

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



КРИВДЮК ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.112.7:616

**ERN1-ЗАЛЕЖНА РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ РОДИН GADD ТА
TNF РЕЦЕПТОРІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2017

Дисертацією є рукопис

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Шевцова Алла Іванівна,
ДЗ “Дніпропетровська медична академія МОЗ України“,
професор кафедри біохімії та медичної хімії

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Телегєєв Геннадій Дмитрович,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
завідувач відділу молекулярної генетики

Захист відбудеться "24" квітня 2017 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: м. Київ, вул. Леонтовича, 9, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Актова зала.

Поштова адреса: 01030, Київ, вул. Леонтовича, 9, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, спеціалізована вчена рада Д 26.240.01

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 "17" березня 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н.



Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розвиток пухлин у більшості випадків являє собою багатоступінчастий процес послідовних змін у декількох, часто багатьох, онкогенах, генах-супресорах або генах мікроРНК. Ці зміни призводять до неконтрольованого росту клітин. Внаслідок високої швидкості проліферації пухлинних клітин, існуюча судинна сітка не спроможна постачати їх киснем і поживними речовинами, тому клітини в пухлинах вимушені існувати за умов ішемії та гіпоксії. Метаболічній адаптації до стресу під час канцерогенезу сприяють внутрішньоклітинні сенсори енергії, поживних речовин і кисню, зокрема, велику роль у цій адаптації відіграє транскрипційний фактор, що індукується за гіпоксії (HIF1).

Багато мутацій, які спостерігаються у пухлинах, також впливають на метаболізм пухлинних клітин [Poliakov E., 2014]. Це призвело до формування теорії, що мережа онкогенів і генів-супресорів контролює метаболічний зсув у пухлинах.

Гіпоксія, нестача поживних речовин, окисний стрес та інші метаболічні порушення, які характерні для пухлинних клітин, є індукторами захисних клітинних механізмів, зокрема, відповіді на незгорнуті протеїни (UPR), що ще називають стресом ендоплазматичного ретикулума (ER) [Sun H., 2016]. Залежно від тривалості і ступеня стресу ER, відповідь на незгорнуті протеїни може сприяти виживанню клітин, активуючи адаптивні та антиапоптотичні шляхи, або ж викликати загибель клітин, активуючи програми клітинної смерті [Chevet E., 2015; Wang M. and Kaufman R.J., 2016].

Для виживання пухлинних клітин надзвичайно важливою є адаптивна гілка стресу ER і це використовують для розробки нових способів протипухлинної терапії. Однак, на даний час існує багато відкритих питань щодо ролі UPR у розвитку пухлин. Зокрема, ще не встановлено який внесок здійснює кожна з гілок стресу ER у злоякісну трансформацію клітин, як різні умови, що індукують стрес ER (наприклад, нестача поживних речовин, гіпоксія, активація онкогенів), впливають на механізми UPR та як відбувається інтеграція UPR з іншими сигнальними шляхами. Відповіді на ці питання представляють великий інтерес, оскільки можуть сприяти створенню новітніх протипухлинних лікарських препаратів, які б зсували відповідь стресу ER у бік апоптозу.

Дослідження експресії генів родин GADD та рецепторів TNF у клітинах гліоми за умов виключення однієї з гілок UPR та за різних умов середовища (гіпоксії та нестачі поживних речовин) є актуальним, оскільки розкриває механізми взаємодії UPR із сигнальними шляхами цих генів-супресорів пухлин та показує вплив факторів зовнішнього оточення на ріст пухлинних клітин. Дослідження змін експресії генів родин GADD та рецепторів TNF у клітинах гліоми за умов пригнічення ензиму ERN1 дозволить з'ясувати їх можливу роль у регуляції проліферації клітин гліоми із залученням сигнальної системи ERN1 і буде сприяти ідентифікації генів-мішеней для розробки нових підходів до лікування гліом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії імені О.В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2013-2016 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи

взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.) та «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом» (№ ДР 0116U001027, 2016-2020 р.р.) та на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України в рамках науково-дослідної теми «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» № ДР 0111U004648 (2011-2015 рр.).

Мета і задачі роботи. Метою дисертаційної роботи було дослідити експресію генів родини GADD, а також генів рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення активності сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1, а також за умов гіпоксії і дефіциту глутаміну або глюкози, для з'ясування ролі цих генів в опосередкованому ERN1 контролі процесу проліферації клітин гліоми.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Дослідити залежність експресії генів родини GADD, а також рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

2. Вивчити залежність регуляції експресії генів рецепторів TNF і протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, а також генів родини GADD, від функціональної активності ендорибонуклеазного домену ERN1.

3. Дослідити вплив гіпоксії на експресію генів родини GADD, а також рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

4. Вивчити вплив дефіциту глюкози на експресію генів родини GADD та рецепторів TNF і залежних від них протеїнів в клітинах гліоми лінії U87 та роль ензиму ERN1 у цій регуляції.

5. Оцінити вплив дефіциту глутаміну на експресію генів рецепторів TNF і протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, а також генів родини GADD, у нормальних клітинах гліоми лінії U87 та клітинах з пригніченою функціональною активністю ензиму ERN1.

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

Предмет дослідження: експресія генів родин GADD та рецепторів TNF, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функціональною активністю сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну.

Методи дослідження: культивування клітин гліоми лінії U87 та її субліній, виділення РНК із культури клітин гліоми, спектрофотометричні методи визначення концентрації РНК та їх спектральних характеристик, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК, оцінки рівня експресії генів за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, клонування продуктів ампліфікації, вестерн-блот аналіз, комп'ютерний аналіз отриманих результатів та методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що експресія генів родин GADD та TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у

передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, причому виявлені зміни в експресії досліджених генів корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин з пригніченою активністю ERN1. Встановлено, що зміни в експресії генів *GADD34*, *GADD45β*, *TNFRSF10D*, *TNFRSF21*, *RYBP* та *TNIP1* у клітинах гліоми за умови пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної активності цього ензиму, генів *SESNI*, *GADD45α* і *BRE* – виключенням ендорибонуклеазної активності ERN1, а генів *GADD153*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF11B* та *FADD* – обох його активностей. Показано також, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* та *FADD* і збільшує рівень експресії генів *TNFRSF10D*, *RYBP*, *TNIP1* та усіх досліджуваних представників родини GADD, за винятком гена *SESNI*. Пригнічення функції ERN1 робить чутливими до гіпоксії гени *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B* та *SESNI*. Крім того, встановлено, що рівень експресії мРНК усіх досліджуваних представників родини GADD збільшується за умови дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. Показано, що за умови дефіциту глюкози експресія усіх досліджуваних представників родини GADD, окрім *SESNI*, підвищується, а більшості рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, знижується у клітинах гліоми з нативним ERN1 (контрольних клітинах). Пригнічення ж ензиму ERN1 модифікує ефект нестачі глюкози на експресію більшості генів. Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі генів родини GADD та TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у процесах проліферації клітин та механізми взаємодії гіпоксії і ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула.

Практичне значення роботи полягає у розшифровці механізмів контролю проліферації клітин гліоми сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 на прикладі генів родин GADD і TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, для виявлення таких генів, які могли би бути мішенями для пригнічення росту злоякісних пухлин. Результати досліджень були включені до програм спецкурсів „Сучасні біотехнології” та „Конструювання генів” ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним дослідженням, яке було сплановано та виконано автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2014-2016 р.р. Дисертантом було самостійно проведено аналіз літературних даних за темою роботи, виконано експериментальні дослідження із вивчення експресії низки генів родини GADD, що відіграють роль у процесах проліферації та апоптозу, за умов повного або часткового пригнічення функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, за гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну у середовищі, а також аналіз та узагальнення отриманих результатів. Дослідження експресії генів родини TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну у середовищі в залежності від функції ERN1,

проводились за участі к.мед.н. Мінченка Д.О., м.н.с. Даніловського С.В., м.н.с. Цимбал Д.О., провідного інженера Бакалець Т.В.; розробка методології експериментальних досліджень, аналіз та обговорення їх результатів – за участі наукового керівника, д.б.н., проф. Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях: 40th FEBS Congress, 15th FEBS Young Scientists' Forum, Berlin, Germany, 2015; Int. Conf. "Chromatin Regulation in Proliferation and Differentiation", Essen, Germany, 2015; XIII Міжнародній науково-практичній конференції молодих науковців „Шевченківська весна 2015: біологія”. Київ, 2015; Наукових конференціях-конкурсах молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, 2013, 2014; XI Українському біохімічному конгресі, Київ, 2014; 2-ій та 3-ій Міжнародних наукових конференціях “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, Дніпропетровськ, 2013, 2015.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 робіт, із них 6 статей, опублікованих у фахових іноземних журналах і наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, та 9 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації: Дисертаційна робота викладена на 156 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», розділу «Результати досліджень», розділу «Обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел (204 найменувань, з них 1 кирилицею та 203 латиницею). Робота містить 67 рисунків, 2 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Досліди проводили на культурах клітин гліоми лінії U87, які були отримані із American Type Culture Collection (США). У цій роботі були використані також дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфікованих вектором pсDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnER1). Для отримання другої сублінії було використано конструкцію на основі вектора pсDNA3.1, що містила кДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrER1). Ця мутація була індукована введенням в структуру каталітичного домена ендорибонуклеази чотирьох нуклеотидних залишків, що змінили рамку зчитування і ініціювали появу передчасного термінуючого трансляцію кодону. Створена таким чином конструкція могла кодувати синтез вкороченого з С-кінця ензиму без ендорибонуклеазної активності [GenBank accession number JQ425696].

