

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДІНА**

ЦИМБАЛ ДАРІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.112.7:616

**РОЛЬ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ IRE1 У РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРО- ТА
АНТИ-ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ГЕНІВ У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Толстанова Ганна Миколаївна,
Начальник науково-дослідної частини
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

доктор медичних наук, професор,
Досенко Віктор Євгенович,
завідувач відділу загальної та молекулярної
фізіології
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України

Захист відбудеться “27” березня 2017 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01601, Київ, вул. Леонтовича, 9.

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

Автореферат розісланий “24” лютого 2017 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Н.П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Гліоми – об'єднана назва групи пухлин центральної нервової системи, що виникають за злоякісного переродження клітин глії, зокрема астроцитів. Наразі гліоми відносяться до найбільш агресивних злоякісних новоутворень [Nieto-Sampedro M., 2011].

Важливою особливістю гліом є швидка проліферація, що призводить до змін в пухлинному мікрооточенні, індукованих локальною гіпоксією та дефіцитом поживних речовин. Пухлинні клітини використовують наведені фактори для індукції ангиогенезу та подальшого посилення проліферативних процесів шляхом активації внутрішньоклітинних сигнальних каскадів у відповідь на стресові чинники [Jain R.K., 2007; Onishi M., 2011].

Однією з найбільш чутливих до порушень гомеостазу структур клітини є ендоплазматичний ретикулум (ЕР), в якому за дії низки чинників спостерігається порушення процесів пост-трансляційних модифікацій протеїнів та їх правильного згортання, що отримало назву “стрес ендоплазматичного ретикулума”. Стрес ЕР має здатність репрограмувати геном клітини для забезпечення адекватного протікання метаболічних процесів як у нормі, так і за патологій, включаючи злоякісний ріст [Chevet E., 2015].

Було показано, що конститутивна активація сенсорно-сигнальних шляхів стресу ЕР є облігатним фактором виживання клітин гліоми, а пригнічення IRE1/ERN1-залежних сигнальних каскадів призводить до зниження проліферації клітин гліоми, але одночасно підвищує їх міграційний потенціал [Drogat B., 2007; Auf G., 2010; Auf G., 2013; Dejeans N., 2012].

На початкових етапах дослідження молекулярних механізмів злоякісного росту та пошуку засобів цілеспрямованої, таргетної терапії великі сподівання покладались на індивідуальні протеїни-мішені. Наразі, акцент у дослідженнях ставиться на те, що виживання та проліферація пухлинних клітин залежить від комплексної взаємодії численних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, перебудови їх енергетичного метаболізму, взаємодії з мікрооточенням [Hanahan D., 2000; Hanahan D., 2011].

На сьогоднішній день інгібітори сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 розглядаються як потенційні протипухлинні препарати [Hetz C., 2013]. Відповідно, молекулярні механізми, за якими IRE1/ERN1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми привертають особливу увагу. Надзвичайно важливу роль у регуляції проліферативних процесів відіграють транскрипційні фактори та

пухлинні супресори, причому дерегуляція експресії відповідних груп генів зафіксована майже у всіх типах злоякісних новоутворень [Libermann T.A., 2006, Sherr C.J., 2004].

Таким чином, вивчення експресії генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у клітинах гліоми з пригніченою функцією IRE1/ERN1-залежної гілки сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії, дефіциту глутаміну, глюкози та індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином є необхідним для з'ясування їх участі у контролі процесів проліферації пухлинних клітин. Актуальність запропонованих досліджень полягає у поглибленні розуміння фундаментальних механізмів пригнічення злоякісного росту, що може сприяти ідентифікації нових перспективних генів-мішеней антипухлинних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2014-2016 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: "Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії", ДР № 0111U002234 (2011-2015 р.р.), "Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій", ДР № 0112U002624 (2012-2016 р.р.) та "Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом" (№ держ. реєстр. 0116U001027, 2016-2020р.).

Мета і завдання роботи. Метою дисертаційної роботи було встановити можливу участь генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів, що контролюють процеси проліферації, у IRE1-залежному рості злоякісних пухлин шляхом дослідження їх експресії у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного або часткового пригнічення функції IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну у середовищі.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Вивчити рівень експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1.

2. Дослідити рівень експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності IRE1.

3. Визначити рівень експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії залежно від функції IRE1.

4. Вивчити вплив дефіциту глутаміну та глюкози на рівень експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*,

FOXF1, EPAS1, E2F8, MEST, CD24, KRT18, ING1, ING2, IL13RA2 та MYRL2 у клітинах гліоми лінії U87 залежно від функції IRE1.

5. Дослідити вплив індукованого тунікаміцином стресу ендоплазматичного ретикулума на експресію генів *HOXC6, ATF3, TBX3, FOXF1, EPAS1, E2F8, MYBL1, MYBL2, MEST, CD24, KRT18, ING1, ING2, IL13RA2 та MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення ендорибонуклеазної активності IRE1.

6. Створити мічені С-кінцевими мітками кДНК-конструкції із фрагментами кДНК гена IRE1 та провести аналітичну експресію відповідних протеїнів.

Об'єкт дослідження: механізми IRE1-залежної експресії генів транскрипційних факторів, що контролюють процеси проліферації, та пухлинних супресорів за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози у клітинах гліоми лінії U87.

Предмет дослідження: експресія генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози у клітинах гліоми лінії U87 з повністю або частково пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також можлива їх роль в IRE1-залежному рості злоякісних пухлин.

