

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

ГАРМАШ ЯНА АНАТОЛІЇВНА



УДК 577.112.7:616

**РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ ERN1 В РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ,
ЩО КОДУЮТЬ СИНТЕЗ ЕНЗИМІВ ГЛІКОЛІЗУ ТА
ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ШУНТА**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

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

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
Шевцова Алла Іванівна,
професор кафедри біохімії та медичної хімії
ДЗ «Дніпропетровська медична академія
МОЗ України»

доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
професор кафедри біохімії і фізіології
тварин ім. акад. М.Ф. Гулого
Національного університету біоресурсів і
природокористування України

Захист відбудеться «26» листопада 2018 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).

Автореферат розісланий «23» жовтня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Надзвичайно важливим напрямком сьогодення є вивчення біохімічних та молекулярних механізмів регуляції експресії генів як за фізіологічних, так і патологічних станів організму. Онкологічні захворювання наразі вважаються найбільш поширеними аномаліями і їх кількість невпинно зростає. Найбільш актуальним питанням сучасної онкології є лікування злоякісних пухлин головного мозку – гліом.

Під загальною назвою гліоми об'єднані близько 30% всіх пухлин головного мозку і ЦНС та 80% усіх злоякісних первинних пухлин головного мозку у дорослих [Goodenberger M. L., 2012]. Вони не є окремим видом пухлин, цей термін використовується для опису лише тих пухлин, які виникають з клітин глії [Тарасова М. В., 2015], — астроцитом, олігодендроцитом, епендимом, гліобластом [Groot J. F., 2015]. Середня тривалість життя пацієнтів після видалення гліобластоми з ад'ювантними променевою та хіміотерапією становить 14,6 місяців [Stupp R., 2005], без лікування – 4,5 місяці [Чомоляк Ю. Ю., 2013]. Даний тип новоутворень має інвазивний характер і розташовується в життєво важливих ділянках головного мозку, що є складним для оперативного втручання. Це супроводжується частими рецидивами хвороби. Незважаючи на інтенсивні дослідження, сучасна терапія злоякісних гліом є незадовільною, і, наразі, необхідно шукати нові підходи для лікування хворих з пухлинами гліального походження [Тарасова М. В., 2015].

Для клітин гліоми, як і будь-яких інших пухлинних клітин, властиве репрограмування метаболізму, щоб задовольнити їх біоенергетичні та біосинтетичні потреби. Злоякісні клітини генерують енергію переважно шляхом гліколізу з утворенням лактату в результаті, а не за допомогою окислення пірувату в мітохондріях з використанням кисню, як у нормальних клітин. Це явище відоме під назвою ефекту Варбурга. Він сприяє виникненню і прогресуванню пухлинних новоутворень. Механізми переходу до гліколізу у пухлині на сьогодні є мало дослідженими [Yu L., 2017]. Онкотрансформованим клітинам необхідний гліколіз для синтезу нуклеїнових кислот і протеїнів, щоб виживати та проліферувати за умов стресу ендоплазматичного ретикулума [Clarke H. J., 2014]. Пентозофосфатний шлях (ПФШ) необхідний трансформованим клітинам для синтезу рибонуклеотидів і є основним джерелом NADPH. Він галузиться від гліколізу після першого етапу метаболізму глюкози. NADPH використовується для синтезу жирних кислот та знешкодження активних форм кисню. Тому, ПФШ відіграє ключову роль у забезпеченні анаболічних потреб пухлинних клітин та у боротьбі з оксидативним стресом [Patra K. S., 2014].

Найбільш чутливим компартментом до порушень гомеостазу клітин є ендоплазматичний ретикулум (ER). Це мультифункціональна органела, що спеціалізується на синтезі протеїнів, ліпідів та гомеостазі Ca^{2+} . Синтез протеїнів являє собою багатоетапний процес, що включає в себе згортання та пост-трансляційні модифікації протеїнів, а також їх експорт у відповідне місце [Walter P., 2011]. Багато фізіологічних та патологічних ситуацій (накопичення

іонів Ca^{2+} у люмені ER, недостатність енергії, окисно-відновлювальні порушення, нестача поживних речовин, накопичення ліпідів, віруси, ксенобіотики, інтоксикація різними сполуками [Chen S., 2014; Сноп М., 2012; Malhi H., 2011; Simon M., 2017]) можуть порушувати правильне згортання протеїнів і таким чином можуть впливати на нормальне функціонування ER та призводити до стресу ER. Слід зазначити, що стрес ER представляє собою так звану відповідь на незгорнуті протеїни (UPR). Стрес ER та резистентність клітин до опосередкованого цим стресом апоптозу є умовами, які забезпечують посилену проліферацію та виживання пухлинних клітин [Namba T., 2015].

ERN1 - є сенсорним протеїном, що локалізований у мембрані ER і має дві ензиматичні активності: протеїнкаїназу та ендорибонуклеазу (ЕС: 2.7.11.1 та 3.1.26.-). Він запускає основний сигнальний шлях стресу ER і тому вивчення його ролі в регулюванні експресії основних генів гліколізу та пентозофосфатного шунта у клітинах гліоми є дуже актуальною проблемою сьогодення. Дослідження експресії цих генів за умов інгібування ERN1, а також за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну, необхідні для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії даних генів та їх ролі у злоякісному рості. Це може бути важливим підґрунтям для подальших досліджень у пошуку потенційних генів-мішеней і розробки нових підходів для боротьби з пухлинами центральної нервової системи, зокрема гліобластомами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано протягом 2012–2018 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.) і «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.) та на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» 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 завдання роботи. Мета дисертаційної роботи – дослідження рівня експресії генів, що кодують ензими гліколізу та пентозофосфатного шунта у клітинах гліоми лінії U87 з повним або частковим пригніченням функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, за умов гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Вивчити рівень експресії генів глюкозо-6-фосфат ізомерази (*GPI*), енолази 1 та 2 (*ENO1*, *ENO2*) і альдолази А та С (*ALDOA*, *ALDOC*) у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального шляху ERN1.

2. Визначити рівень експресії генів ензимів пентозофосфатного шунта (глюкозо-6-фосфат дегідрогенази (*G6PD*), 6-фосфоглюкозолактонази (*PGLS*), рибозо-5-фосфат ізомерази А (*RPIA*), транскетолази (*TKT*), трансальдолази (*TALDO1*)) та пов'язаних з цим метаболічним шляхом генів (гени, що кодують різні субодиниці ензиму фосфорибозилпірофосфатсинтетази (PRPPS) - *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1*, *PRPSAP2*) у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1.

3. Дослідити вплив гіпоксії на експресію генів ензимів гліколізу (*GPI*, *ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC*) та пов'язаного з ними гена глюкозамін-6-фосфат ізомерази 1 (*GNPDA1*) у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності ERN1.

4. Вивчити вплив гіпоксії на експресію генів ензимів пентозофосфатного шляху та пов'язаних з ними генів у клітинах гліоми в залежності від функції ERN1.

5. Дослідити вплив дефіциту глутаміну і глюкози на рівень експресії генів ензимів гліколізу, пентозофосфатного шунта та пов'язаних з цими метаболічними шляхами генів у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму ERN1.

Об'єкт дослідження: експресія генів *GPI*, *GNPDA1*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1*, *ENO2*, *G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TALDO1*, *TKT*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2* людини.

Предмет дослідження: рівень експресії генів, що кодують ензими гліколізу, пентозофосфатного шунта та пов'язані з цими метаболічними шляхами ензими у клітинах гліоми лінії U87 з повним або частковим пригніченням функціональної активності ERN1 за умов гіпоксії, а також дефіциту глюкози і глутаміну у середовищі.