Клітини гліоми лінії U87 вирощувалися згідно рекомендацій фірми-виробника у середовищі DMEM з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят, пеніцилін (100 одиниць/мл) та стрептоміцин (0,1 мг/мл) при 37°C в атмосфері з 5% CO₂.

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

Для зворотної транскрипції використовували тотальну РНК, виділену з різних субліній клітин з використанням реагенту Тризол (Invitrogen, США) [Minchenko O. H., 2004]. Концентрацію РНК вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) за довжини хвилі 260 нм. Синтез комплементарної ДНК методом зворотної транскрипції проводили за допомогою набору «QuantiTect Reverse Transcription» (Qiagen, Німеччина) [Minchenko O. H., 2008]. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) реакційну суміш кДНК розводили і брали в реакцію від 1/20 до 1/1000 її частки в залежності від досліджуваного гена. Кількісну ПЛР проводили на апараті „Mx 3000P QPCR” (Stratagene, США) та “7500 HT Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems), використовуючи реакційну суміш Absolute qPCR SYBRGreen Mix (Thermo Fisher Scientific, США) [Auf G., 2013; Ratushna O.O., 2012]. Аналіз отриманих результатів проводили за допомогою комп’ютерної програми „Differential expression calculator”. Дані, отримані з ампліфікатора, є показником інтенсивності флуоресценції на певному циклі реакції, що відповідає рівню накопичення продукту реакції, зв’язаного із флуоресцентним барвником SYBRGreen. Статистичний аналіз проводили у програмі STATISTICA v.7. Результати виражали як $M \pm m$. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною за умови $P < 0,05$. Цитозольні та ядерні екстракти із клітин гліоми виділяли як описано Armstead V. [1997], розділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі і використовували для імуноблотингу з антитілами до GADD45a та HIF-1 α [Minchenko O. H., 2008].

Інтенсивність проліферації клітин гліоми оцінювали шляхом трикратного підрахунку клітин після 2 діб росту за допомогою лічильника клітин (Coultronics, Франція). Кількість апоптотичних клітин визначали за допомогою протокової цитометрії шляхом інкубації клітин з аннексином V-FITC і пропідій йодидом протягом 10 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи “Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit” (Sigma-Aldrich, США).

Результати досліджень та їх обговорення

Вплив пригнічення функціональної активності ERN1 на проліферацію та загибель клітин гліоми лінії U87. Нами було показано, що пригнічення функціональної активності ERN1 зменшує проліферацію клітин гліоми лінії U87 у 2 рази, а гіпоксія збільшує швидкість проліферації контрольних клітин гліоми (+21 %) і не проявляє своєї дії у клітинах з пригніченою активністю сигнального ензиму ERN1 (рис. 1А). Було також показано, що пригнічення активності ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 збільшує кількість апоптотичних клітин за нормоксії (у 1,45 рази) і що гіпоксія істотно не впливала на життєздатність клітин незалежно від функціональної активності ERN1 (рис. 1Б).

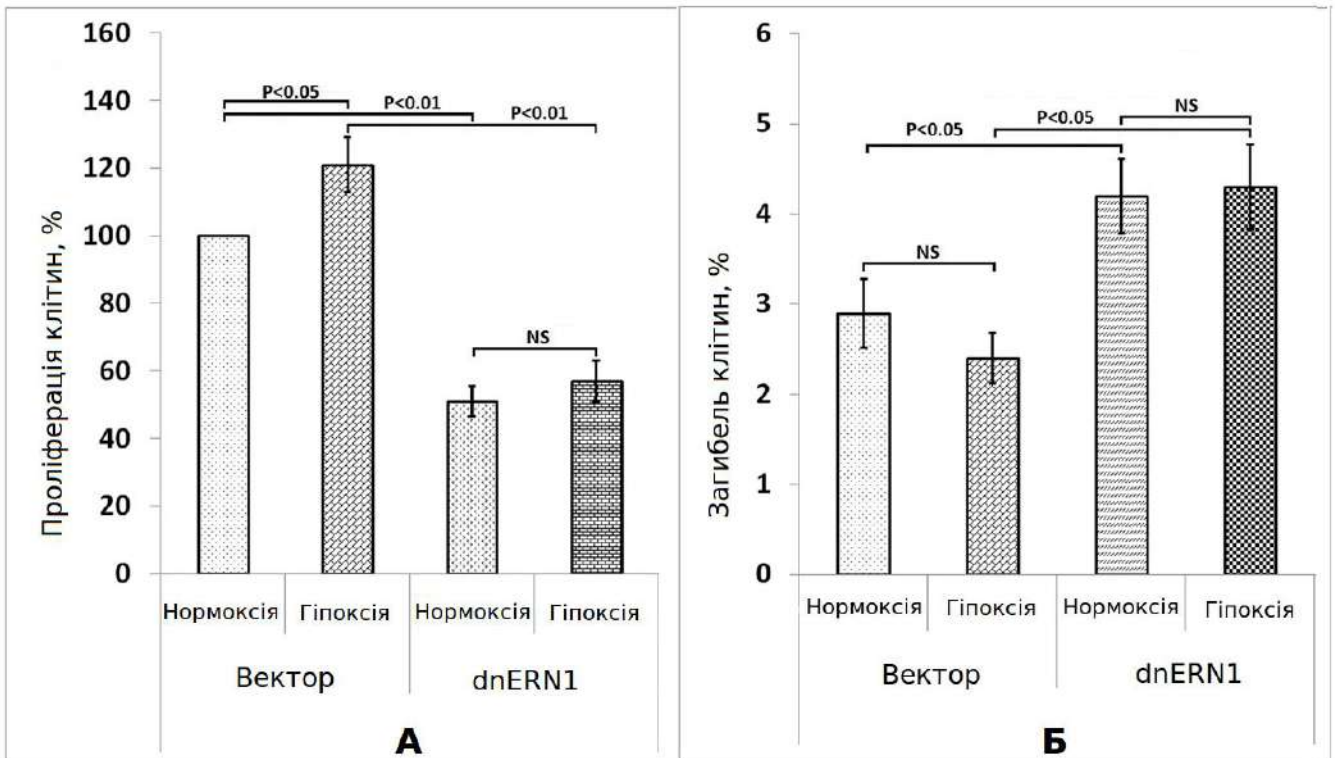


Рис. 1. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 год.) на проліферацію (А) та загибель клітин (В) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором pcDNA3.1 (Вектор), а також стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1). Тут і далі експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β-актину і виражали у відсотках від контролю (нормоксія, вектор; 100%); n = 7.

Експресія GADD генів у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1. Відомо, що фактори GADD є поліфункціональними протеїнами, що відіграють важливу роль у регуляції багатьох процесів, в тому числі в регуляції росту злоякісних пухлин як високоактивні регулятори смерті клітин [Garrido J.L., 2009].

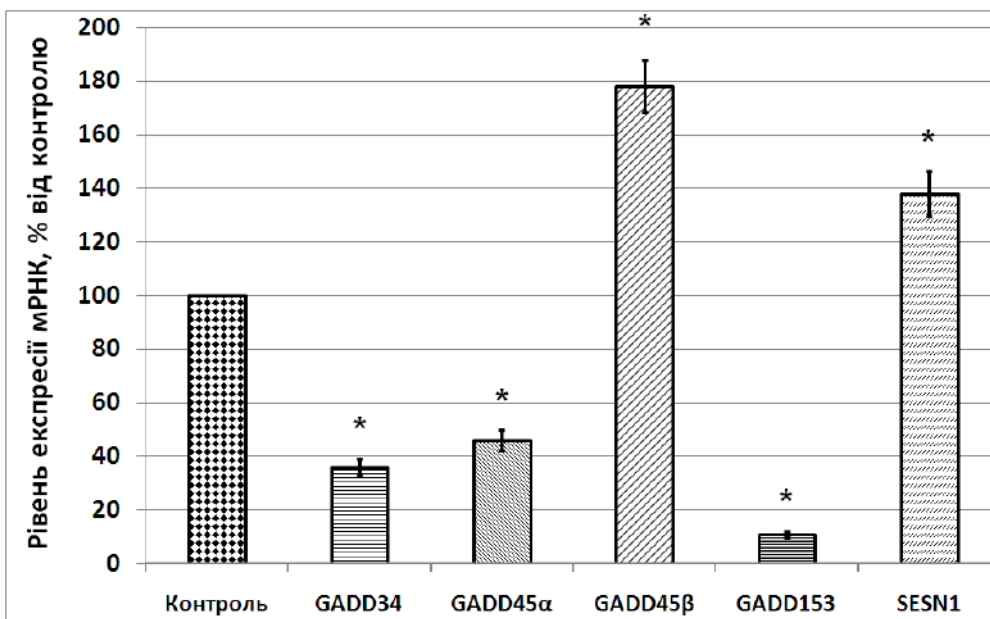


Рис. 2. Рівень експресії мРНК GADD генів у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором pcDNA3.1 (Контроль) та домінант-негативною ERN1 (dnERN1) за даними кількісної ПЛР. n = 4; * – P < 0,05 у порівнянні з контролем.