Методи дослідження: методи культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості та якості зразків РНК, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, рестрикційний аналіз плазмідних ДНК, методи молекулярного клонування, ліпосомної трансфекції клітин, вестерн-блот аналіз протеїнів, метод люциферазного репортера, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше отримано дані про те, що експресія мРНК генів *HOXC6, ATF3, TBX3, TBX2, MAZ, SNAI2/SLUG, TCF3, TCF8, MYBL1, MYBL2, FOXF1, EPAS1, E2F8, MEST, CD24, KRT18, ING1, ING2, IL13RA2 та MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1. Встановлено достовірне зменшення рівня експресії мРНК про-проліферативних транскрипційних факторів за умов пригнічення IRE1. Показано, що регуляція експресії генів *HOXC6, ATF3, TBX3, FOXF1, EPAS1, E2F8, MEST, CD24, KRT18, ING2, IL13RA2 та MYRL2* залежить як від кіназної, так і від ендорибонуклеазної активності IRE1. Продemonстровано, що експресія гена *ING1* зростає лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1. У випадку генів *FOXF1 та ING2* виявлено, що повне та часткове пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 має різнонапрямлений вплив на рівень експресії їх мРНК.

Показано, що індукція стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою ендорибонуклеазною активністю IRE1 модифікує експресію генів *E2F8, TBX3, FOXF1, HOXC6, ATF3, MEST, CD24, KRT18, MYBL1, MYBL2, ING2* і до регуляції їх експресії причетна кіназа IRE1 або інші сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума.

Було вперше продемонстровано, що пригнічення функції IRE1 модифікує гіпоксичну регуляцію експресії мРНК транскрипційних факторів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *TCF3*, *TCF8*, *SNAI2* та *MYBL2*, а також пухлинних супресорів *ING1*, *KRT18*, *CD24* та *MEST* у клітинах гліоми лінії U87.

Виявлено, що дефіцит глютаміну та глюкози впливає на рівень експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *FOXF1*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *EPAS1*, *E2F8*, *CD24*, *KRT18*, *ING1* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

Створено мічені на С-кінці с-Мус і 6xHis мітками кДНК-конструкції для експресії домінант-негативної форми IRE1 і його цитозольної частини та проведено аналіз експресії відповідних протеїнів у клітинах недрібноклітинної карциноми легень.

Практичне значення роботи полягає у з'ясуванні ролі сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 у регуляції експресії транскрипційних факторів і пухлинних супресорів, залучених до контролю проліферації пухлинних клітин, залежно від таких ключових факторів пухлинного мікрооточення, як гіпоксія, дефіцит глюкози або глютаміну. Практичне значення мають експресійні кДНК-конструкції, які можуть бути використані для вивчення ролі IRE1-залежної гілки сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума у злоякісному рості. Отримані результати були використані у лекціях по спецкурсу “Конструювання генів” для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2014-2016 р.р. Здобувачем було самостійно проведено аналіз літературних даних за темою роботи, реалізовано експериментальні дослідження із вивчення експресії низки генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів, що відіграють роль у процесах проліферації, а також аналіз та узагальнення отриманих результатів. Дослідження експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного або часткового пригнічення функції IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глютаміну у середовищі проводились за участі к.м.н. Мінченка Д. О., к.б.н. Карбовського Л. Л. та молодшого наукового співробітника Харькової А. П.; створення кДНК-конструкцій та аналітична експресія відповідних протеїнів були здійснені здобувачем самостійно; розробка методології експериментальних досліджень, аналіз та обговорення їх результатів – за участі наукового керівника, д.б.н., проф. Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: XI Українському біохімічному конгресі, Київ, 2014; Міжнародних наукових конференціях молодих вчених “Шевченківська весна: Біологія – 2015 і Біологія – 2016”, Київ, 2015 та 2016; XI Міжнародній науковій конференції “Молодь і поступ біології”, Львів, 2015; 3-й Міжнародній науковій конференції “Актуальні проблеми сучасної біохімії та

клітинної біології”, Дніпропетровськ, 2015; International Conference on “Chromatin regulation in proliferation and differentiation”, Ессен, Німеччина, 2015; V Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», Київ, 2016, Конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 2016.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 167 сторінках комп’ютерного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 5 розділів власних досліджень, розділу «Обговорення результатів», висновків та списку використаних джерел (209 найменувань). Робота містить 69 рисунків та 3 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Численні фактори, такі як зниження концентрації іонів кальцію, оксидативний стрес, гіпоксія, дефіцит енергії, метаболічна стимуляція, зміни в процесах глікозилювання, активація запальних процесів, зростання інтенсивності синтезу білка, або ж експресії дефектних протеїнів, здатні порушувати нормальне функціонування ендоплазматичного ретикулума [Hetz S., 2013; Cao S.S., 2012]. Такі порушення призводять до накопичення в люмені ЕР не згорнутих, або неправильно згорнутих протеїнів, що призводить до активації сенсорно-сигнальних шляхів стресу ЕР. Сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума задіяні в патогенезі численних хвороб, зокрема ожиріння, ряду нейродегенераторних, запальних, аутоімунних, метаболічних та онкологічних захворювань [Lipson K.L., 2006; Hotamisligil G.S., 2010; Oakes S.A., 2015].

У випадку гліоми було показано, що блокування ензиматичних активностей IRE1 призводить до зменшення кількості функціональних кровоносних судин в межах пухлини, але одночасно до зростання інвазивності клітин [Auf G., 2010; Auf G., 2013; Dejeans N., 2012]. Було висунуто припущення, що IRE1 є ключовим регулятором процесів ангиогенезу та інвазії в злоякісних гліомах, оскільки IRE1-залежний сигналінг активується у відповідь на ішемію [Drogat B., 2007; Dejeans N., 2012]. Активний ріст пухлини супроводжується ішемічними процесами, що в свою чергу активують сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума. Така активація є адаптивною для пухлинних клітин, сприяє їх виживанню і проліферації та вносить свій вклад у формування резистентності до хіміотерапевтичних агентів. Численні експериментальні дані свідчать на користь гіпотези, що саме IRE1-опосередкована гілка сигнальних шляхів стресу ЕР відповідає за адаптацію пухлинних клітин до умов ішемії та гіпоксії [Auf G., 2010; Auf G., 2013; Pereira E.R., 2010; Minchenko D.O., 2012].

