чутливість їх експресії до цих експериментальних умов. Вимкнення функцій IRE1 у клітинах гліоми в значній мірі посилює вплив гіпоксії на експресію гена *CTSS*, але робить нечутливим до гіпоксії експресію генів *HTRA1* і *CTSO*. Експресія мРНК *CTSL* була нечутливою до відсутності глутаміну у поживному середовищі у контрольних клітинах із функціонально активним IRE1, але після інгібування ензиматичних активностей IRE1 експресія цього гена стала залежною від дефіциту глутаміну. Чутливість експресії гена *CTSD* до дефіциту глутаміну також є IRE1-залежною, так як пригнічення IRE1 знижує вплив нестачі глутаміну на експресію цього гена. Крім того, експресія генів *CTSA* та *CTSB* є нечутливою до умов дефіциту глутаміну у клітинах гліоми із конструкцією dnIRE1 (табл. 4).

Отже, більшість досліджених генів чутливі до дефіциту глутаміну IRE1-залежним чином і потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, метастазування та апоптозу через різні сигнальні шляхи. Отримані дані узагальнені на рисунку 8.

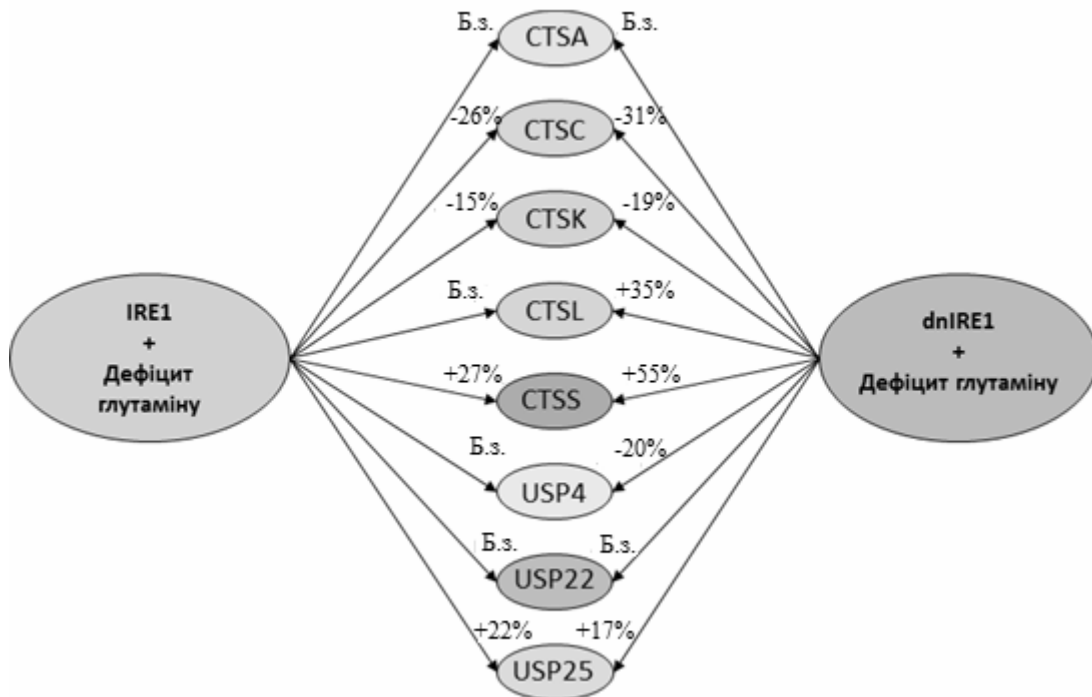


Рис. 8. Схематичне зображення впливу дефіциту глутаміну на рівень експресії протеаз за умов пригнічення активності сигнального ензиму IRE1.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз і експериментальне рішення актуальної наукової задачі щодо ролі експресії деяких генів протеаз у зниженні проліферативного потенціалу клітин гліоми, опосередкованому пригніченням сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, а також залежності їх експресії від гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози, що необхідно для розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі IRE1-опосередкованого контролю проліферації пухлинних клітин і можуть сприяти ідентифікації нових потенційних генів-мішеней для розробки протипухлинних препаратів.

1. Встановлено, що пригнічення активності сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до посилення рівня експресії генів протеаз, специфічних до убіквітину: *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP22* та *USP25*.

2. Показано, що за пригнічення активності IRE1 збільшувався рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF* і *CTSO*, тоді як генів *CTSC*, *CTSL*, *CTSK* та *CTSS* – знижувався.