Рис. 3. Блотограма протеїну GADD45α у цитозольній фракції клітин гліоми лінії U87 (1) та її сублінії з пригніченою функціональною активністю ензиму ERN1 (2).

Не зважаючи на те, що GADD протеїни задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу як пухлинні супресори, рівень їх експресії може бути різним у злоякісних пухлинах [Michaelis K.A., 2011]. Це узгоджується з отриманими нами даними про зміни в експресії генів *GADD34*, *GADD45α*, *GADD45β*, *GADD153* та *SESNI* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 сигнального шляху стресу ER. Із даних, представлених на рис. 2, видно, що рівень експресії генів *GADD45β* та *SESNI* підвищувався, а генів *GADD34*, *GADD45α* та *GADD153* – знижувався. Для *GADD45α* було також показано, що пригнічення ERN1 у клітинах гліоми знижує і рівень протеїну (рис. 3).

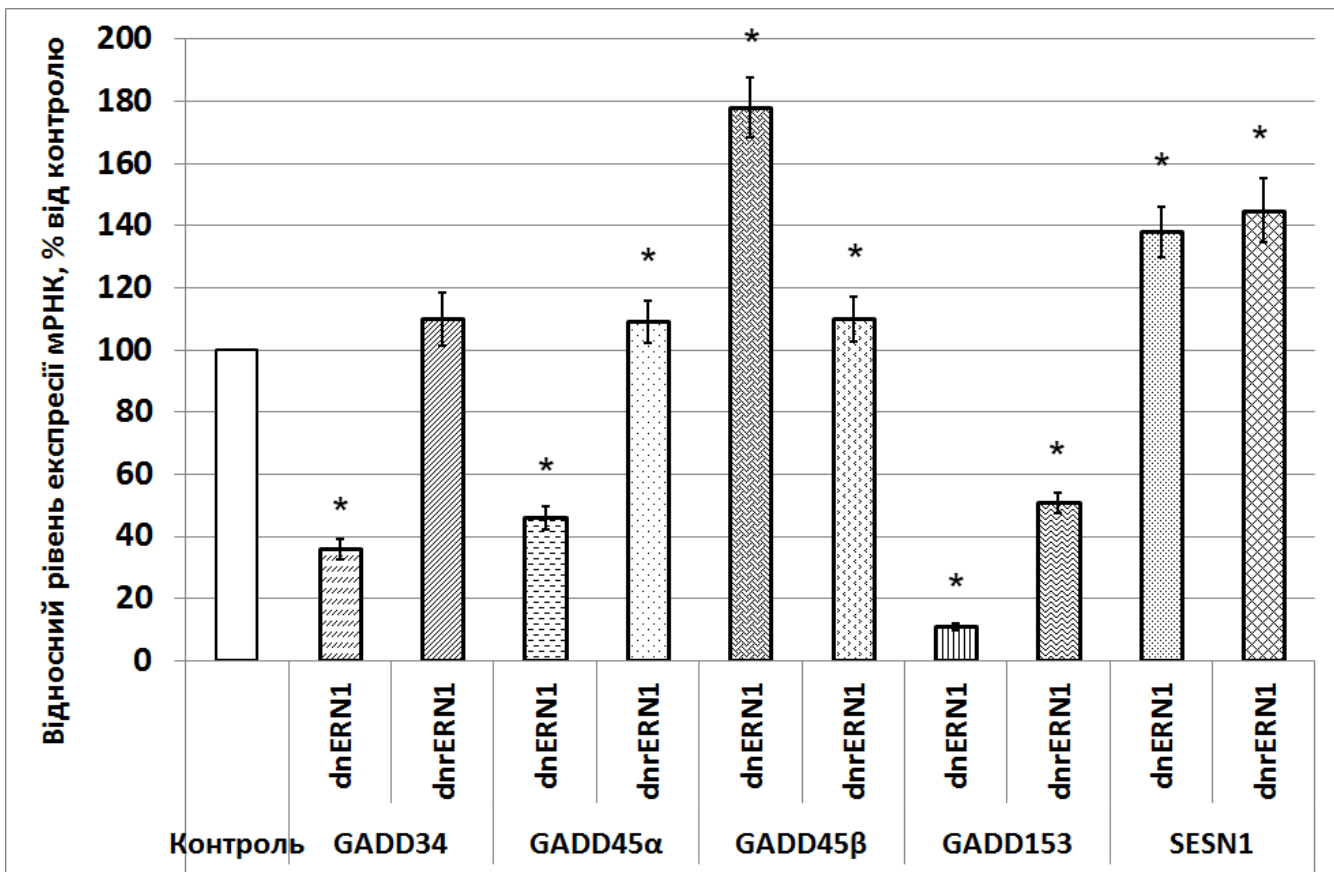


Рис. 4. Рівень експресії мРНК GADD генів у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 з пригніченими обома активностями цього ензиму (dnERN1) та з пригніченою лише ендорибонуклеазною його активністю (dnrERN1) за даними кількісної ПЛР у реальному часі. n = 4; * – P < 0,05 у порівнянні з контролем.

Можна припустити, що підвищення рівня експресії генів *GADD45β* та *SESNI* у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 призводить до пригнічення проліферації клітин та росту пухлин із цих клітин, що було встановлено раніше в дослідженнях проф. М. Moenner [Drogat B., 2007; Auf G., 2010] і, можливо, вносить свій вклад у цей процес, оскільки ці фактори є ключовими у регуляції процесів проліферації та апоптозу [Wang L., 2012]. В той же час, для з'ясування функціонального значення зниження експресії решти GADD генів у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 потрібні подальші поглиблені дослідження.

Оскільки ERN1 має кіназну та ендорибонуклеазну активності, то важливим було дослідити за рахунок якої саме ензиматичної активності обумовлені зміни в експресії генів родини GADD. Аналіз отриманих результатів продемонстрував, що зміни в експресії генів *GADD34* та *GADD45β* обумовлені пригніченням кіназної активності ензиму ERN1, а в експресії *GADD45α* та *SESNI* – пригніченням ендорибонуклеази (рис. 4). У той же час, зміни в експресія гена *GADD153* обумовлені пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1.

Вплив гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну на експресію GADD генів у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1. Ефективність гіпоксії оцінювали по рівню транскрипційного фактора HIF-1α. Як показано на рис. 5, гіпоксія значно підвищує рівень цього протеїну як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченим ERN1.

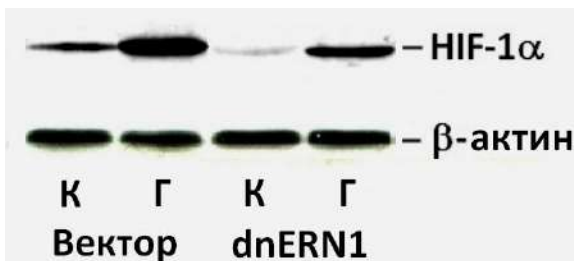


Рис. 5. Блотограма транскрипційного фактора HIF1α у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором, (Вектор) та у клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1) за нормоксії (К) та гіпоксії (Г).

Результати досліджень впливу гіпоксії, нестачі глюкози та глутаміну на експресію генів родини GADD у клітинах гліоми за умов інгібування функціональної активності ERN1 представлені у таблиці 1, а сигнальні шляхи, у які залучені протеїни родини GADD, схематично зображено на рис. 6.

У даній роботі було показано, що гіпоксія значно впливає на рівні експресії більшості з досліджуваних генів родини GADD в клітинах гліоми лінії U87 і що інгібування сигнального ензиму ERN1 змінює вплив гіпоксії на рівень експресії цих генів гено-специфічно (таблиця 1). Це було продемонстровано раніше і для багатьох інших генів [Minchenko D.O., 2015; Minchenko O.H., 2015]. Гіпоксія є потужним індуктором експресії більшості генів родини GADD: підвищує рівень експресії генів *GADD34*, *GADD45α*, *GADD45β* та *GADD153*, окрім *SESNI* (таблиця 1). Отримані результати узгоджуються з даними літератури [Tamura R.E., 2012; Salvador J.M., 2013].

Пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 посилює вплив гіпоксії на експресію генів *GADD34*, *GADD45α* та *GADD153*, дещо знижує її вплив на експресію *GADD45β* та індукує чутливість до умов гіпоксії експресії гена *SESNI*. Таким чином, виключення функціональної активності ERN1 посилює чутливість до гіпоксії експресії більшості генів родини GADD і це може сприяти пригніченню проліферації клітин та активувати процес їх загибелі.

Таблиця 1.

Зміни рівня експресії генів *GADD* при гіпоксії, нестачі глюкози та глутаміну у контрольних клітинах гліоми (з нативним ERN1) та у клітинах з пригніченою активністю ERN1 (dnERN1) порівняно з відповідними контролями.

Умови досліджу Гени	Гіпоксія порівняно з контролем	Гіпоксія порівняно з контролем у клітинах з dnERN1	Нестача глюкози порівняно з контролем	Нестача глюкози порівняно з контролем у клітинах з dnERN1	Нестача глутаміну порівняно з контролем	Нестача глутаміну порівняно з контролем у клітинах з dnERN1
<i>GADD34</i>	↑ (278%)	↑ (338%)	↑ (194%)	↑ (963%)	↑ (167%)	↑ (447%)
<i>GADD45α</i>	↑ (26%)	↑ (89%)	↑ (43%)	↑ (244%)	↑ (85%)	↑ (258%)
<i>GADD45β</i>	↑ (233%)	↑ (44%)	↑ (26%)	↑ (86%)	↑ (20%)	↑ (34%)
<i>GADD153</i>	↑ (91%)	↑ (236%)	↑ (205%)	↑ (2991%)	↑ (66%)	↑ (800%)
<i>SESNI</i>	—	↑ (30%)	—	↓ (29%)	↑ (18%)	↑ (40%)

Примітки: (↓) - рівень експресії знижується; (↑) - рівень експресії підвищується; (-) - рівень експресії не змінюється.

Результати проведених нами досліджень також продемонстрували, що експресії генів родини GADD є чутливими до дефіциту глюкози у середовищі, що узгоджується з їх функцією сенсорів стресових станів, у тому числі і нестачі поживних речовин. А також із даними Tamura R.E. [2012]. Блокування сигнального ензиму ERN1 виражено посилює ефект дефіциту глюкози на експресію цих генів, сприяючи здійсненню їх функцій – пригніченню росту клітин, яке й спостерігається за умов інгібування ERN1. Разом з тим, експресія гена *SESNI* була резистентною до дефіциту глюкози, хоча експресія деяких інших сестринів підвищується за дефіциту глюкози [Ding B., 2016].

Подібні результати було отримано за умов дефіциту у середовищі глутаміну. У цих експериментах було виявлено підвищення експресії генів родини GADD, що деякою мірою узгоджується із функціями протеїнів, що ними кодуються, а також даними літератури [Abcouwer S.F., 1999]. Пригнічення ж ензиму ERN1 призводить до ще більшого підвищення експресії усіх досліджуваних генів *GADD*, що корелює з пригніченням росту клітин без функціональної активності ERN1.

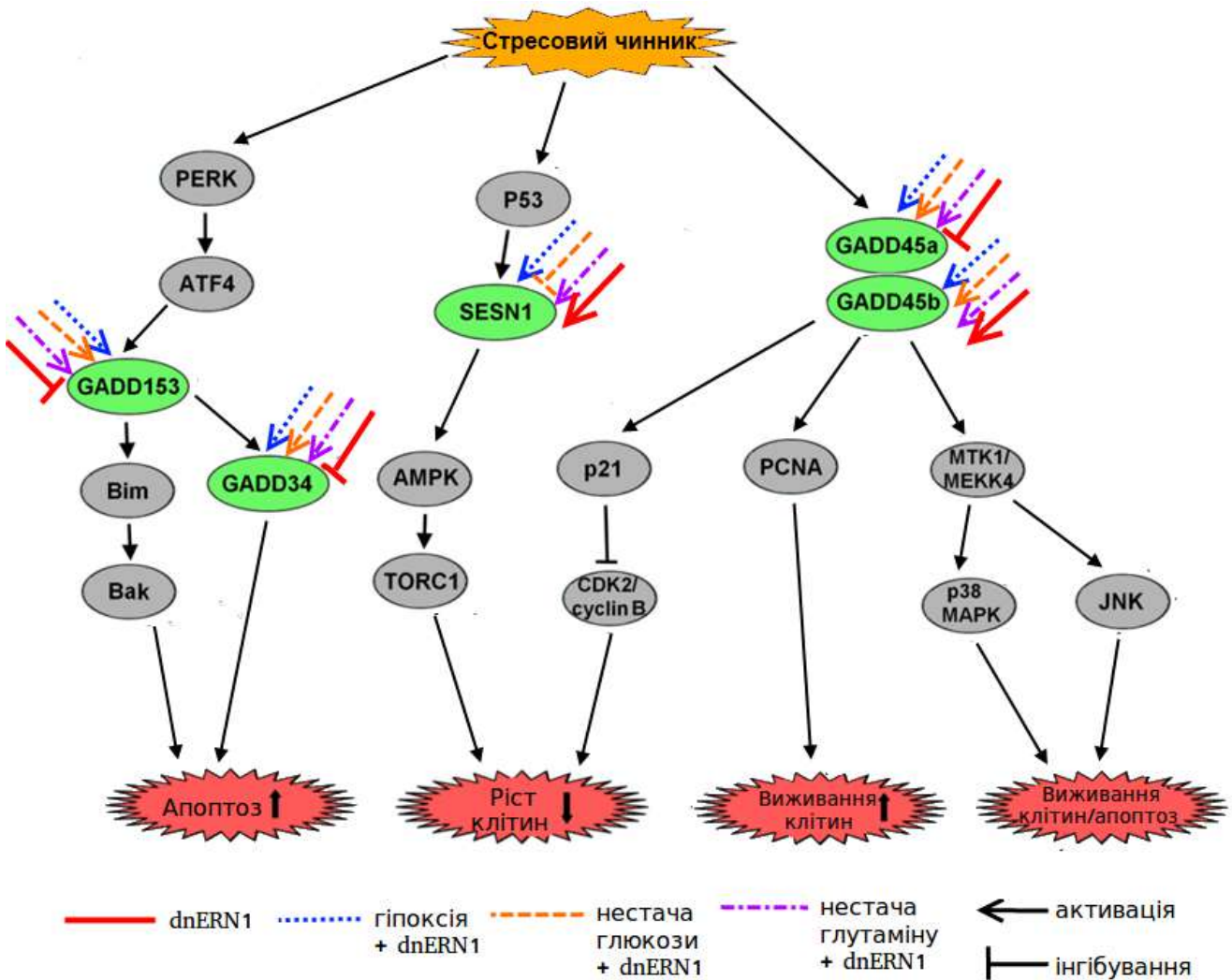


Рис. 6. Схематичне зображення впливу гіпоксії, нестачі глюкози та глутаміну на сигнальні шляхи, у які залучені досліджувані представники родини GADD за умов пригнічення ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, із урахуванням даних літератури [Liebermann D.A, 2008].

Експресія генів рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1. Результати наших досліджень продемонстрували, що виключення обох ензиматичних активностей ензиму ERN1 призводить до значного підвищення експресії гена DR6 (рис. 7). Можливо, такі зміни в експресії цього рецептора смерті залучені до прояви протипухлинного ефекту, що спостерігається за пригнічення функціональної активності ензиму ERN1.

Інший рецептор смерті, TNFRSF10B (DR5), зв'язується з TRAIL лігандом, і здатен ініціювати зовнішній шлях апоптозу, що характеризується залученням доменів смерті, формуванням сигнального комплексу, що індукує смерть (DISC), активацією каспаз і, в кінцевому рахунку, загибеллю клітини. У цьому дослідженні ми показали, що експресія гена *TNFRSF10B* знижується за умови пригнічення ензиму ERN1, а зміни рівня експресії *TNFRSF10B*, як ініціатора апоптозу, не корелюють зі зниженням проліферації клітин, трансфікованих конструкцією з dnERN1. Цілком можливо, що TNFRSF10B відповідальний лише за апоптоз,

опосередкований стресом ER, а тому інгібування ERN1-сигнального шляху викликає зниження експресії цього гена. Це узгоджується із даними літератури про те, що протеїни GADD153/DDIT3 і KAT2A підвищують рівень експресії гена *TNFRSF10B* для апоптозу, опосередкованого стресом ER, у клітинах раку легенів людини [Li T., 2015].