Матеріали та методи досліджень. Клітини гліоми лінії U87 (American Type Culture Collection, США) були надані для роботи професором Мішелем Моне

(INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція), нормальні астроцити людини лінії NHA/TS були надані для роботи докторами Кеном Сасаї та Шінъя Танака (Лабораторія молекулярної та клітинної патології, Школа медицини університету Хоккайдо, Японія), сублінія клітин недрібноклітинної карциноми легень H1299-shE6AP була надана для роботи професором Мартіном Шефнером (Лабораторія клітинної біохімії, Констанцський університет, Німеччина).

У даній роботі також використані три сублінії клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1 (Invitrogen, США); 2) клітини (dn-ERN1) з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 домінант-негативною кДНК-конструкцією dn-ERN1, що кодує протеїн ERN1, який не має кіназного та ендорибонуклеазного доменів; 3) клітини (dnr-ERN1) з частковим пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 домінант-негативною кДНК-конструкцією dnr-ERN1, що кодує протеїн ERN1, який має інтактний кіназний, але не має ендорибонуклеазного домена [Drogat B., 2007; Auf G., 2013]. Пригнічення функції ензиму IRE1/ERN1 було оцінено раніше за наявністю фосфорильованої форми IRE1/ERN1 та утворенням альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулума [Auf G., 2013; Minchenko D.O., 2012].

Культитивування клітин проводилось у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), в яке додавали глютамін (2 ммоль/л), 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 од/мл; Gibco, США) та стрептоміцин (0,1 мг/мл; Gibco, США). Вирощували клітини в інкубаторі з 5% CO₂ при температурі +37 °C.

При дослідженні впливу дефіциту глюкози та глютаміну клітини промивали однократним фосфатно-сольовим буфером (Thermo Fisher Scientific, США), додавали середовище DMEM (Gibco, США) без глюкози або без глютаміну і витримували протягом 16 годин. При дослідженні впливу гіпоксії клітини поміщали в атмосферу 3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂ на 16 год, як описано раніше [Minchenko D.O., 2012]. Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулуму в культуральне середовище додавали тунікаміцин (10 мкг/мл) та інкубували протягом 2 год.

Конструкція, що кодує бета-галактозидазу, та репортерна конструкція, що містить 3xHSE елемент, були надані для роботи професором Мартіном Шефнером, лабораторія клітинної біохімії, Констанцський університет, Німеччина.

У дисертаційній роботі використані методи культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості та якості зразків РНК, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, рестрикційний аналіз плазмідних ДНК, методи молекулярного клонування, ліпосомної трансфекції клітин, вестерн-блот аналіз протеїнів, метод люциферазного репортера, методи статистичного аналізу.

Результати досліджень та їх обговорення

Експресія генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у клітинах гліоми з повним та частковим пригніченням функції сигнального ензиму IRE1. Ми спостерігали, що пригнічення ензиматичних активностей IRE1 у клітинах гліоми призводить до зниження експресії транскрипційних факторів HOXC6, EPAS1, TBX2, ATF3, E2F8 та FOXF1 (Табл. 1, Рис.1). Експресія мРНК TBX3, MAZ, MYBL1 та MYBL2, навпаки, зростає за досліджуваних умов (Табл. 1, Рис. 1).

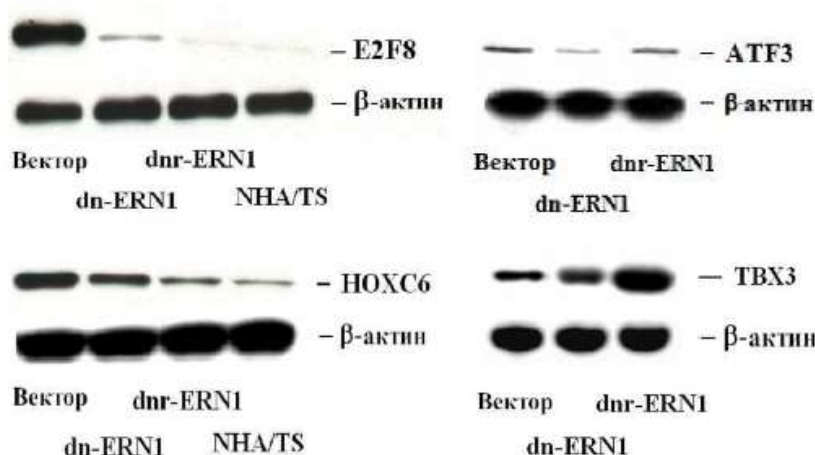


Рис.1. Рівень протеїнів транскрипційних факторів E2F8, HOXC6, ATF3 та TBX3 у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (Вектор), та в сублініях цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією IRE1/ERN1 (dn-ERN1), або домінант-негативною за ендорибонуклеазою (dnr-ERN1), а також у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. В якості контролю кількості протеїнів, взятих для аналізу, використовували бета-актин (β -актин).

Транскрипційні фактори HOXC6, ATF3, TBX2 та EPAS1 є відомими позитивними регуляторами проліферації пухлинних клітин [Jacobs J.J., 2000; Xia G., 2001; Bangoura G., 2007; Prince S., 2004; Mohammed N., 2011; Vinarskaja A., 2011, Ma S., 2015]. Транскрипційний фактор E2F8 був описаний як негативний регулятор клітинного циклу, однак, пізніше було виявлено, що його посилена експресія сприяє розвитку пухлин [Christensen J., 2005; Zhan L., 2014; Park S.-A., 2015]. Отримані нами дані можуть свідчити про позитивну участь даних транскрипційних факторів у розвитку гліом.

Нещодавно було продемонстровано, що TBX3 є не тільки транскрипційним репресором, а і регулятором альтернативного сплайсингу [Kumar P.P., 2014]. З великою імовірністю можна припускати, що в клітинах гліоми TBX3 може відігравати роль IRE1-залежного негативного регулятора проліферації, однак, конкретний механізм залишається невідомим.