Методи дослідження: культивування клітин гліоми лінії U87 та субліній з пригніченим ERN1, виділення РНК із цих клітин, спектрофотометричне визначення концентрації нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції, полімеразна ланцюгова реакція (в тому числі й кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі), електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації, вестерн-блот аналіз протеїнів (отримання цитозольних фракції протеїнів з культури клітин, визначення концентрації протеїнів, електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі, імуноблотинг), комп'ютерний аналіз результатів кількісної полімеразної реакції, статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми за умов пригнічення ERN1, який опосередковує основний сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, супроводжується змінами рівня експресії генів деяких ензимів гліколізу (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1*, *ENO2*), пентозофосфатного шунта (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT*, *TALDO1*) і пов'язаних з цими метаболічними шляхами ензимів (*GNPDA1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* і *PRPSAP2*), що вказує на їх важливу роль у злякисному рості. Встановлено, що виявлені зміни в експресії досліджених генів опосередковані як ендорибонуклеазною, так і протеїнкіназною активностями

ERN1. Показана залежність рівня експресії більшості цих генів від гіпоксії і виявлена роль ERN1 у гіпоксичній регуляції їх експресії. Показано, що відсутність глутаміну або глюкози у середовищі змінює рівень експресії більшості генів, що кодують синтез ензимів гліколізу, пентозофосфатного шунта та пов'язаних з ними ензимів, у клітинах гліоми, причому ці зміни переважно залежать від функціональної активності сигнального шляху ERN1 і це узгоджується зі зниженим проліферативним потенціалом клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1.

Практичне значення отриманих результатів полягає у з'ясуванні можливих молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми і росту із них пухлин за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула, необхідних для розробки принципово нових підходів до створення анти-пухлинних препаратів для боротьби з гліомами на основі виявлених нами таких генів-мішеней, як *ALDOC*, *ENO2* та *PRPS1*, з врахуванням залежності рівня їх експресії від гіпоксії, а також дефіциту глюкози і глутаміну.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2012–2018 р.р. Дисертантом було самостійно здійснено аналіз літературних даних за темою роботи, виконано експериментальні дослідження з вивчення експресії генів, що кодують синтез основних ензимів гліколізу та пентозофосфатного шляху і пов'язаних з цими метаболічними шляхами ензимів, за умов інгібування функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1, а також за гіпоксії, нестачі глутаміну та глюкози у культуральному середовищі. Також виконано статистичний аналіз отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню експресії певних генів проводились за участі наукових співробітників Харькової А. П., Мінченка Д. О. та Ратушної О. О.; планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на українських і міжнародних конгресах та конференціях: X Міжнародній міждисциплінарній науково-практичній конференції молодих вчених – Шевченківська весна, Київ, 2012; XI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська весна», Київ, Україна, 2013; 7th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, Lviv, Ukraine, 2013; The 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, 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; Joint meeting of the 25th annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» & 2nd conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of

Ukraine, Kyiv, 2017; Basel life 2017, Innovation forum, Basel, Switzerland, 2017; а також на розширеному засіданні кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2018) та науковому семінарі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Київ, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 робіт, із них 8 статей (7 експериментальних і 1 оглядова) в іноземних та українських фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 7 тез доповідей у матеріалах міжнародних та українських наукових форумів, конгресів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 152 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 217 посилань. Робота містить 51 рисунок та 8 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

В огляді літератури представлено сучасні відомості про молекулярні механізми регуляції експресії генів, що кодують ензимами гліколізу, пентозофосфатного шляху та ензимами, асоційованих з ними. Проаналізовано роль цих генів у процесах проліферації та виживання злоякісних клітин. Особлива увага приділена ефектам гіпоксії, нестачі глутаміну та глюкози у розвитку гліом. Окремий підрозділ присвячений стресу ендоплазматичного ретикулума в канцерогенезі та ERN1, ключовому сенсорно-сигнальному ензиму відповіді клітини на стрес ER.

Матеріали та методи досліджень

Експерименти проводили на культурі клітин гліоми мозку людини лінії U87, яка була отримана із ATCC (American Type Culture Collection, США). В даних дослідженнях були використані три сублінії цих клітин гліоми: перша сублінія, контрольна, була стабільно трансфікована «пустим» вектором pcDNA3.1 (Invitrogen, США) (рис. 2.1.1), який використовувався для створення домінантно/негативних конструкцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1; друга сублінія – клітини з домінантно/негативною конструкцією на основі вектора pcDNA3.1, що містила кДНК ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1); була надана професором М. Moenner (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція); третя сублінія – стабільно трансфіковані домінантно/негативною конструкцією dnrERN1 [GenBank accession number JQ425696] клітини з пригніченою функцією ендорибонуклеази ензиму ERN1 (dnrERN1); була

отримана професором О. Г. Мінченко (відділ молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) за участі професора М. Moenner (Університет Бордо 1, Франція). Клітини гліоми порівнювали з нормальними астроцитами людини лінії NHA/TS, яку отримали від докторів Sasai K. та Tanaka S. (Лабораторія молекулярної та клітинної патології, Медична школа університету Хоккайдо, Японія) [Sasai K., 2007].

Клітини гліоми культивували в поживному середовищі DMEM (*Gibco, Invitrogen*, США), що містило 2 мМ глутаміну, 4,5 г/л глюкози, 100 од./мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину (*Gibco*, США), 250 мкг/мл гентаміцину (*Gibco*, США) та 10% ембріональної телячої сироватки (*Equitech-Bio, Inc.*, США), у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ за температури 37°C. Для моделювання умов гіпоксії клітини культивували в атмосфері з 3% O₂, 5% CO₂ та 92% N₂ протягом 16 годин [Minchenko D. O., 2012]. Для дослідження дефіциту глюкози або глутаміну клітини промивали фосфатно-сольовим буфером, додавали середовище без глутаміну або глюкози і культивували протягом 16 годин [Minchenko D. O., 2012]. Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума до культурального середовища додавали інгібітор глікозилування протеїнів антибіотик тунікаміцин (0,01 мг/мл) та інкубували протягом 2 год [Auf G., 2013].

Тотальну РНК із клітин гліоми лінії U87 виділяли використовуючи реагент Trisol згідно протоколу виробника (*Invitrogen*, США) [Minchenko O. H., 2005]. Концентрацію виділеної РНК вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, США) за довжини хвилі 260 нм, а також визначали їх спектральні характеристики. Для синтезу комплементарної ДНК використовували набір реагентів «QuantiTect Reverse Transcription» (*Qiagen*, Німеччина). Для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували набір «HotStartTaq Master Mix Kit» (*Qiagen*, Німеччина) та проводили в ампліфікаторі MasterCycler Personal (*Eppendorf*, Німеччина). Рівень експресії досліджуваних генів визначали методом кількісної ПЛР у реальному часі, для якого використовували реакційну суміш «2xSYBR Green Mix» (*AB gene, Thermo Fisher Scientific*, Великобританія), та ампліфікатори «Mx 3000P QPCR» (*Stratagene*, США) і QuantStudio 5 Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, США).

Визначення вмісту певних протеїнів проводили в цитозольних екстрактах із клітин гліоми методом імуноблотингу після їх електрофорезу в поліакриламідному гелі [Armstead V., 1997].

Для визначення інтенсивності проліферації клітин використовували лічильник Coultronics (Франція), а також камеру Горяєва. Кількість клітин визначали на 4-ий день культивування, підрахунки проводили у трьох повторях у кожному з п'яти експериментів.