Проведеними дослідженнями виявлено значне підвищення експресії гена *TNFRSF10D* в клітинах гліоми після інгібування ERN1 (рис. 7). Протеїн TNFRSF10D не має проапоптичного домену смерті і не здатен індукувати апоптоз. Підвищення експресії його гена в клітинах гліоми U87 при інгібуванні ERN1 асоціюється зі зниженням експресії гена *TNFRSF10B*. Відомо, що зниження експресії гена *TNFRSF10D* пов'язане з меланомогенезом [Ratzinger G., 2014; Venza M., 2013], що свідчить про можливий зв'язок *TNFRSF10D* і *TNFRSF10B* з регуляцією апоптозу, опосередкованого стресом ER. Проведеними дослідженнями було також показано, що за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1 підвищується рівень експресії і іншого рецептора TNF, *TNFRSF11B*, який не здатен індукувати апоптоз (рис. 7).

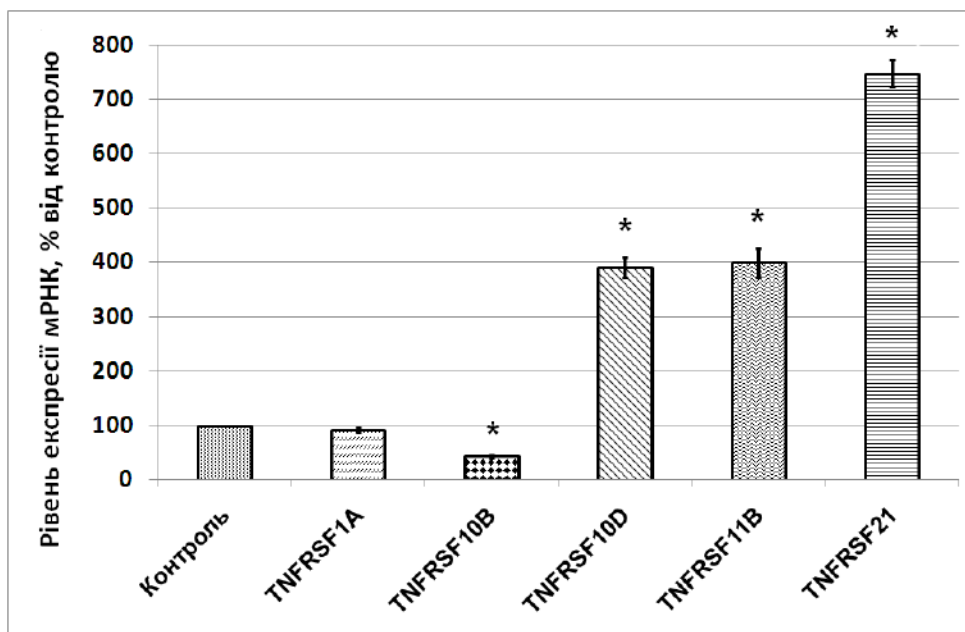


Рис. 7. Рівень експресії мРНК TNFRSF генів у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором pCDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфікованих домінант-негативною ERN1 (dnER1) за даними кількісної ПЛР. n = 4; * – P < 0,05 у порівнянні з контролем.

У той же час, рівень експресії гена адапторного протеїну FADD, залученого до передачі сигналів від рецепторів TNF, а також гена TNIP1, який пригнічує TNF-індуковану NF-κB-залежну експресію генів, знижується за умов інгібування ERN1 (рис. 8), що в деякій мірі узгоджується зі змінами в експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF10D* та *TNFRSF10B* за цих умов, але для розуміння функціонального значення цих змін однак не може пояснити пригнічення росту клітин за умов інгібування ERN1 необхідні подальші дослідження.

Як видно із даних, представлених на рис. 8, пригнічення функціональної активності ERN1 підвищує рівень експресії генів *BRE* та *RYBP*, які кодують поліфункціональні протеїни, що впливають на TNFR-опосередкований апоптоз і таким чином можуть контролювати ріст злоякісних пухлин через сигнальний шлях стресу ER ERN1.

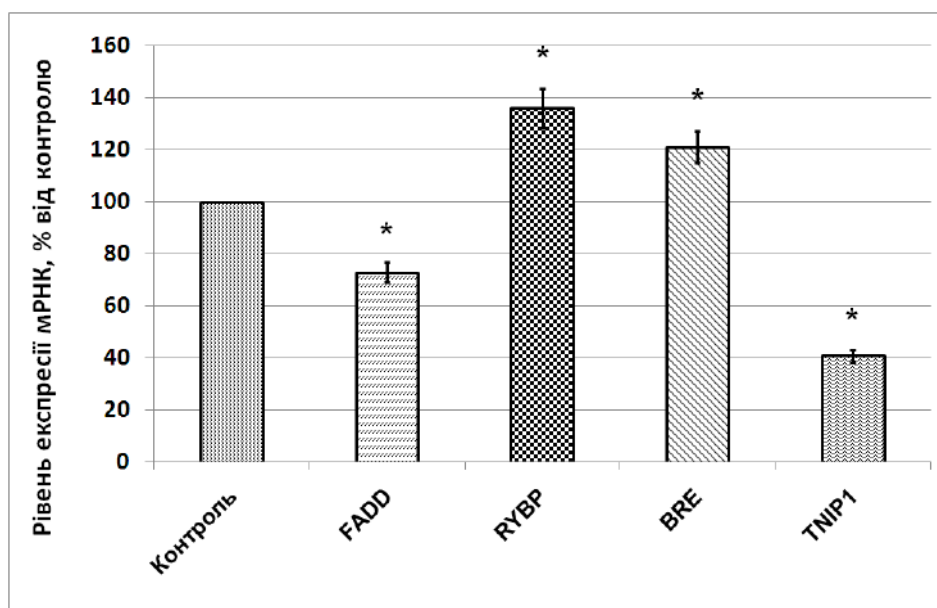


Рис. 8. Рівень експресії мРНК генів, залучених у передачу сигналів від рецепторів TNF у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором рсDNA3.1 (Контроль), та домінант-негативною конструкцією ERN1 (dnER1) за даними кількісної ПЛР. $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

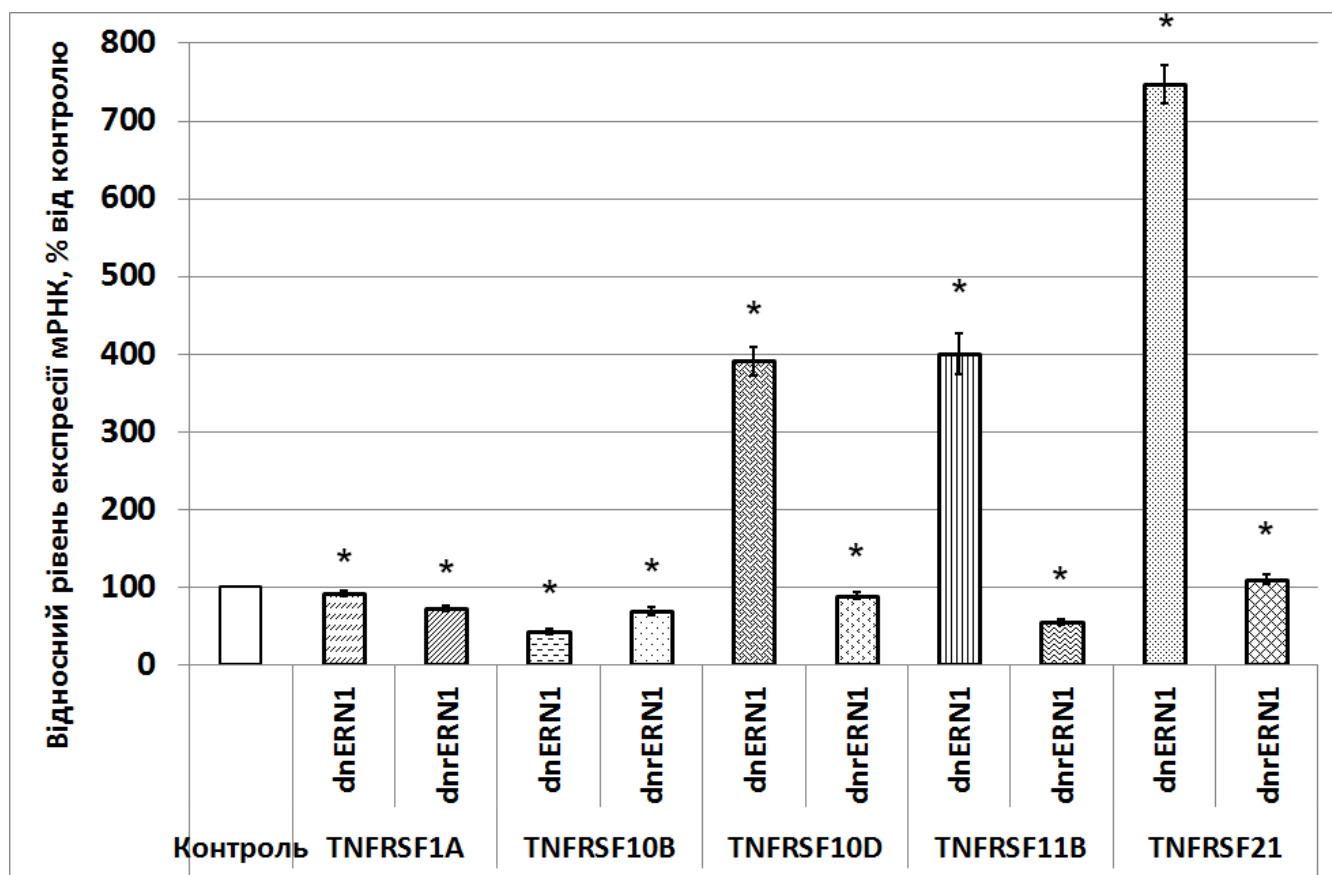


Рис. 9. Рівень експресії мРНК генів рецепторів TNF у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором рсDNA3.1 (Контроль) та домінант-негативними конструкціями ензиму ERN1 з пригніченими обома активностями цього ензиму (dnER1) або лише ендорибонуклеазною його активністю (dnrER1) за даними кількісної ПЛР. $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Більше того, в дослідях на клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ензиму ERN1 (рис. 9) було показано, що зміни в експресії досліджених нами генів родини рецепторів TNF і асоційованих з ними протеїнів обумовлені як