Транскрипційні фактори SNAI2, TCF3 та TCF8 є негативними регуляторами Е-кадгерину і необхідні для набуття пухлинними клітинами здатності до міграції

[Bolos V., 2003; Peinado H., 2007; Patel D., 2015]. Наші дані свідчать про те, що зростання експресії транскрипційних факторів SNAI2, TCF3 та TCF8 (Табл. 1) також може бути одним із механізмів, що забезпечують посилення здатності клітин гліоми до міграції за умов виключення IRE1/ERN1.

У клітинах гліоми із пригніченням ензиматичних активностей IRE1 зростає експресія пухлинних супресорів KRT18, ING1, ING2, MYL9 та MEST (Табл. 1). Ми вважаємо, що нормалізація рівнів експресії пухлинних супресорів може бути одним із механізмів IRE1/ERN1-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

Таблиця 1

Зміни рівня експресії генів за умов повного та часткового пригнічення ензиму IRE1 у клітинах гліоми

Ген	dn-ERN1, % від контролю	dnr-ERN1, % від контролю	Астроцити, % від контролю
<i>HOXC6</i>	↓(53%)	↓(27%)	↓(8%)
<i>EPAS1</i>	↓(5%)	↓(38%)	↓(41%)
<i>SNAI2</i>	↑(189%)	-	-
<i>TCF3</i>	↑(234%)	-	-
<i>TCF8</i>	↑(187%)	-	-
<i>TBX2</i>	↓(22%)	-	-
<i>TBX3</i>	↑(257%)	↑(938%)	↑(2961%)
<i>ATF3</i>	↓(14%)	↓(79%)	↑(143%)
<i>FOXF1</i>	↓(47%)	↑(2307%)	↑(2295%)
<i>MAZ</i>	↑(229%)	-	-
<i>MYBL1</i>	↑(597%)	↑(171%)	-
<i>MYBL2</i>	↑(216%)	↓(72%)	-
<i>E2F8</i>	↓(6%)	↓(2%)	↓(0,4%)
<i>MYL9</i>	↑(180%)	↑(318%)	↑(1506%)
<i>KRT18</i>	↑(270%)	↑(4902%)	↑(50103%)
<i>ING1</i>	↑(266%)	змін немає	-
<i>ING2</i>	↑(173%)	↓(80%)	-
<i>MEST</i>	↑(832%)	↑(601%)	-
<i>CD24</i>	↑(1552%)	↑(3207%)	↑(3160%)
<i>IL13RA2</i>	↓(17%)	↓(0,0015%)	↓(0,00004%)

Примітки: *dn-ERN1* – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази *IRE1*; *dnr-ERN1* – клітини гліоми із виключенням лише ендорибонуклеази *IRE1*; контроль – клітини гліоми, трансфіковані вектором; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень. Відносний рівень експресії генів визначений за допомогою кількісної ПЛР.

Довгий час CD24 вважався онкогеном, однак, нещодавно була продемонстрована і його пухлино-супресорна функція [Suyama K., 2016]. У клітинах гліоми лінії U87 експресія мРНК CD24 значно знижена у порівнянні з нормальними

астроцитами людини, а повне та часткове пригнічення ензиматичних активностей IRE1/ERN1 наближає експресію гена *CD24* до рівня, притаманного нормальним астроцитам (Табл. 1). Отримані дані свідчать на користь припущення, що в контексті гліоми *CD24* відіграє саме пухлино-супресорну роль.

Протеїн *IL13RA2* охарактеризований як онкоген і його надекспресія зафіксована у багатьох типах пухлин [Brown C.E., 2013, Papageorgis P., 2015]. Наші дані демонструють надекспресію *IL13RA2* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з нормальними астроцитами людини (Табл. 1). Ми припускаємо, що значне пригнічення експресії *IL13RA2* у клітинах гліоми із пригніченням ензиматичних активностей IRE1 сприяє сповільненню їх проліферації.

Важливо відмітити, що повне та часткове пригнічення ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1 чинить різний за величиною вплив на експресію усіх досліджуваних генів (Табл. 1). У випадку гена *ING1*, його експресія зростає лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 (Табл. 1). У випадку генів *FOXF1* та *ING2* повне та часткове пригнічення функції IRE1 має різнонапрямлений вплив на рівень експресії їх мРНК (Табл. 1). Ці дані свідчать про те, що кіназна та ендорибонуклеазна активності IRE1 є частково незалежними, та можуть по-різному впливати на експресію генів, що мають відношення до контролю процесів проліферації.

Вплив гіпоксії на експресію генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у клітинах гліоми з пригніченою функцією IRE1. Ми показали, що у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1, за умов гіпоксії зростає експресія мРНК транскрипційних факторів *HOXC6*, *ATF3*, *EPAS1* і *SNAI2*, пухлинних супресорів *MYL9/MYRL2*, *ING1* та *ING2*, а також факторів *CD24*, *IL13RA2* та *MEST* (Табл. 2). Пригнічення IRE1 у клітинах гліоми усуває гіпоксичну регуляцію експресії генів *HOXC6*, *CD24*, *ING2* та *MYL9*, що свідчить про опосередкованість гіпоксичної регуляції експресії даних генів функціональною активністю сенсорно-сигнального ензиму IRE1 (Табл. 2). Повне виключення IRE1 послаблює вплив гіпоксії на експресію генів *SNAI2* та *MEST* у клітинах гліоми, і, навпаки, вплив гіпоксії на експресію генів *ATF3*, *EPAS1* та *IL13RA2* посилюється за даних умов (Табл. 2). Окремо варто відмітити, що пригнічення IRE1 модифікує напрямок змін експресії пухлинного супресора *ING1* за умов гіпоксії у клітинах гліоми (Табл. 2).