Аналіз результатів кількісної ПЛР проводили у програмі «Differential expression calculator». Для статистичного аналізу використовували двовибірковий t-тест для середнього, обчислення проводили у програмі Microsoft Excel [Гланц С., 1998]. Результати виражали як $M \pm m$. Відмінність між двома значеннями вважали достовірною, коли значення Р було меншим за 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення

Експресія генів, що кодують ензими гліколізу у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Існують дані, що ERN1 сприяє розвитку пухлини як через його ендорибонуклеазну активність [Chen S., 2014; Jabouille A., 2015], так і через протеїнкіназу ERN1 [Auf G., 2013]. Більше того, інактивація ERN1 за допомогою домінантно-негативних конструкцій або міРНК призводить до зниження патологічного ангиогенезу на моделях гліобластоми людини, але посилюють інвазію [Auf G., 2010]. Проведені нами дослідження показали, що інгібування лише ендорибонуклеазної активності сигнального ензиму ERN1 призводить до більш виражених змін в інтенсивності проліферації клітин гліоми лінії U87 порівняно з клітинами з пригніченими обома активностями: протеїнкінази та ендорибонуклеази ERN1 (рис. 1).

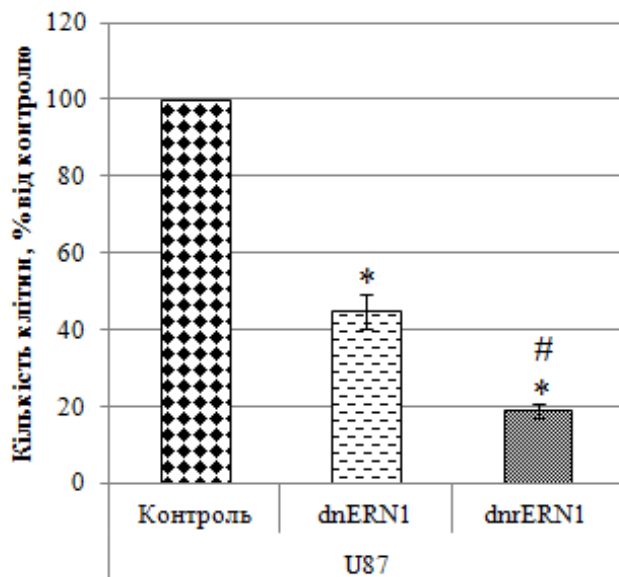


Рис. 1. Інтенсивність проліферації клітин гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (Контроль), та субліній цих клітин з повним пригніченням функції сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) або лише ендорибонуклеази ERN1 (dnrERN1); 4-й день. $n = 5$; * – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем; # – $P < 0.05$ у порівнянні з dnERN1

Встановлено, що за умов пригнічення ензиму ERN1 спостерігається зростання рівня експресії генів *GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2* на рівні мРНК (табл. 1).

Оскільки існують свідчення того, що ріст гліоми залежить від експресії *ENO2*, ми дослідили також і рівень протеїну ENO2 (рис. 2). На представленій блотограмі чітко видно, що кількість цього протеїну в клітинах гліоми також зростає.

За умов інгібування лише ендорибонуклеазної активності також спостерігали зростання рівня експресії досліджених генів (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2*) порівняно з контрольними клітинами (табл. 1).

Встановлено також, що за умов індукції стресу ЕР тунікаміцином рівень експресії мРНК *ALDOC* у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною активністю знижується, що свідчить про участь протеїнкіназної активності ензиму ERN1 у регуляції експресії даного гена. В той же час, рівень експресії мРНК *ENO2* підвищується, що вказує на опосередкованість цих змін іншими

сенсорно-сигнальними шляхами системи UPR. Разом з тим, достовірних змін відносного рівня експресії генів *GPI*, *ALDOA* та *ENO1* за умов індукції стресу ER тунікаміцином виявлено не було, що вказує на участь лише ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 у регуляції їх експресії (табл. 1).

Таблиця 1

Рівень експресії генів гліколізу за умов пригнічення ензиму ERN1 у клітинах гліоми

Гени	Контроль	dnERN1	dnrERN1	dnrERN1+t
<i>GPI</i>	100%	↑ (+30%)	↑ (+49%)	-
<i>ALDOA</i>	100%	↑ (+28%)	↑ (+33%)	-
<i>ALDOC</i>	100%	↑ (+822%)	↑ (+16%)	↓ (-22%)
<i>ENO1</i>	100%	↑ (+25%)	↑ (+27%)	-
<i>ENO2</i>	100%	↑ (+272%)	↑ (+252%)	↓ (-40%)

Примітки (тут і далі):

Значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, прийнятим за 100%;

U87 – лінія клітин гліоми людини U87 та її сублінії – з повним пригніченням ензиму ERN1 (dnERN1), з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) та при додаванні тунікаміцину (dnrERN1+t);

↑ - відносний рівень експресії зростає;

↓ - відносний рівень експресії знижується.

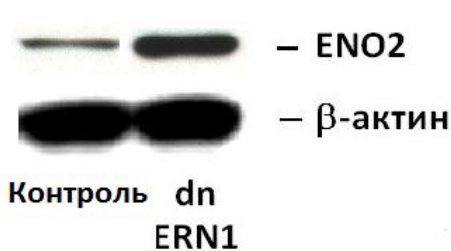


Рис. 2. Блотограма результатів аналізу вмісту протеїну ENO2 у цитозольній фракції протеїнів у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Контроль) та у клітин з пригніченням обох активностей ензиму ERN1 (dnERN1)

Отже, експресія всіх досліджуваних генів ензимів гліколізу у клітинах гліоми залежить від функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Відомо, що цей сигнальний ензим стресу ендоплазматичного ретикулума контролює експресію великої групи генів, причому різними шляхами: шляхом індукції альтернативного сплайс-варіанта транскрипційного фактора ХВР1, а також специфічної деградації певних РНК і вибіркового розщеплення мікроРНК. У зв'язку з цим, нами було проведено біоінформаційний аналіз промоторних ділянок досліджених генів ензимів гліколізу на наявність специфічної послідовності, яка розпізнається транскрипційним фактором ХВР1 – CCACG/CGTGG [Acosta-Alvear D., 2007].

У результаті проведеного аналізу в промоторних ділянках генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC* виявлені специфічні до транскрипційного фактора ХВР1 послідовності ССАСГ/CGTGG, що можуть його зв'язувати (ХВР1-responsive element) (табл. 2).

При аналізі промоторних ділянок досліджених генів було виявлено чотири залежних від ХВР1 елементи в гені *ENO2*, п'ять – для *ALDOC*, по два – в генах *ENO1* та *GPI*, причому в генах енолази всі вони розташовані у зворотному напрямку: від 3' до 5' (табл. 2). Отримані дані вказують на можливість регуляції експресії генів *GPI*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2* транскрипційним фактором ХВР1 за умов стресу ЕР.