ендорибонуклеазною активністю ERN1 (ген *BRE*), так і кіназною його активністю (гени *TNFRSF10D*, *TNFRSF21*, *RYBP* та *TNIP1*), або ж обома його активностями (гени *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF11B* і *FADD*).

Вплив гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну на експресію генів рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1. Результати досліджень впливу дефіциту глюкози та глутаміну на експресію генів рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми з пригніченою функцією ERN1 представлені у таблиці 2.

Таблиця 2.

Зміни рівня експресії генів *GADD* при гіпоксії, нестачі глюкози та глутаміну у контрольних клітинах гліоми (з нативним ERN1) та у клітинах з пригніченою активністю ERN1 (dnER1) порівняно з відповідними контролями.

Умови досліджу Гени	Гіпоксія порівняно з контролем	Гіпоксія порівняно з контролем у клітинах з dnER1	Нестача глюкози порівняно з контролем	Нестача глюкози порівняно з контролем у клітинах з dnER1	Нестача глутаміну порівняно з контролем	Нестача глутаміну порівняно з контролем у клітинах з dnER1
<i>TNFRSF1</i> / <i>TNFR1</i>	—	↑ (47%)	↓ (19%)	↑ (35%)	—	↑ (130%)
<i>TNFRSF10B</i> / <i>DR5</i>	—	↑ (40%)	↑ (13%)	↑ (105%)	↑ (106%)	↑ (170%)
<i>TNFRSF10D</i> / <i>TRAIL-R4</i>	↑ (41%)	↑ (47%)	↓ (32%)	—	↑ (29%)	↑ (38%)
<i>TNFRSF11B</i>	↓ (19%)	↓ (58%)	↓ (38%)	↓ (81%)	↑ (11%)	↑ (35%)
<i>TNFRSF21</i> / <i>DR6</i>	↓ (88%)	↓ (46%)	—	↓ (62%)	↓ (32%)	↓ (29%)
<i>FADD</i>	↓ (55%)	↓ (29%)	↓ (14%)	—	—	—
<i>RYBP</i>	↑ (141%)	↑ (112%)	—	↑ (64%)	↑ (24%)	↑ (41%)
<i>BRE</i>	—	—	↑ (18%)	—	↓ (17%)	—
<i>TNIP1</i>	↑ (16%)	↑ (37%)	↓ (17%)	↓ (22%)	↓ (9%)	↓ (22%)

Примітки: (↓) – рівень експресії генів знижується; (↑) – рівень експресії генів підвищується; (-) – рівень експресії генів не змінюється.

Показано, що гіпоксія істотно не змінювала рівень експресії генів *TNFRSF1A* та *TNFRSF10B* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення активності ERN1 індукувало чутливість генів цих рецепторів TNF до гіпоксії: рівень їх експресії підвищувався на 47 та 40 %, відповідно (таблиця 2). У той же час, рівень експресії

гена *TNFRSF10B* підвищується в обох типах досліджуваних клітин незалежно від функціональної активності ERN1.

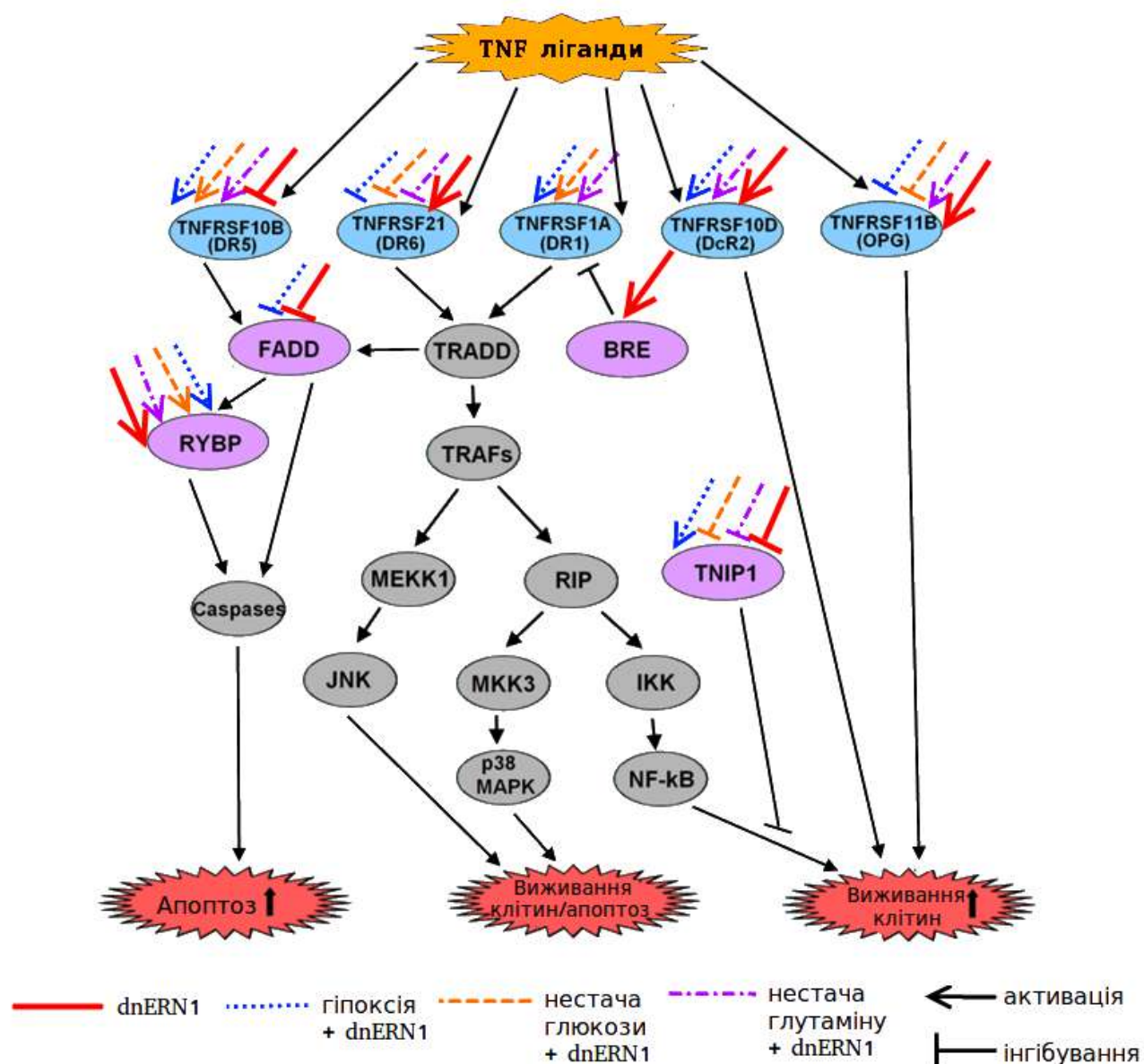


Рис. 10. Схематичне зображення впливу гіпоксії, нестачі глюкози та глутаміну на сигнальні шляхи, у які залучені досліджені рецептори TNF та протеїни, що приймають участь у передачі сигналів від них, за умов пригнічення ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, із урахуванням даних літератури [Faustman D., 2010; Inoue M., 2015].

Дослідження впливу гіпоксії на рівень експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* та *FADD* виявило суттєве зниження їх експресії в обох типах клітин, але пригнічення функції ERN1 виражено посилювало дію гіпоксії на експресію гена *TNFRSF11B* і послаблювало – генів *TNFRSF21* та *FADD* (таблиця 2). Показано, що гіпоксія підвищує рівень експресії генів *RYBP* та *TNIP1* також в обох типах клітин, (таблиця 2), причому пригнічення функції ERN1 виражено посилювало дію гіпоксії на експресію гена *TNIP1*.