Таблиця 2

Гіпоксична регуляція експресії генів *HOXC6*, *ATF3*, *EPAS1*, *SNAI2*, *MYL9/MYRL2*, *ING1*, *ING2*, а також *CD24*, *IL13RA2* та *MEST* за умов пригнічення IRE1

Ген	Вектор*	dn-ERN1**
<i>HOXC6</i>	↑(179%)	змін немає
<i>EPAS1</i>	↑ (121%)	↑(176%)
<i>SNAI2</i>	↑(174%)	↑(116%)
<i>ATF3</i>	↑(237%)	↑(391%)
<i>MYL9</i>	↑(110%)	змін немає
<i>ING1</i>	↑(246%)	↓(79%)

<i>ING2</i>	↑(120%)	змін немає
<i>MEST</i>	↑(195%)	↑(128%)
<i>CD24</i>	↑(185%)	змін немає
<i>IL13RA2</i>	↑(115%)	↑(136%)

Примітки: ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; * - у порівнянні з клітинами гліоми, трансфікованими вектором, які не піддавались впливу гіпоксії; ** - у порівнянні з клітинами гліоми із пригніченням *IRE1*, які не піддавались впливу гіпоксії; $p < 0,05$ для всіх значень. Відносний рівень експресії генів визначений за допомогою кількісної ПЛР.

Експресія мРНК *E2F8*, *TBX2*, *MYBL1*, *MYBL2* і *TCF8*, а також *KRT18*, навпаки, знижується за даних умов (Табл. 3). Гіпоксія не чинила впливу на експресію генів транскрипційних факторів *FOXF1*, *TBX3*, *MAZ* та *TCF3*, а пригнічення ензиматичних активностей *IRE1* модифікувало вплив гіпоксії на експресію досліджуваних генів у клітинах гліоми за винятком фактора *MAZ*.

Таблиця 3

Гіпоксична регуляція експресії генів *E2F8*, *TBX2*, *MYBL1*, *MYBL2*, *TCF8*, *KRT18*, *FOXF1*, *TBX3*, *MAZ* та *TCF3* за умов пригнічення *IRE1*

Ген	Вектор*	dn-ERN1**
<i>E2F8</i>	↓(37%)	↓(68%)
<i>TBX2</i>	↓(50%)	↓(44%)
<i>MYBL1</i>	↓(68%)	↓(77%)
<i>MYBL2</i>	↓(44%)	змін немає
<i>TCF8</i>	↓(44%)	↓(72%)
<i>KRT18</i>	↓(35%)	змін немає
<i>FOXF1</i>	змін немає	↓(49%)
<i>TBX3</i>	змін немає	↑(131%)
<i>MAZ</i>	змін немає	змін немає
<i>TCF3</i>	змін немає	↑(132%)

Примітки: ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; * - у порівнянні з клітинами гліоми, трансфікованими вектором, які не піддавались впливу гіпоксії; ** - у порівнянні з клітинами гліоми із пригніченням *IRE1*, які не піддавались впливу гіпоксії; $p < 0,05$ для всіх значень. Відносний рівень експресії генів визначений за допомогою кількісної ПЛР.

Пригнічення *IRE1* у клітинах гліоми усуває гіпоксичну регуляцію експресії генів *MYBL2* та *KRT18* (Табл. 3). У той же час виключення кінази та ендорибонуклеази *IRE1* у клітинах гліоми не модифікувало вплив гіпоксії на експресію транскрипційних факторів *TBX2* та *MYBL1*, що свідчить про незалежний від *IRE1* спосіб впливу гіпоксії на експресію даних генів (Табл. 3).

У випадку транскрипційних факторів *TBX3*, *FOXF1* та *TCF3*, рівні їх мРНК у клітинах гліоми не залежать від гіпоксії, однак, пригнічення *IRE1* вводить гіпоксичну регуляцію їх експресії, причому найбільші зміни спостерігаються у випадку транскрипційного фактора *FOXF1*: його експресія у клітинах гліоми із

пригніченням ензиматичних активностей IRE1 знижується за умов гіпоксії удвічі, порівняно з клітинами, що культивувались за нормального рівня кисню (Табл. 3). Експресія TBX3 та TCF3, навпаки, зростає за умов гіпоксії у клітинах із пригніченням IRE1 (Табл. 3). Виключення кінази та ендорибонуклеази IRE1 послаблює вплив гіпоксії на експресію генів *E2F8* та *TCF8* у клітинах гліоми (Табл. 3). Особливої уваги заслуговує той факт, що у жодному із випадків вплив гіпоксії не нівелює ефекту пригнічення IRE1 на експресію досліджуваних генів у клітинах гліоми.

Експресія генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози та глутаміну в залежності від функції сигнального ензиму IRE1. Ми зафіксували зростання експресії мРНК *EPAS1* (+28%), *TBX3* (+25%), *ATF3* (+59%), *FOXF1* (+123%) та *MAZ* (+22%) в клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну. Відповідно, зниження експресії спостерігалось для транскрипційних факторів *E2F8* (-50%), *TCF8* (-16%), *TBX2* (-47%), *MYBL1* (-47%) та *MYBL2* (-63%). Дефіцит глутаміну в клітинах гліоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1, не впливає на експресію мРНК *HOXC6*, *SNAI2* та *TCF3*.

Виключення IRE1 в клітинах гліоми не впливало на чутливість експресії транскрипційних факторів *HOXC6*, *TBX3*, *MYBL1* та *TCF3* до відсутності глутаміну в середовищі, однак, модифікувало чутливість експресії більшості досліджуваних генів до даного чинника (Рис. 2, Рис. 3). Так, в клітинах гліоми, трансфікованих dn-ERN1, за умов дефіциту глутаміну знижувалась експресія мРНК транскрипційних факторів *E2F8* (у 2,9 разів), *TBX2* (-20%), *TCF8* (-44%), *MYBL2* (-45%), і, навпаки, зростала експресія *EPAS1* (у 3,4 раз), *SNAI2* (+22%), *ATF3* (у 6,4 рази) (Рис. 2, Рис. 3). Цікаво, що у клітинах із пригніченням IRE1/ERN1 експресія мРНК транскрипційних факторів *MAZ* та *FOXF1* не змінювалась у відповідь на дефіцит глутаміну (Рис.2, Рис. 3).