Таблиця 2

Послідовності ССАСГ/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1, у промоторних ділянках генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC*

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>GPI</i>	-296 до -292	aaCGTGGa	1; NM_000175
<i>GPI</i>	59 до 63	cCCACGcg	1 NM_000175
<i>ALDOC</i>	-202 до -198	caCGTGGt	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-122 до -118	gCCACGga	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-71 до -67	ggCGTGGt	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-8 до -4	gCCACGcc	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	11 до 15	tCCACGta	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-28 до -24	tCCACGta	2; NC_000017.11
<i>ENO2</i>	-331 до -327	ggCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO2</i>	-310 до -306	cgCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO2</i>	-99 до -95	gcCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO2</i>	-63 до -58	ctCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO1</i>	-389 до -385	caCGTGGg	4; NM_001428
<i>ENO1</i>	-1 до 4	gaCGTGGg	4; NM_001428
<i>ALDOA</i>		Не ідентифіковано	5

Примітки:

1 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_708357/

2 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721664/

3 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721768/

4 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722031/

5 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721650/

Експресія генів, що кодують ензими пентозофосфатного шунта та пов'язаного з ним ензиму у клітинах гліоми з повним та частковим пригніченням ERN1. За умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу ER – ERN1 – у клітинах гліоми людини лінії U87 спостерігається зниження відносного рівня експресії генів *PGLS*, *TALDO1* та *PRPSAP2*, із одночасним підвищенням експресії мРНК *PRPS1*, *PRPS2* та *PRPSAP1* (табл. 3). У той же час, за умов інгібування лише ендорибонуклеазної активності ERN1 зміни рівня експресії цих генів істотно відрізнялися від тих, що спостерігалися в клітинах з dnER1, а це свідчить про ймовірність їх регуляції протеїнкіназною активністю сигнального ензиму ERN1.

У даній роботі також було показано, що рівень експресії генів ензимів пентозофосфатного шунта і пов'язаних з ним протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1 переважно змінюється за рахунок протеїнкіназної активності ERN1 (табл. 3).

Таблиця 3

Рівень експресії генів пентозофосфатного шляху та пов'язаного з ним ензиму за умов пригнічення ензиму ERN1 у клітинах гліоми

Гени	Контроль	dnER1	dnrER1	dnrER1+t
<i>G6PD</i>	100%	-	↑ (+50%)	↑ (+43%)
<i>PGLS</i>	100%	↓ (-22%)	↑ (+13%)	↑ (+52%)
<i>RPIA</i>	100%	-	↓ (-13%)	↓ (-49%)
<i>TKT</i>	100%	-	↑ (+15%)	-
<i>TALDO1</i>	100%	↓ (-35%)	↑ (+12%)	↑ (+22%)
<i>PRPS1</i>	100%	↑ (+150%)	↑ (+11%)	↓ (-58%)
<i>PRPS2</i>	100%	↑ (+52%)	↓ (-11%)	↓ (-40%)
<i>PRPSAP1</i>	100%	↑ (+51%)	↑ (+13%)	-
<i>PRPSAP2</i>	100%	↓ (-35%)	-	-

Вплив гіпоксії на рівень експресії генів ензимів гліколізу та пов'язаного з ним ензиму GNPDA1 у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності ERN1. Гіпоксія, як і стрес ER, є важливим фактором, що впливає на проліферацію та виживання пухлинних клітин. З літературних даних відомо, що обумовлене гіпоксією зниження активності ензимів ПФШ і пов'язане з ним підвищення активності ензимів гліколізу є універсальним феноменом, який тісно пов'язаний зі збільшенням міграції та зменшенням проліферації у клітин різних типів. Крім того, зв'язок між ПФШ та проліферацією

з одного боку та гліколізом і міграцією з іншого, спостерігається незалежно від рівня кисню [Kathagen-Buhmann A., 2016].

Наступна серія досліджень була присвячена вивченню ефектів гіпоксії на рівень експресії генів ензимів гліколізу (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2*) і пов'язаного з ним ензиму (*GNPDA1*) у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сигнального ензиму ERN1 (рис. 3). В результаті проведених досліджень було виявлено, що рівень експресії всіх цих генів, за винятком *GNPDA1*, істотно посилюється, але найбільш виражені зміни спостерігаються для генів *GPI*, *ALDOC* та *ENO2*, причому пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 істотно змінювало вираженість гіпоксичної регуляції експресії більшості досліджених генів (*GPI*, *GNPDA1*, *ALDOC* та *ENO2*).

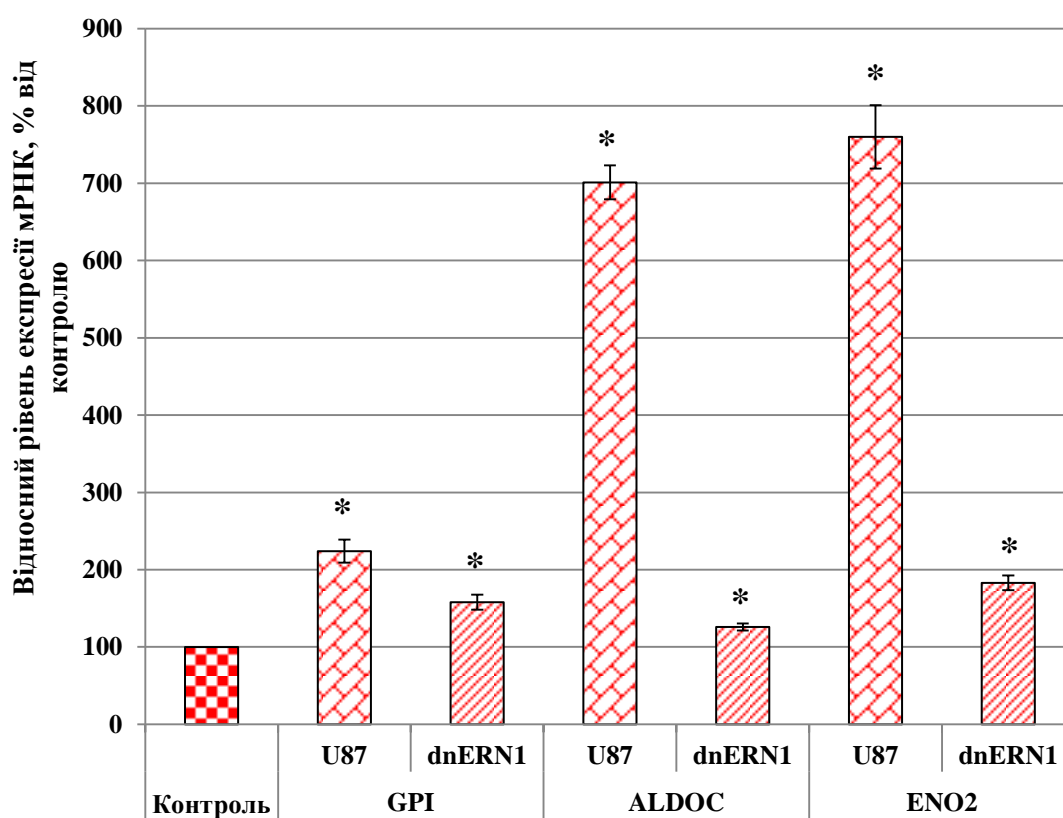


Рис. 3. Рівень експресії генів ензимів гліколізу на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми лінії U87 (U87) та її сублінії з пригніченням активності ензиму ERN1 (dnERN1) за умов гіпоксії. Тут і далі: Контроль – клітини гліоми лінії U87, трансфіковані «пустим» вектором; n = 4; * – P < 0,05 у порівнянні з відповідним контролем.

Відомо, що гіпоксія змінює рівень експресії великої групи генів переважно через активацію транскрипційного фактора HIF (hypoxia inducible factor). У зв'язку з цим, нами було проведено біоінформаційний аналіз промоторних ділянок досліджених генів гліколізу на наявність специфічної послідовності, яка розпізнається транскрипційним фактором HIF – A(G)CGTGG(C)/(G)CCACGC(T) [Minchenko O.H., 2004].