Таким чином, гіпоксія впливає на експресію більшості досліджених генів гено-специфічно, причому їх експресія за умов гіпоксії залежить від активності ERN1, а виявлені нами зміни в експресії генів *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF11B* та *TNIP1* можуть сприяти протипухлинному ефекту пригнічення функції ензиму ERN1 у клітинах гліоми.

Вплив гіпоксії та нестачі глутаміну і глюкози на сигнальні шляхи, у яких залучені гени рецепторів TNF та асоційованих з ними протеїнів, за умов інгібування функціональної активності ERN1 схематично зображено на рис. 10.

Проведеними дослідженнями також встановлено, що за умов дефіциту глюкози спостерігається зниження експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF10D*, *FADD* та *TNIP1* і підвищення рівня експресії генів *TNFRSF10B* та *BRE* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення функціональної активності ERN1 модифікувало ефект дефіциту глюкози на експресію генів *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B* і *TNFRSF11B* та зробило експресію генів *TNFRSF10D*, *BRE* та *FADD* резистентною до умов дефіциту глюкози (таблиця 2). Водночас, експресія генів *TNFRSF21* та *RYBP* була резистентною до умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 індукувало чутливість експресії генів *TNFRSF21* і *RYBP* до цих умов. Більше того, зміни в експресії генів *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D* та *TNFRSF11B*, що індукуються за умов дефіциту глюкози, мали протилежну спрямованість до тих, що спостерігаються за умов пригнічення ERN1 (таблиця 2).

Показано, що за дефіциту глутаміну експресія генів *TNFRSF10B*, *TNFRSF10D*, *TNFRSF11B* та *RYBP* посилюється, а рівень експресії *TNFRSF21*, *BRE* і *TNIP1* знижується у контрольних клітинах гліоми (таблиця 2). Пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 посилює ефект дефіциту глутаміну на експресію генів *TNFRSF10D*, *TNFRSF11B*, *RYBP* та *TNIP1*, робить чутливим до гіпоксії експресію гена *TNFRSF1A* та резистентним до неї – експресію гена *BRE*.

Таким чином, експресія більшості досліджених генів рецепторів TNF та асоційованих з ними протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 змінюється за умов дефіциту глюкози та глутаміну гено-специфічно і залежить від функціональної активності ERN1. Виявлені нами зміни в експресії досліджених генів здебільшого можуть сприяти протипухлинному ефекту пригнічення функції ензиму ERN1 у клітинах гліоми, але детальні молекулярні механізми цих процесів заслуговують на подальше вивчення.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені нові дані щодо механізмів зниження проліферації клітин гліоми за умов інгібування функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1, зокрема виявлено зміни в експресії генів родин GADD та TNF рецепторів за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1, а також залежність змін в експресії окремих генів цієї системи від гіпоксії та умов дефіциту глюкози або глутаміну.

1. Показано, що експресія генів родин GADD та TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87

залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, причому виявлені зміни в експресії досліджених генів узгоджуються зі зменшенням інтенсивності проліферації цих клітин за умов пригнічення активності ERN1.

2. Встановлено, що зміни рівня експресії генів *GADD34*, *GADD45β*, *TNFRSF10D*, *TNFRSF21*, *RYBP* та *TNIP1* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної його активності, генів *SESN1*, *GADD45α* і *BRE* – виключенням ендорибонуклеазної активності ERN1, а генів *GADD153*, *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF11B* та *FADD* – обох його активностей.

3. Показано, що гіпоксія призводить до зниження рівня експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* та *FADD* і збільшення рівня *TNFRSF10D*, *RYBP*, *TNIP1* і генів усіх досліджуваних представників родини GADD, за винятком гена *SESN1*, а пригнічення функціональної активності ERN1 переважно модифікує ефекти гіпоксії на рівень їх експресії, що має значення для відбору генів-мішеней.

4. Встановлено, що рівень експресії мРНК усіх досліджених представників родини GADD збільшується за умови дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. В той же час, експресія TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, гено-специфічно змінюється за дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності ERN1.

5. Показано, що за умов дефіциту глюкози експресія більшості досліджених генів родини GADD підвищується, а рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, знижується у контрольних клітинах гліоми і що пригнічення функціональної активності ERN1 змінює чутливість експресії більшості досліджених генів до нестачі глюкози, а це важливо для зменшення резистентності до хіміотерапії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. О.Н. Minchenko. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells / О.Н. Minchenko, **I.V. Kryvdiuk**, О.О. Riabovol, D.O. Minchenko, S.V. Danilovskyi, О.О. Ratushna // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, N 2. – P. 25-34. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів GADD34, GADD45α, GADD45β та GADD153 у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

2. Minchenko О.Н. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of TNFα-induced protein and TNF receptor superfamily genes and modifies its hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko О.Н., **Kryvdiuk I.V.**, Minchenko D.O., Riabovol O.O., Halkin O.V. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3, № 1. – P. 1-15. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів TNFRSF10D, TNFRSF21, TNFRSF11B, TNFRSF10B та TNFRSF1A методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

3. **Kryvdiuk I.V.** Inhibition of IRE1 signaling modifies effect of glucose deprivation on the expression of TNF α -induced protein and TNF receptor superfamily genes in U87 glioma cells / Kryvdiuk I.V., Minchenko D.O., Hlushchak N.A., Ratushna O.O., Karbovskiy L.L., Minchenko O.H. // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, № 6. – P. 36-51. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів TNFRSF10D, TNFRSF21, TNFRSF11B та TNFRSF10B у клітинах гліоми з пригніченим ERN1, опрацьовано відповідну літературу та підготовлено матеріали до друку).*

4. **Кривдюк І.** Експресія мРНК GADD34 та GADD45 у клітинах гліоми лінії U87: вплив блокади сигнального ензиму ERN1 та дефіциту глюкози / Кривдюк І., Бакалець Т., Рябовол О., Мінченко Д. // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. – 2014. – Т. 66, № 1. – С. 28-32. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів GADD34, GADD45 α та GADD45 β у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози та Вестерн-блот аналіз протеїну GADD45 α . Підготовлено матеріали до друку).*

5. Minchenko O.H. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells / Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., **Kryvdiuk I.V.**, Bakalets T.V., Lypova N.M., Karbovsky L.L., Minchenko O.H. // Endoplasmic reticulum stress in diseases. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 18-26. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів RYBP та SESN1 у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1 за умов гіпоксії та підготовлено матеріали до друку).*

6. Minchenko D.O. Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells / Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., **Kryvdiuk I.V.**, Hlushchak N.A., Kovalevska O.V., Karbovskiy L.L., Minchenko O.H. // Fiziol. Zh. – 2014. – Vol. 60, № 4. – P. 11-21. *(Здобувачем особисто проведено дослідження експресії генів RYBP та SESN1 у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ERN1 за нестачі глутаміну та підготовлено матеріали до друку).*

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

8. Мінченко О.Г. Стрес ендоплазматичного ретикулума, його сенсорно-сигнальні системи та роль у регуляції експресії генів за злоякісного росту і гіпоксії / Мінченко О.Г., Харькова А.П., Бакалець Т.В., **Кривдюк І.В.** // Укр. біохім ж. – 2013. – Т. 85, № 5. – С. 5-16. *(Здобувачем особисто опрацьовано відповідну літературу та підготовлено частину матеріалів до друку).*

9. Danilovskyi S.V. Tp53 and tp53-related gene expressions in glioma U87 cells with IRE-1 loss of function: effect of glutamine or glucose deprivation / Danilovskyi S.V., Minchenko D.O., Yavorskyi V.V., Minchenko O.H., **Kryvdiuk I.V.** // 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, 23-24 May 2013: матер. конф. – Lviv, Ukraine. – 2013. – P. 29.

10. Даніловський С. В. Експресія гену TP53 та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 із пригніченою функцією ензиму ERN1 / С.В. Даніловський, Д.О. Мінченко, **І.В. Кривдюк**, О.Г. Мінченко // Наукова

конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2013», Київ, 6-7 червня 2013 р. Укр. біохім. журн. – 2013. – Т. 85, №4. – С. 137.

11. О.Г. Мінченко. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в нормі та за патологічних станів / О.Г. Мінченко, **І.В. Кривдюк**, А.П. Харькова, Ю.М. Башта, Т.В. Бакалець, Д.О. Мінченко // 2-га Міжнародна наукова конференція „Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 24-25 вересня 2013 р.: матер. конфер. – Дніпропетровськ, Україна. – 2013. – С. 43.

12. **Кривдюк І.В.** Пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 змінює рівень експресії р53-залежних генів у клітинах гліоми / Кривдюк І.В., Мінченко Д.О., Даніловський С.В., Мінченко О.Г. // Наукова конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», Київ, 29-30 травня 2014 р. Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86, №4. – С. 204.

13. **Кривдюк І.В.** Експресія генів PPP1R15A, GADD45B, DDIT1 та DDIT3 у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1 за умов гіпоксії / Кривдюк І.В., Даніловський С.В., Мінченко Д.О. // XI Український біохімічний конгрес, Київ, 06-10 жовтня 2014 р. Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86, № 5 (Додаток 1). – С. 167-168.