Дефіцит глутаміну має найбільший вплив на експресію транскрипційних факторів *E2F8*, *ATF3*, *FOXF1* та *EPAS1*, а величина цього впливу залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1.

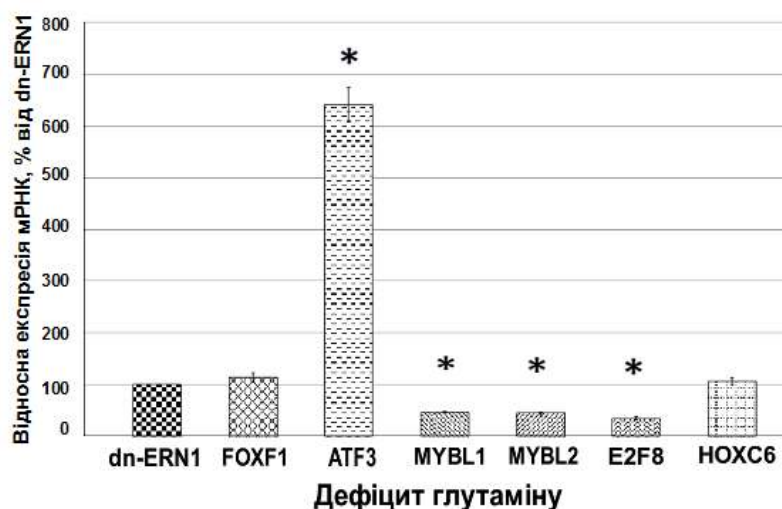
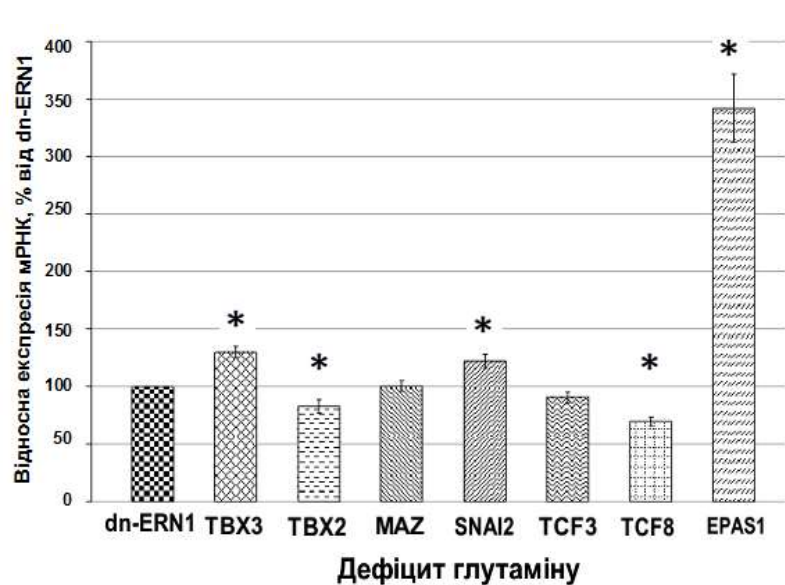


Рис. 2. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *FOXF1*, *ATF3*, *MYBL1*, *MYBL2*, *E2F8* та *HOXC6* у клітинах гліоми dn-ERN1, визначений за допомогою кількісної ПЛР. dn-ERN1 - 100%. Дані виражали як $M \pm m$, ($n = 4$). * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними клітинами (dn-ERN1).

Рис. 3. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2*, *TCF3*, *TCF8* та *EPAS1* у клітинах гліоми dn-ERN1, визначений за допомогою кількісної ПЛР. dn-ERN1 - 100%. Дані



виражали як $M \pm m$, ($n = 4$). * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними клітинами (dn-ERN1).

Ми також показали, що дефіцит глюкози у контрольних клітинах гліоми, не впливає на експресію мРНК транскрипційних факторів *MAZ*, *SNAI2*, *TBX3* та *TCF8*, але модифікує експресію решти досліджуваних транскрипційних факторів.

Зокрема, ми зафіксували зниження експресії мРНК транскрипційних факторів *E2F8* (-65%), *HOXC6* (-15%), *TBX2* (-34%), *TCF3* (-22%), *FOXF1* (-16%), *MYBL1* (-52%) та *MYBL2* (-50%) в клітинах гліоми, трансфікованих порожнім вектором pcDNA3.1, за умов дефіциту глюкози. Експресія транскрипційних факторів *EPAS1* та *ATF3*, навпаки зростала за умов дефіциту глюкози на 45% та 50% відповідно.

Пригнічення IRE1 не впливало на чутливість експресії транскрипційних факторів *TBX3*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MAZ* та *MYBL2* до відсутності глюкози у середовищі, однак, модифікувало чутливість експресії решти досліджуваних генів до даного чинника. Зокрема, у клітинах гліоми із виключенням IRE1 експресія мРНК *FOXF1* та *TBX2* не змінювалась за відсутності глюкози, спостерігалось незначне (+15%) підвищення експресії мРНК *SNAI2*, експресія *HOXC6*, навпаки, знижувалась на 38% порівняно з контролем. Найсильніше дефіцит глюкози впливав на експресію транскрипційних факторів *ATF3*, *EPAS1* та *E2F8*. Так, нестача глюкози у клітинах гліоми із виключенням IRE1 призводила до зниження експресії мРНК *E2F8* у 5,8 разів порівняно з клітинами, що культивувались за нормальних концентрацій глюкози. Експресія *ATF3* та *EPAS1*, навпаки, зростала за досліджуваних умов, у 19 та 3,7 разів, відповідно.