3. Встановлено, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1*, *USP10*, *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS* у контрольних клітинах гліоми, а інших генів – підвищує, причому пригнічення IRE1 знімало ефект гіпоксії на експресію гена *CTSA*, послаблювало експресію генів *USP1*, *USP10*, *CTSF* та *CTSK* і посилювало експресію генів *USP25*, *CTSB* та *CTSL*.

4. Показано, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *USP4* та *USP25* збільшувався, а генів *USP1* та *USP10* знижувався у контрольних (трансфікованих порожнім вектором) клітинах гліоми, а пригнічення активності IRE1 по-різному змінювало ефект дефіциту глюкози на рівень експресії більшості досліджених генів.

5. Встановлено, що у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну рівень експресії генів *USP1*, *HTRA1*, *CTSC* і *CTSK* знижувався, а генів *USP25*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSO*, *CTSS* підвищувався і що пригнічення сигнального ензиму IRE1 по-різному змінювало чутливість експресії генів більшості протеаз до дефіциту глутаміну.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Minchenko D. O. Effect of hypoxia on the expression of genes encoded insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without IRE1 function / D. O. Minchenko, A. P. Kharkova, **O. V. Halkin**, L. L. Karbovskiy, O. H. Minchenko // *Endocr. Reg.* – 2016. – Vol. 50, N 2. – P. 43 – 54. (*Особистий внесок здобувача - досліджував експресію гена STC2, проводив аналіз даних і брав участь у їх підготовці до друку*).

2. Minchenko D. O. IRE-1 α regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells / D. O. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, O. O. Ratushna, D. O. Tsymbal, O. H. Minchenko // *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.* – 2016. – N 3. – P. 50 – 62. (*Особистий внесок здобувача – досліджував*

експресію генів *USP*, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті).

3. Minchenko O. H. ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and *LONP1* genes expression in U87 glioma cells / O. H. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, O. O. Ratushna // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, N 2. – P. 55 – 69. (Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів катепсинів, проводив аналіз даних).

4. **Halkin O. V.** Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation // **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, O. O. Riabovol, V. V. Telychko, O. O. Ratushna, O. H. Minchenko // Ukr. Biochem. J. – 2017. Vol. 89, N 5. – P. 52 – 61. (Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів *USP*, проводив аналіз даних, брав участь у підготовці статті до друку).

5. Minchenko O. H. Expression of ubiquitin specific peptidase genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells upon glucose deprivation / O. H. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, S. V. Danilovskyi, D. O. Minchenko, O. O. Ratushna // Biotechnol. Acta. – 2016. – Vol. 9, N 5. P. – 7 – 17. (Особистий внесок здобувача - досліджував експресію мРНК *USP*, проводив аналіз даних, брав участь у підготовці статті до друку).

6. Minchenko O. H. Glucose deprivation affects the expression of LONP1 and cathepsins in IRE1 knockdown U87 glioma cells / O. H. Minchenko, **O. V. Halkin**, O. O. Riabovol, D. O. Minchenko, A. Y. Kuznetsova, O. O. Ratushna // Biotechnol. Acta. – 2016. – Vol. 9, N 6. – P. 16 – 27. (Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію генів катепсинів, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті).

7. **Halkin O. V.** IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells / **O. V. Halkin**, O. O. Riabovol, D. O. Minchenko, O. O. Ratushna, O. H. Minchenko // Biotechnologia Acta. – 2017. – Vol. 10, N 4. – P. 34 – 43. (Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію генів катепсинів та *HTRA1*, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті).

8. **Галкін О. В.** Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1 / **О. В. Галкін**, O. O. Рябовол // Тези доповідей конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016». Ukr. Biochem. J. – 2016 р. – Vol. 88, N 4. – P. 89

9. Рябовол О. О. Гіпоксична регуляція експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 / O. O. Рябовол, **О. В. Галкін**, O. O. Ратушна // Тези доповідей VI Міжн. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених “Шевченківська весна: Біологія – 2016”. – Київ, Україна. – 2016. – С. 172 – 173.

10. **Галкін О.** Експресія генів специфічних до убіквітину пептидаз у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози / **О. Галкін**, Д. Мінченко, O. Ратушна, O. Мінченко // Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». – Львів, Україна. – 2017. – С. 27 – 28.

11. Luzina O. Y. Hypoxic regulation of the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition / O. Y. Luzina, O. S. Hnatiuk, **O. V. Halkin**, L. L. Karbovskiy // Joint Meeting 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. - Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, N 4. – P. 87.