Аналіз послідовностей A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що зв'язують транскрипційний фактор HIF, виявлених у промоторних ділянках генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC* показав наявність в їх структурі сайтів зв'язування ХВР1 CGTGG/CCACG (табл. 4). Це унікальне явище виявлено вперше і воно частково розкриває механізми кооперативної регуляції експресії генів деяких ключових ензимів гліколізу через специфічні сайти зв'язування різних транскрипційних факторів, а також надає можливість пояснити залежність гіпоксичної регуляції від функціональної активності ERN1, що контролює альтернативний сплайсинг ХВР1 і забезпечує утворення його транскрипційно активної форми. Цілком можливо, що у контрольних клітинах гліоми гіпоксія проявляє більш виражений ефект на рівень експресії генів *GPI*, *ENO2* та *ALDOC* за рахунок поєднаного ефекту HIF та ХВР1, а у клітинах гліоми з пригніченим ERN1, в яких не утворюється транскрипційно активна форма ХВР1, ефект гіпоксії значно менший.

Таблиця 4

Послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що зв'язують транскрипційний фактор HIF, у промоторних ділянках генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC*

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>GPI</i>	-297 до -292	aACGTGGa	1; NM_000175
<i>GPI</i>	59 до 64	cCCACGCg	1 NM_000175
<i>ALDOC</i>	-203 до -198	cACGTGGt	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-72 до -67	gGCGTGGt	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-8 до -3	gCCACGCc	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	11 до 16	tCCACGTa	2; NM_005165
<i>ALDOC</i>	-28 до -23	tCCACGTa	2; NC_000017.11
<i>ENO2</i>	-332 до -327	gGCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO2</i>	-311 до -306	cGCGTGGg	3; NM_001975
<i>ENO1</i>	-390 до -385	cACGTGGg	4; NM_001428
<i>ENO1</i>	-2 до 4	gACGTGGg	4; NM_001428

Примітки:

1 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_708357/

2 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721664/

3 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721768/

4 - http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722031/

Вплив гіпоксії на рівень експресії генів, що кодують ензими пентозофосфатного шляху та пов'язаного з ним ензиму у клітинах гліоми в залежності від функції ERN1. Нами також був досліджений вплив гіпоксії на рівень експресії генів ензимів пентозофосфатного шляху (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT*, *TALDO1*) та пов'язаного з ним ензиму PRPPS (*PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2*) у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 (рис. 4).

Результати цих досліджень показали, що рівень експресії генів *RPIA*, *TALDO1*, *PRPS1* та *PRPS2* знижувався за цих умов.

Також ми показали, що гіпоксія не впливала на рівень експресії генів *G6PD*, *TKT*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2* у контрольних клітинах, а пригнічення ензиматичних активностей ERN1 модифікувало вплив гіпоксії на експресію досліджуваних генів у клітинах гліоми.

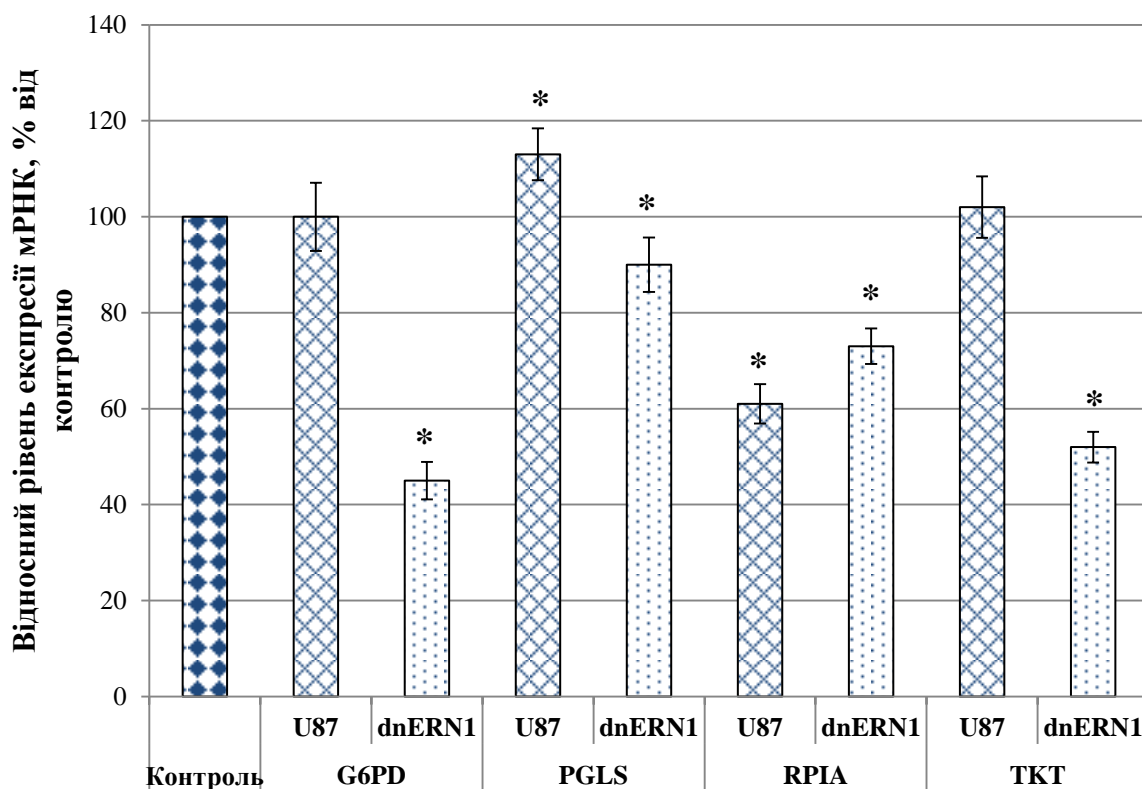


Рис. 4. Рівень експресії генів ензимів пентозофосфатного шунта на рівні мРНК (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми лінії U87 (U87) та її сублінії з пригніченням активності ензиму ERN1 (dnERN1) за умов гіпоксії.

Цікаво відмітити, що інгібування ензиматичних активностей ERN1 у клітинах гліоми модифікує гіпоксичну регуляцію експресії усіх досліджуваних генів геноспецифічно. Можливо, що молекулярні механізми регуляції різних генів за гіпоксії є складнішими і залежать не тільки від рівня протеїну HIF-1 α . Нещодавно було показано, що гіпоксія значно підвищує рівень протеїну HIF-1 α як у контрольних, так і в ERN1-нокаутних клітинах гліоми, у той час як за умов

інгібування ERN1 рівень цього протеїну знижується [Minchenko O. H., 2016]. Наші результати підтверджують теорію, що гіпоксична регуляція експресії різних генів відбувається через складну мережу, яка частково контролюється ERN1-сигнальним шляхом. Відомо, що пригнічення ензиматичних активностей ERN1 у клітинах гліоми призводить до гальмування неоваскуляризації пухлини [Auf G., 2010].

Таким чином, це дослідження доводить, що гіпоксія, яка зазвичай сприяє росту пухлини, впливає практично на експресію усіх досліджених генів, і що інгібування активностей ERN1 може як підсилювати, так і пригнічувати вплив гіпоксії на рівень експресії цих генів геноспецифічно і тим самим, можливо, гальмує збільшення гліоми.

Вплив дефіциту глутаміну і глюкози на рівень експресії генів ензимів гліколізу, пентозофосфатного шунта та ензимів, пов'язаних з цими метаболічними шляхами, у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму ERN1. Основним джерелом енергії в організмі є вуглеводи. Глюкоза є центральною молекулою вуглеводного розпаду і синтезу. Усі метаболічні шляхи вуглеводного обміну пов'язані з перетворенням глюкози. Розщеплення глюкози до пірувату у гліколізі є основним джерелом енергії та відіграє ключову роль у біосинтезі АТФ для пухлинних клітин. Перетворення глюкози у пентозофосфатному шунті (ПФШ) забезпечує клітини молекулами NADPH і рибозо-5-фосфатом [Schulze A., 2012; Vander Heiden M.G., 2009].