Було виявлено, що дефіцит глутаміну не змінює експресію мРНК пухлинних супресорів *ING1*, *MYL9/MYRL2*, *IL13RA2* та *KRT18* у контрольних клітинах гліоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1, однак, призводить до зниження рівнів мРНК *MEST* (-73%), *CD24* (-39%) та *ING2* (-35%). В клітинах із пригніченням ензиматичних активностей IRE1, що культивувались у середовищі без глутаміну, експресія мРНК *CD24*, *MYL9/MYRL2*, *IL13RA2* та *KRT18* не змінювалась. Рівні експресії *ING1*, *ING2* та *MEST* в клітинах гліоми із виключенням IRE1 знижувався за умов дефіциту глутаміну в 2,4 рази, у 2 рази та на 35%, відповідно. Цікаво відмітити, що дефіцит глутаміну в середовищі повертає рівні експресії пухлинних супресорів *ING1* та *ING2* в клітинах гліоми із пригніченням ензиматичних активностей IRE1/ERN1 до рівнів, характерних для немодифікованих клітин гліоми з нативним IRE1/ERN1.

Дефіцит глюкози в клітинах гліоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1, не впливає на експресію CD24, MEST, IL13RA2 та KRT18, призводить до зниження рівнів експресії пухлинних супресорів ING1 (-14%) та ING2 (-20%), і зростання експресії мРНК MYL9/MYRL2 на 55% порівняно з клітинами, що культивувались за нормальних концентрацій глюкози. У клітинах із пригніченням IRE1 ми спостерігали зростання експресії IL13RA2 (+23%) та MYL9/MYRL2 (+27%), та зниження експресії CD24 (-43%), MEST (-41%), KRT18 (-13%), ING1 (-52 %) та ING2 (-26%) за відсутності глюкози у культуральному середовищі. Відповідно, дефіцит глюкози у клітинах із пригніченням сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 призводить до незначного зниження експресії досліджуваних пухлинних супресорів, і, навпаки, до помірного зростання експресії про-проліферативного IL13RA2.

Вплив тунікаміцину на експресію генів транскрипційних факторів у клітинах гліоми з частково пригніченою функцією IRE1. Нами було показано, що експресія мРНК EPAS1, MYL9/MYRL2 та IL13RA2 не змінюється у клітинах гліоми із пригніченням ендорибонуклеазної активності IRE1 за умов індукції стресу ЕР тунікаміцином. За досліджуваних умов ми спостерігали зниження експресії мРНК TBX3 (на 34%), FOXF1 (на 57%), MEST (у 4,6 раз), E2F8 (у 7,8 раз), HOXC6 (на 47%), MYBL1 (у 6,5 раз), MYBL2 (у 6,1 раз), CD24 (на 35%), ING1 (на 20%) та ING2 (на 37%). Експресія мРНК ATF3 та KRT18 зростала у 3,8 раз та на 25%, відповідно. Отримані дані свідчать про те, що експресія мРНК EPAS1, MYL9/MYRL2 та IL13RA2 за умов стресу ЕР регулюється виключно ендорибонуклеазою IRE1/ERN1 в той час як експресія решти досліджуваних генів за умов стресу ЕР регулюється також кіназою IRE1, або за рахунок інших, незалежних від IRE1, механізмів.

Аналітична експресія кДНК-конструкцій IRE1, що містять С-кінцеві мітки, у клітинах недрібноклітинної карциноми легень. Ми ампліфікували фрагмент довжиною 1690 п.н.з., який кодує домінант-негативну форму IRE1 та відповідає амінокислотним залишкам 1 – 537 нативного протеїну. Отриманий фрагмент був розщеплений ендонуклеазами рестрикції HindIII та XbaI і лігований у вектор pcDNA4-Мус/His-А. Подібний підхід був застосований для отримання кодуючої послідовності цитозольного домену IRE1. Було ампліфіковано фрагмент довжиною 1557 п.н.з., який відповідає амінокислотним залишкам 488 – 977 нативного протеїну. Відповідний фрагмент було розщеплено ендонуклеазами рестрикції HindIII та XbaI і лігвано у вектор pcDNA4-Мус/His-А. Результати секвенування показали, що очікувана послідовність і рамки зчитування були збережені, та підтвердили успішність злиття фрагментів кДНК IRE1/ERN1 із послідовностями, які кодують С-кінцеві пептидні мітки (Рис. 4).

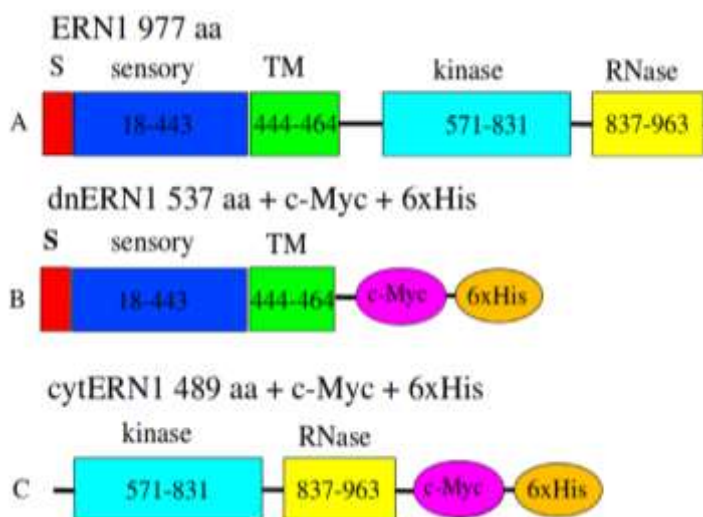
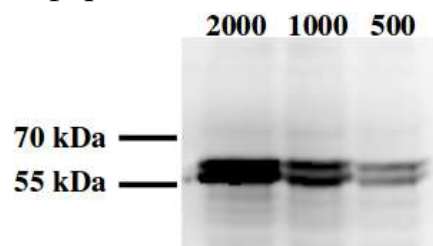


Рис. 4. Схематичне зображення очікуваних протеїнових продуктів: А – доменна структура нативного IRE1/ERN1; В – доміант-негативна форма IRE1 (dnIRE1) із С-кінцевими с-Мус та 6xHis мітками; С – цитозольний домен IRE1 (cytIRE1) із С-кінцевими с-Мус та 6xHis мітками. S – N-кінцевий сигнальний пептид, TM – трансмембранний регіон, RNase – ендорибонуклеаза IRE1, kinase – кіназа IRE1.