14. **Кривдюк І.В.** Експресія TP53-залежних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умови дефіциту глюкози / Кривдюк І.В., Даніловський С.В., Мінченко Д.О. // XIII Міжнародна науково-практична конференція молодих науковців „Шевченківська весна 2015: біологія”, 1-3 квітня 2015 р.: матер. конфер. – Київ, Україна. – 2015. – С. 56.

15. **Kryvdiuk I.V.** Inhibition of ERN1 signaling of endoplasmic reticulum stress affects the expression of TNF receptor genes in U87 glioma cells / Kryvdiuk I.V., Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Minchenko O.H. // FEBS Journal Special Issue: 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis of Life, Berlin, Germany, July 4-9, 2015. – V. 282, Supp. S1. – P. 88.

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

17. С.В. Даніловський. Експресія гена TP53 та його інгібіторів в умовах пригнічення ERN1 та гіпоксії в клітинах гліоми лінії U87 / С.В. Даніловський, **І.В. Кривдюк**, Д.О. Мінченко // Наукова конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 26-27 травня 2016 р. – Укр. біохім. журн. – 2016. – Т. 88, № 4. – С. 64.

АНОТАЦІЯ

Кривдюк І.В. ERN1-залежна регуляція експресії генів родин GADD та TNF рецепторів у клітинах гліоми. – Рукопис.

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

Дисертаційна робота присвячена дослідженню експресії генів представників родини GADD, а також рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну, для виявлення можливої ролі цих генів в опосередкованому ERN1 контролі процесу росту та проліферації клітин гліоми.

Вперше було показано, що експресія генів родин GADD та TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, причому виявлені зміни в експресії досліджених генів корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин з пригніченою активністю ERN1.

Встановлено також, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* та *FADD* і збільшує рівень *TNFRSF10D*, *RYBP*, *TNIP1* та генів усіх досліджуваних представників родини GADD, за винятком гена *SESN1*. Пригнічення функції ERN1 робить чутливими до гіпоксії гени *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B* і *SESN1*. Крім того, показано, що рівень експресії мРНК усіх досліджуваних представників родини GADD збільшується за умови дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. Встановлено, що за умови дефіциту глюкози експресія усіх досліджуваних представників родини GADD, окрім *SESN1*, підвищується, а більшості рецепторів TNF та протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, знижується у контрольних клітинах гліоми. Пригнічення ж ензиму ERN1 змінює чутливість експресії більшості генів до нестачі глюкози.

Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі генів родини GADD та TNF рецепторів, а також протеїнів, залучених у передачу сигналів від них, у процесах проліферації клітин та механізми взаємодії гіпоксії і ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ER.

Ключові слова: експресія генів, гліома, стрес ендоплазматичного ретикулума, гени-супресори пухлин, TNF рецептори, GADD протеїни, ERN1, гіпоксія, ішемія.

АННОТАЦІЯ

Кривдюк І.В. ERN1-зависимая регуляция экспрессии генов семейств GADD и TNF рецепторов в клетках глиомы. - Рукопись.

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

Диссертация посвящена исследованию экспрессии генов представителей семейства GADD, а также рецепторов TNF и протеинов, вовлеченных в передачу сигналов от них, в клетках глиомы линии U87 в условиях угнетения функции ERN1, основного сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума, а также в условиях гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина, для выявления возможной роли этих генов в опосредованном ERN1 контроле процесса роста и пролиферации клеток глиомы.

Впервые было показано, что экспрессия генов семейств GADD и TNF рецепторов, а также протеинов, вовлеченных в передачу сигналов от них, в клетках глиомы линии U87 зависит от функциональной активности ERN1, сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума, причем обнаруженные изменения в экспрессии исследованных генов коррелируют с уменьшением интенсивности пролиферации клеток с подавленной активностью ERN1. Установлено также, что гипоксия снижает уровень экспрессии генов *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* и *FADD* и увеличивает уровень *TNFRSF10D*, *RYBP*, *TNIP1* и генов всех исследуемых представителей семьи GADD, за исключением гена *SESNI*. Угнетение ERN1 делает чувствительными к гипоксии гены *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B* и *SESNI*. Кроме того, показано, что уровень экспрессии мРНК всех исследуемых представителей семейства GADD увеличивается при дефиците глутамина и этот эффект зависит от функциональной активности ERN1. Установлено, что при дефиците глюкозы экспрессия всех исследуемых представителей семейства GADD, кроме *SESNI*, повышается, а большинства рецепторов TNF и протеинов, вовлеченных в передачу сигналов от них, снижается в контрольных клетках глиомы. Подавление же энзима ERN1 меняет чувствительность экспрессии большинства генов к недостатку глюкозы.

Полученные результаты раскрывают молекулярные механизмы участия генов семейства GADD и TNF рецепторов, а также протеинов, вовлеченных в передачу сигналов от них, в процессах пролиферации клеток и механизмы взаимодействия гипоксии и ишемических факторов с ERN1, основным сенсорно-сигнальным энзимом стресса эндоплазматического ретикулума.

Ключевые слова: экспрессия генов, глиома, стресс эндоплазматического ретикулума, гены-супрессоры опухолей, TNF рецепторы, GADD протеины, ERN1, гипоксия, ишемия.

SUMMARY

Kryvdiuk I.V. ERN1-dependent regulation of GADD and TNF receptors gene expression in glioma cells. - Manuscript.

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

The main goal of this thesis is to investigate GADD and TNF receptors gene expression in U87 glioma cell line with ERN1 suppression in conditions of hypoxia and glucose or glutamine deprivation, in order to identify the possible role of these genes in ERN1-mediated growth control and proliferation of glioma cells.

For the first time it was shown that GADD and TNF receptors gene expression in glioma cells depended on ERN1 functional activity, and detected changes in their expression correlated with tumor growth inhibition of glioma cells with ERN1 blockade. It was also found that hypoxia reduced the level of *TNFRSF11B*, *TNFRSF21* and *FADD* gene expressions and increased the level of *TNFRSF10D*, *RYBP*, *TNIP1* genes and all studied members of GADD family, except *SESNI* gene. Inhibition of ERN1 introduces hypoxia-induced sensitivity to *TNFRSF1A*, *TNFRSF10B* and *SESNI* gene expressions. Also, it was shown that glutamine deprivation condition leads to up-regulation of all

studied members of GADD family at the mRNA level in glioma cells, and this effect depends on the ERN1 functional activity. It was demonstrated that in control glioma cells glucose deprivation condition leads to the up-regulated expression of all studied members of GADD family, except *SESN1*, and the concomitant down-regulation of the majority of TNF receptors and related factors. The inhibition of ERN1 modifies the effect of glucose deprivation on the expression of most studied genes.

Thus, these results demonstrate that fine-tuning of the expression of TNF-related factors, TNF receptor superfamily genes and GADD family genes is regulated by ERN1, an effector of endoplasmic reticulum stress, as well as depends on hypoxia, glucose and glutamine deprivation in gene specific manner.

Keywords: gene expression, glioma, endoplasmic reticulum stress, tumor suppressor genes, TNF receptors, GADD proteins, ERN1, hypoxia, ischemia.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- AMPK – AMP-activated protein kinase (АМФ-активована протеїнкіназа)
 ATF4 – activating transcription factor-4 (фактор активації транскрипції 4)
 CDK2 – cyclin-dependent kinase 2 (циклін-залежна кіназа 2)
 dnERN1 – dominant negative ERN1 (сублінія клітин гліоми лінії U87, що експресує генетично модифікований варіант ензиму ERN1 без протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності);
 DR – death receptor (рецептор смерті);
 ERN1 – endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра-1);
 FADD – Fas-Associated protein with death domain (Fas-асоційований протеїн, що містить домен смерті);
 GADD – growth arrest DNA damage (зупинка росту і пошкодження ДНК);
 JNK – c-Jun N-terminal kinase (c-Jun N-кінцева кіназа)
 NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерний фактор ехансер каппа-легкого-ланцюга активованих В клітин)
 RIP – receptor-interacting protein (рецептор-взаємодіючий протеїн)
 RYBP – RING1 and YY1-binding protein (протеїн, що зв'язується з RING1 та YY1);
 SESN1 – sestrin 1 (сестрин 1);
 TNF – tumor necrosis factor (фактор некрозу пухлин);
 TNIP1 – TNFAIP3 Interacting Protein 1 (протеїн 1, що взаємодіє з TNFAIP3);
 TORC1 – TOR complex 1 (TOR комплекс 1)
 TRAF – TNF receptor associated factor (TNF-рецептор-асоційований фактор)
 TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand (пов'язаний з TNF апоптоз-індукуючий ліганд);
 UPR – unfolded protein response (відповідь на незгорнуті протеїни);
 ER – ендоплазматичний ретикулум.