12. **Галкін О. В.** Експресія генів катепсинів та LONP1 у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози/ **О. В. Галкін**, Д. О. Мінченко, О. О. Рябовол, О. О. Ратушна, О. Г. Мінченко // Тези доповідей IV Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології». – Дніпро, Україна. – 2017. – С. 47 – 48.

13. **Halkin O. V.** Expression of protease genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells upon glutamine deprivation / **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, D. O. Tsymbal // Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology - 2018”. – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, N 3. – P. 114.

АНОТАЦІЯ

Галкін О. В. Експресія генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення IRE1. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2018.

Робота присвячена вивченню експресії генів протеаз за умов гіпоксії і дефіциту глюкози або глутаміну у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченими кіназною та ендорибонуклеазною активностями основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, а також їх можливої участі у IRE1-залежному рості злоякісних пухлин, зокрема гліом.

Було продемонстровано, що за умов пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 рівень експресії генів *USP4*, *CTSC*, *CTSK* та *CTSS* – знижується, тоді як для всіх інших генів спостерігалось збільшення рівня експресії їх мРНК, що вказує на диференційний характер IRE1-залежної регуляції їх експресії. Встановлено, що рівень експресії більшості досліджених генів специфічних до убіквітину пептидаз і катепсинів, а також генів *HTRA1* і *STC2* є залежними від гіпоксії, дефіциту глутаміну та глюкози і що ця залежність істотно змінювалась за умов пригнічення IRE1. Виявлені за умов пригнічення IRE1 зміни в експресії генів *CTSC*, *CTSL*, *CTSS*, *HTRA1* та *SCT2* у клітинах гліоми лінії U87, яка асоціюється зі зниженням проліферації клітин гліоми і росту із них пухлин, можуть бути використані з метою пригнічення росту гліом.

Ключові слова: експресія мРНК, катепсини, *USP*, *HTRA1*, *STC2*, пригнічення IRE1, дефіцит глюкози, гіпоксія, клітини гліоми лінії U87.

ABSTRACT

Halkin O. V. Expression of protease genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. – Manuscript.

The thesis for PhD degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis highlights investigation of protease genes expression upon hypoxia and glucose or glutamine deprivation in IRE1 knockdown U87 glioma cells with suppressed kinase and endoribonuclease activities and their possible participation in IRE1-dependent growth of malignant tumors, in particular glioma .

Proteases are an important part of the complex regulatory cascades in cells and play an extremely important role in the dynamic mechanisms of metabolism regulation in different pathological conditions. Living systems maintain a balance between proteases and their inhibitors and disturbing of this equilibrium leads to the development of many diseases, including malignant tumors. In this regard, the study of the role of key proteases and processes that they control is important for understanding the molecular mechanisms of cancer development. IRE1, the most evolutionarily conserved signaling pathway of the endoplasmic reticulum stress, is highly implicated in sustaining the proliferation of glioma cells and subsequent tumor growth, which is decreased by the inhibition of IRE1.

It was shown that inhibition of IRE1 signaling enzyme function in U87 glioma cells led to suppression of *USP4*, *CTSC*, *CTSK* та *CTSS* genes expression, while for all other genes an increase of the expression level of their mRNA was observed, indicating the differential nature of IRE1-dependent regulation of their expression.

Therefore, inhibition of IRE1 signaling enzyme in U87 glioma cells modifies the effect of glutamine deficiency on the expression of most studied genes encoding cathepsins and ubiquitin specific peptidases: inducing the effect of glutamine deficiency on the *USP4* and *USP14* genes expression, decreasing - on the expression of *CTSD* gene, and amplifying - on the *USP1* gene expression.

It has been established that the expression level of most of the investigated specific for ubiquitin peptidase and cathepsin genes, as well as the *HTRA1* and *STC2* genes, are dependent from hypoxia, glutamate and glucose deprivation and that this dependence had significantly changed in the case of IRE1 suppression. Detected upon inhibition of IRE1 changes in the expression of *CTSC*, *CTSL*, *CTSS*, *HTRA1* and *SCT2* genes in U87 glioma cells, which associated with reduced glioma cells proliferation and tumor growth, can be used to suppress glioma cells growth.

Key words: mRNA expression, cathepsin, USP, HTRA1, STC2, IRE1 suppression, glucose deprivation, glutamine deprivation, hypoxia, glioma U87 cells.