Глутамін є найпоширенішою амінокислотою в людському організмі. Він є попередником синтезу багатьох амінокислот, протеїнів, нуклеотидів та інших біологічно активних речовин у клітинах. Саме він забезпечує необхідний для підтримки окисно-відновного гомеостазу рівень NADPH та глутатіону (GSH) [Mohamed A., 2014]. Крім того, є основним донором біогенного азоту для клітин, що активно діляться. І тому глутамін відіграє вирішальну роль у рості та проліферації клітин, особливо клітин глії. Доведено, що порушення у метаболізмі глутаміну призводить до пригнічення росту пухлин, у той час як додавання глутаміну може індукувати або інгібувати загибель клітин залежно від типу клітин [Fuchs B. C., 2006].

Тому наступна серія досліджень була присвячена визначенню впливу дефіциту глюкози та глутаміну на рівні експресії генів гліколізу (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* та *ENO2*), пентозофосфатного шунта (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT*, *TALDO1*) та асоційованих з ними генів (*GNPDA1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2*). Дані дослідження проводилися на клітинах гліоми лінії U87, що були трансфіковані «пустим» вектором (U87), та на їх генетично модифікованому варіанті з пригніченою функціональною активністю сигнального ензиму ERN1 (dnER1). Результати представлені у таблицях 5 та 6.

Було показано, що рівень експресії генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2* та *ALDOC* знижується в обох типах клітин за умов відсутності глутаміну у культуральному середовищі, але у клітинах з повним пригніченням функції сигнального ензиму ERN1 цей ефект був більш вираженим для гена *ENO2*. Тому можна зробити

висновок, що експресія генів *GPI* та *ALDOC* контролюється факторами відмінними від ензиму ERN1, так як пригнічення функціональної активності цього сигнального ензиму не призводить до суттєвих змін рівня експресії досліджуваних генів за умов дефіциту глюкози у культуральному середовищі. Проте, у клітинах гліоми з дефектним ERN1 рівень експресії мРНК *GNPDA1* збільшувався при його незмінній експресії у контрольних клітинах, що вказує на ймовірну участь сигнального ензиму ERN1 у регуляції експресії досліджуваного ензиму.

У той же час, за умов відсутності глюкози у середовищі рівень мРНК генів *GPI*, *ALDOA*, *ALDOC* та *ENO1* суттєво не змінювався в обох типах клітин. Однак, рівень експресії гена *GNPDA1* істотно зростав як у контрольних клітинах, так і у клітинах з пригніченням активностей сигнального ензиму ERN1. Рівень експресії мРНК *ENO2* знижувався у контрольних клітинах гліоми і, навпаки, підвищувався в клітинах, що експресували функціонально неактивний сигнальний ензим ERN1, а це свідчить про можливу участь ERN1 у регуляції експресії даного гена.

Таблиця 5

Вплив дефіциту глютаміну та глюкози на відносний рівень експресії генів ензимів гліколізу та пов'язаного з ним ензиму *GNPDA1* за умов пригнічення активності ERN1 у клітинах гліоми

Гени	U87			dnERN1		
	Контроль 1	Дефіцит глютаміну (відносно Контролю 1)	Дефіцит глюкози (відносно Контролю 1)	dnERN1 відносно Контролю 1 (Контроль 2)	Дефіцит глютаміну (відносно Контролю 2)	Дефіцит глюкози (відносно Контролю 2)
<i>GPI</i>	100%	↓ (-26%)	-	↑ (+30%)	↓ (-29%)	-
<i>GNPDA1</i>	100%	-	↑ (+42%)	↓ (-56%)	↑ (+18%)	↑ (+89%)
<i>ALDOA</i>	100%	-	-	↑ (+28%)	↓ (-14%)	-
<i>ALDOC</i>	100%	↓ (-24%)	-	↑ (+822%)	↓ (-21%)	↓ (-7%)
<i>ENO1</i>	100%	↓ (-20%)	-	↑ (+25%)	↓ (-34%)	↓ (-16%)
<i>ENO2</i>	100%	↓ (-25%)	↑ (+32%)	↑ (+272%)	↓ (-80%)	↓ (-67%)

Результати проведених досліджень продемонстрували наявність різної чутливості експресії генів ензимів гліколізу *GPI*, *GNPDA1*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1*, *ENO2* до дефіциту глютаміну і глюкози у культуральному середовищі та її виражену залежність від функціональної активності ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Більше того, суттєве посилення експресії генів *ENO2* та *ENO1* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 корелює з пригніченням росту пухлин з цих

клітин *in vivo* [Auf G., 2010; Drogat B., 2007] і, можливо, вносить свій вклад у цей процес, оскільки енолаза 1 та енолаза 2 є мультифункціональними ензимами і приймають участь не лише у гліколізі, а і у багатьох інших процесах, зокрема у процесах проліферації шляхом зв'язування з промотором *c-myc*, виконуючи функцію пухлинного супресора та нейропротекторну функцію [Hatakeyama K., 2011; Yeh C.S., 2008].

Наступна серія досліджень була присвячена вивченню експресії генів ензимів пентозофосфатного шунта та пов'язаного з цим метаболічним шляхом ензиму PRPPS у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну і глюкози та її залежність від активності сигнального шляху ERN1 (табл. 6).

Встановлено, що за умов дефіциту глутаміну підвищувався рівень експресії генів *G6PD* та *PGLS* і знижувався рівень експресії чотирьох різних генів (*PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2*), що кодують різні субодиниці ензиму PRPPS, у контрольних клітинах гліоми. Однак, в результаті пригнічення ERN1 рівень експресії гена *G6PD* не змінювався, генів *PGLS* та *PRPSAP2* – зростав, а генів *PRPS1*, *PRPS2* та *PRPSAP1* – знижувався ще більш суттєво за умов дефіциту глутаміну у середовищі. У той час, експресія генів *RPIA*, *TKT* та *TALDO1* у контрольних клітинах була резистентною до умов дефіциту глутаміну, але пригнічення ензиматичних активностей ERN1 модифікувало вплив цих умов на експресію генів і призвело до зростання рівня мРНК *TKT* та *TALDO1*.

Нами також встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі призводить до посилення експресії генів *G6PD*, *PGLS* та *TKT* як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Разом з тим, рівень експресії мРНК *RPIA* знижувався у клітинах гліоми, але лише у тих клітинах, що мали нативний ERN1, а у клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму ERN1 рівень його експресії істотно не змінювався за умов відсутності у середовищі глюкози.

Дослідження рівня експресії гена *TALDO1* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози показало, що рівень його експресії за цих експериментальних умов істотно не змінюється, що може вказувати на важливість цього ензиму у функціонуванні ПФШ не лише як джерела рибозо-5-фосфату і нуклеотидів, а й для підтримання рівня NADPH, необхідного для синтезу ліпідів, а також відновленого глутатіону для захисту сульфгідрильних груп і цілісності клітин від оксидативного стресу.

Було виявлено, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *PRPS1* та *PRPS2* знижувався і у контрольних клітинах гліоми, і у клітинах з пригніченою ензиматичною активністю ERN1. Це свідчить про те, що експресія цих генів контролюється факторами відмінними від ензиму ERN1, так як пригнічення функціональної активності цього сигнального ензиму не призводить до суттєвих змін рівня експресії досліджуваних генів за умов дефіциту глюкози у середовищі. Для генів *PRPSAP1* та *PRPSAP2* – навпаки. Їх рівень експресії не змінювався у контрольних клітинах і зростав у клітинах з дефектним ензимом ERN1, що вказує на залежність регуляції експресії від останнього.

Таблиця 6

Вплив дефіциту глутаміну та глюкози на рівень експресії генів ензимів пентозофосфатного шляху та пов'язаного з цим метаболічним шляхом ензиму PRPS за умов пригнічення ензиматичної активності ERN1 у клітинах гліоми

Гени	U87			dnERN1		
	Контр оль 1	Дефіцит глутаміну (відносно Контрол ю 1)	Дефіцит глюкози (відносно Контролю 1)	dnERN1 відносно Контролю 1 (Контроль 2)	Дефіцит глутаміну (відносно Контролю 2)	Дефіцит глюкози (відносно Контролю 2)
<i>G6PD</i>	100%	↑ (+24%)	↑ (+19%)	-	-	↑ (+24%)
<i>PGLS</i>	100%	↑ (+11%)	↑ (+16%)	↓ (-22%)	↑ (+42%)	↑ (+37%)
<i>RPIA</i>	100%	-	↓ (-16%)	-	-	-
<i>TKT</i>	100%	-	↑ (+11%)	-	↑ (+61%)	↑ (+16%)
<i>TALDO1</i>	100%	-	-	↓ (-35%)	↑ (+17%)	-
<i>PRPS1</i>	100%	↓ (-41%)	↓ (-27%)	↑ (+150%)	↓ (-63%)	↓ (-24%)
<i>PRPS2</i>	100%	↓ (-43%)	↓ (-41%)	↑ (+52%)	↓ (-57%)	↓ (-43%)
<i>PRPSAP1</i>	100%	↓ (-11%)	-	↑ (+51%)	↓ (-32%)	↑ (+15%)
<i>PRPSAP2</i>	100%	↓ (-14%)	-	↓ (-35%)	↑ (+15%)	↑ (+25%)

Отже, результати вище описаних досліджень свідчать про різнонаправлений характер змін експресії мРНК досліджених нами генів пентозофосфатного шляху та пов'язаного з ним генів (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT*, *TALDO1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* та *PRPSAP2*) до відсутності глутаміну або глюкози у культуральному середовищі та про її залежність від активності ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз і експериментальне рішення актуальної наукової задачі щодо вивчення ролі деяких генів гліколізу та пентозофосфатного шунта у зниженні проліферативного потенціалу клітин гліоми. Ефект пригнічення проліферації клітин гліоми, опосередкований пригніченням сенсорно-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1. Також було досліджено експресію цих генів за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози, що необхідно для розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі ERN1-опосередкованого

контролю проліферації пухлинних клітин і можуть сприяти ідентифікації нових потенційних генів-мішеней в розробці протипухлинних препаратів.

1. Встановлено, що за умов пригнічення функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 рівень експресії генів *GPI*, *ENO1*, *ENO2*, *ALDOA* та *ALDOC* збільшується, причому за рахунок ендорибонуклеази ERN1, за винятком гена *ALDOC*, в регуляції експресії якого задіяна протеїнкіназна активність цього сигнального ензиму.

2. Показано, що рівень експресії генів пентозофосфатного шунта у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1 переважно змінюється за рахунок протеїнкіназної активності ERN1.

3. Встановлено, що гіпоксія збільшує рівень експресії генів ензимів гліколізу у клітинах гліоми лінії U87, причому вплив гіпоксії на експресію більшості із них залежить від функціональної активності сигнального ензиму ERN1.

4. Показано, що гіпоксія знижує рівень експресії лише частини генів пентозофосфатного шунта та пов'язаних з ним генів (*RPIA*, *TALDO1*, *PRPS1* та *PRPS2*), а пригнічення функціональної активності ERN1 істотно змінює чутливість експресії більшості цих генів до гіпоксії.

5. Встановлено, що відсутність глутаміну або глюкози у середовищі впливає на рівень експресії більшої частини досліджених генів у клітинах гліоми залежно від функціональної активності сигнального ензиму ERN1 і це узгоджується зі зниженим проліферативним потенціалом клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів енолази та альдолази у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 / **Гармаш Я.**, Компанієць Д., Губеня О., Мінченко Д. // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2013. - № 16. – С. 5—9. (*Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ALDOA, ALDOC, ENO1 та ENO2 та обробку даних*).

2. IRE-1 dependent expression of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase genes in U87 glioma cells: effect of glucose or glutamine deprivation / Minchenko D.O., **Garmash I.A.**, Bashta Y.M., Kustkova G.S., Zalesna Y.D., Bikfalvi A., Minchenko O.H. // International Journal of Genomic Medicine. – 2013. – Vol. 1, Issue 1, 104. - P. 1—5. (*Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів PRPS1, PRPS2, PRPSAP1, PRPSAP2 у клітинах гліоми лінії U87 за умов дефіциту глюкози або глутаміну та обробку даних*).

3. Expression of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase genes in U87 glioma cells with ERN1 knockdown: effect of hypoxia and endoplasmic reticulum stress / Minchenko O.H., **Garmash I.A.**, Kovalevska O.V., Tsybal D.O., Minchenko D.O. // Ukr. Biochem. J. - 2014. – Vol. 86, № 6. – P. 74—83. (*Особистий внесок*

здобувача – проведено дослідження експресії генів *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1*, *PRPSAP2* у клітинах гліоми лінії U87 за гіпоксії та обробку даних).

4. Експресія мРНК *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за умов дефіциту глюкози / **Гармаш Я.А.**, Мінченко Д.О., Харькова А.П., Мінченко О.Г. // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2014. – № 2 (67). – С. 14—19. (Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів, обробку даних та підготовлено матеріали до друку).

5. Acute L-glutamine deprivation affects the expression of *G6PD*, *GPI*, *TKT*, *TALDO1*, *PGLS* and *RPIA* genes in U87 glioma cells: effect of ERN1 knockdown / **Garmash I.A.**, Minchenko D.O., Kompaniets D.O., Kulinich A.O., Kovalevska O.V., Minchenko O.H. // Biol. System. – 2014. – Vol. 6, Is. 1.— P. 30 – 38. (Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів за умов дефіциту глутаміну та обробку даних).

6. Inhibition of IRE1 modifies hypoxic regulation of *G6PD*, *GPI*, *TKT*, *TALDO1*, *PGLS* and *RPIA* genes expression in U87 glioma cells / Minchenko O.H., **Garmash I.A.**, Minchenko D.O., Kuznetsova A.Y., Ratushna O.O. // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, N 1. – P. 38—49. (Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів за гіпоксії та обробку даних).

7. Expression of tumor growth related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia / Minchenko O.H., Luzina O.Y., Hnatiuk O.S., Minchenko D.O., **Garmash I.A.**, Ratushna O.O. // Ukr. Biochem. J. – 2017. — Vol. 89, N 5. – P. 40—51. (Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії гена *GNPDA1*).

8. Молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії / Мінченко Д.О., Губеня О.В., Кубайчук К.І., Бакалець Т.В., **Гармаш Я.А.**, Кривдюк І.В., Маруніч Р.Ю., Терлецький Б.М., Сулік Р.В., Мурашко Н.К., Мінченко О.Г. // Біологічні студії / Studia Biologica. - 2013. – Т. 7, № 1. – С. 159—176. (Особистий внесок здобувача – підготовлено частину матеріалів до друку).

9. Hypoxic regulation of the expression of pentose phosphate pathway genes in glioma cells / **Harmash Y.A.**, Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Minchenko O.H. // X International Interdisciplinary Scientific Conference of Students and Young Scientists SHEVCHENKIVSKA VESNA 2012: March 19-23, 2012, P. 6—7.

10. Вплив гіпоксії на експресію генів енолази та альдолази у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 / Компанієць Д., **Гармаш Я.**, Мінченко Д. // Шевченківська весна 2013: Біологічні науки. Матеріали XI міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців. - Київ, 2013. – С. 56.

11. ERN1 dependent character of pentose phosphate pathway gene expressions in U87 glioma cells: effect of glucose and glutamine deprivation / **Garmash I.**, Minchenko D., Danilovskyi S., Hilfanov A., Zalesna Y., Minchenko O. //

The 7th Lviv-Lublin conference of Experimental and Clinical Biochemistry. 23-24 May, 2013, Lviv, Ukraine, p. 46.

12. Pentose phosphate pathway gene expression in glioma cell line U87 with signaling enzyme ERN1 loss of function: effect of hypoxia / **Garmash I.A.**, Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Hilfanov A.R., Zalesna Y.D., Sulik R.V., Minchenko O.H. // The 38th FEBS Congress. 6-11 July, 2013, Saint Petersburg, Russia. – P. 238.

13. Вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула / **Гармаш Я.А.**, Мінченко О.Г. // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології. III Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених, 24-27 лютого, 2014: Збірник тез. - Донецьк, 2014. - С.- 277.

14. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів *G6PD*, *TALDO1*, *TKT*, *PGLS* та *RPIA* у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула / **Гармаш Я.А.**, Харькова А.П., Мінченко О.Г. // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., Київ, Україна - Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5, Suppl. 1. – P. 137 – 138.

15. ERN1 inhibition modifies hypoxic adjustment of genes, which encode proliferation related factors in U87 glioma cells / **Garmash I.A.**, Minchenko D.O., Ratushna O.O., Minchenko O.H. / Basel life 2017. Innovation forum, 10 – 13 September, Basel, Switzerland, 2017. – P. 24.

АНОТАЦІЯ

Гармаш Я. А. Роль сигнального шляху ERN1 в регуляції експресії генів, що кодують синтез ензимів гліколізу та пентозофосфатного шунта. – Рукопис.

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

Дисертація присвячена дослідженню експресії генів, що кодують ензимами гліколізу, пентозофосфатного шунта та деяких інших ензимів, пов'язаних з цими метаболічними шляхами. Експресія цих генів визначалася 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 глутаміну або глюкози. Ці дослідження дозволяють встановити можливу роль цих генів в опосередкованому ERN1 контролі проліферації клітин гліоми.

Вперше було показано, що за умов пригнічення ERN1, який опосередковує основний сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула, змінюється рівень експресії генів деяких ензимів гліколізу (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1*, *ENO2*) та пентозофосфатного шляху (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT*, *TALDO1*) і ензимів

(*GNPDA1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* і *PRPSAP2*), пов'язаних з ними метаболічними шляхами, у клітинах гліоми, що вказує на їх важливу роль у злякисному рості. Встановлено, що виявлені зміни в експресії досліджених генів опосередковані як ендорибонуклеазною, так і протеїнкіназною активностями ERN1. Вперше показано, що пригнічення ензиму ERN1 модифікує ефекти гіпоксії та дефіциту поживних речовин (глутаміну або глюкози) на експресію частини досліджених генів.

Отримані результати свідчать про важливу роль генів ензимів гліколізу, пентозофосфатного шунта та пов'язаних з цими метаболічними шляхами ензимів у регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми за пригнічення функціональної активності ERN1, а також частково розкривають молекулярні механізми впливу гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на ERN1, основний сенсорно-сигнальний ензим відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулула.

Ключові слова: гліома, експресія генів, ERN1, стрес ендоплазматичного ретикулула, гліколіз, пентозофосфатний шлях, гіпоксія, дефіцит глюкози, дефіцит глутаміну.

ANNOTATION

Garmash I. A. ERN1 regulation of genes expression encoded enzymes synthesis of glycolysis and pentose phosphate pathway. - 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, 2018.

Expression of genes encoding glycolysis, pentose phosphate pathway and associated with these metabolic pathways enzymes is studied in the following thesis. Levels of certain genes expression are investigated in glioma cell line U87 under inhibition of ERN1 enzymatic activity, which is a main sensor enzyme of ER stress. Also influence of hypoxia and deprivation of glutamine and glucose on genes expression is investigated to assess the role of these genes in ERN1-mediated control of glioma cells proliferation.

For the first time it have been demonstrated that inhibition of ERN1, which is key enzyme of ER stress signal pathway, leads to changes of genes expression levels of certain enzymes involved in glycolysis (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* and *ENO2*), pentose phosphate pathway (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT* and *TALDO1*) and associated with these metabolic pathways enzymes (*GNPDA1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* and *PRPSAP2*). The effect indicates an important role of these enzymes in malignant growth of glioma cells. It was found that changes in genes expression levels are mediated by both endoribonuclease and proteinkinase activities of ERN1 enzyme. It has been proved that ERN1 inhibition modifies effects of hypoxia and deprivation of nutrients (glucose and glutamine) on expression levels of certain genes.

Obtained results exhibit significant role of glycolysis and pentose phosphate pathway enzymes in glioma cells proliferation under downregulated activity of ERN1.

Molecular mechanisms of hypoxia and nutrients deficiency influence on ERN1 are partly discovered as well

Keywords: glioma, gene expression, ERN1, endoplasmic reticulum stress, glycolysis, pentose phosphate pathway, hypoxia, glucose deprivation, glutamine deprivation.

АННОТАЦИЯ

Гармаш Я. А. Роль сигнального пути ERN1 в регуляции экспрессии генов, кодирующих синтез энзимов гликолиза и пентозофосфатного шунта. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию уровня экспрессии генов, кодирующих энзимы гликолиза, пентозофосфатного шунта и связанных с этими метаболическими путями энзимы в клетках глиомы линии U87 в условиях ингибирования функциональной активности ERN1, основного сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума. Также определялись уровни экспрессии генов в условиях гипоксии и дефицита глутамина или глюкозы, что позволило определить возможную роль этих генов в контроле пролиферации клеток глиомы, опосредованном ERN1.

Впервые показано, что ингибирование ферментативной активности ERN1 изменяет уровень экспрессии генов некоторых энзимов гликолиза (*GPI*, *ALDOA*, *ALDOC*, *ENO1* и *ENO2*), пентозофосфатного пути (*G6PD*, *PGLS*, *RPIA*, *TKT* и *TALDO1*) и энзимов (*GNPDA1*, *PRPS1*, *PRPS2*, *PRPSAP1* и *PRPSAP2*), связанных с ними метаболическими путями, в клетках глиомы, что указывает на их важную роль в злокачественном росте. Установлено, что обнаруженные изменения в экспрессии исследованных генов обусловлены как эндорибонуклеазной, так и протеинкиназной активностями ERN1. Впервые показано, что ингибирование энзима ERN1 модифицирует эффекты гипоксии и дефицита питательных веществ (глутамина или глюкозы) на экспрессию части исследованных генов.

Полученные результаты свидетельствуют о роли генов энзимов гликолиза, пентозофосфатного шунта и связанных с этими метаболическими путями энзимов в регуляции процессов пролиферации в клетках глиомы при ингибировании функциональной активности ERN1, а также частично раскрывают молекулярные механизмы влияния гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина на ERN1, основной сенсорно-сигнальный энзим ответа клетки на стресс эндоплазматического ретикулума.

Ключевые слова: глиома, экспрессия генов, ERN1, стресс эндоплазматического ретикулума, гликолиз, пентозофосфатный путь, гипоксия, дефицит глюкозы, дефицит глутамина.