Щоб визначити, чи забезпечують створені конструкції експресію бажаних протеїнових продуктів, ми трансфікували клітини сублінії H1299-shE6AP різними кількостями плазмід pcDNA4+dnIRE1 і pcDNA4+cytIRE1 та провели детекцію експресованих протеїнів методом вестерн-блот аналізу із анти-с-Мус антитілом. Ми продемонстрували, що доміант-негативна форма IRE1/ERN1 експресується як



протеїновий продукт очікуваного розміру (Рис. 5А). Кількість обох протеїнів, як доміант-негативного IRE1/ERN1, так і його цитозольного домену, залежала від кількості плазмиди, використаної для трансфекції (Рис. 5). Цікаво, що у клітинах, трансфікованих конструкцією pcDNA4+cytIRE1, на блотограмах визначалось два протеїнових продукти (Рис. 5Б).

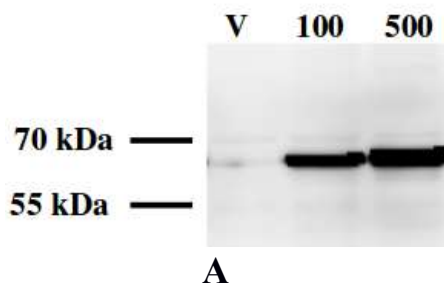


Рис. 5. Вестерн-блот аналіз експресії доміант-негативної форми (А) та цитозольного домену (Б) IRE1/ERN1 в клітинах H1299-shE6AP. V- клітини трансфіковані порожнім вектором pcDNA4-Мус/His-A; 100, 500, 1000, 2000 – кількість відповідної кДНК-конструкції в нанограмах, використана для трансфекції.

Ми припускаємо, що протеїнові продукти відповідають автофосфорильованій та не фосфорильованій формам цитоплазматичного домену IRE1, відповідно.

Відомо, що у дріжджів конститутивна активація відповіді на тепловий шок (heat shock response, HSR), яка досягається над-експресією транскрипційного фактора Hsf1 (heat shock factor 1), здатна відновлювати ріст клітин із нокаутом IRE1 [173]. Більше того, було продемонстровано, що у дефіцитних за IRE1 клітинах дріжджів відповідь на тепловий шок активується стресом ендоплазматичного ретикулума, в той час як у клітинах дріжджів дикого типу не спостерігається опосередкована стресом ЕР активація [173].

Ми мали на меті визначити, чи над-експресія домінант-негативної форми IRE1 без додаткової індукції стресу є достатньою для активації HSE-залежної транскрипції у пухлинних клітинах. Для досягнення поставленого завдання ми використали репортерну конструкцію, що кодує люциферазу та містить HSE-елементи у промоторній ділянці (3xHSE-luc). Клітини H1299-shE6AP були ко-трансфіковані конструкціями pcDNA4+dnIRE1, 3xHSE-luc та конструкцією, що експресує β -галактозидазу. Активність люциферази вимірювали в лізатах клітин та нормалізували згідно до відносної ефективності трансфекції.

Ми з'ясували, що над-експресія домінант-негативної форми IRE1 призводила до більш ніж двократного збільшення HSE-залежної транскрипції (Рис. 6).

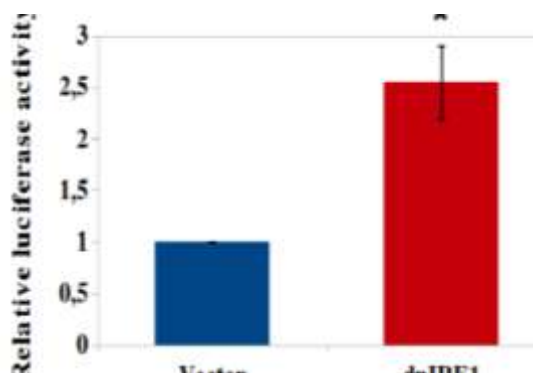


Рис. 6. Вплив надекспресії домінант-негативної форми IRE1 на HSE-опосередковану транскрипцію в клітинах H1299-shE6AP, визначений за методом люциферазного репортера, * - $p < 0.05$; $n = 4$; "Vector" - клітини, трансфіковані порожнім вектором pcDNA4-Myc/His-A; "dnIRE1" - клітини, трансфіковані конструкцією pcDNA4+dnIRE1.

Отримані результати дозволяють припустити, що інгібування IRE1 може призводити до незалежної від теплового шоку активації сигнального шляху відповіді на тепловий шок.

Результатом даного розділу роботи є створення оригінальних експресуючих кДНК-конструкцій, що кодують домінант-негативну форму IRE1 та цитоплазматичний домен даного сенсорно-сигнального ензиму. Відповідні рекомбінантні протеїни мічені на С-кінці пептидними мітками, що спрощує та здешевлює їх детекцію, а також уможливорює афінну очистку.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлений теоретичний аналіз і експериментальне рішення актуальної наукової задачі щодо ролі груп генів транскрипційних факторів та пухлинних супресорів у зниженні проліферації клітин гліоми, опосередкованому пригніченням сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1/ERN1. Отримані результати розширюють уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі IRE1-опосередкованого контролю проліферації

пухлинних клітин, та дозволяють ідентифікувати нові потенційні мішені для подальших досліджень у галузі розробки протипухлинних препаратів.

1. Показано, що інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до значного пригнічення експресії транскрипційних факторів E2F8, EPAS1, NOXC6, FOXF1, TBX2 і ATF3 та зростання рівня експресії транскрипційних факторів TBX3, MYBL1 і MYBL2, що відображає провідну роль як про-, так і анти-проліферативних транскрипційних факторів в IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації клітин гліоми.

2. У клітинах гліоми з пригніченням ензиму IRE1 спостерігається зростання експресії транскрипційних факторів TCF3, TCF8, SNAI2, що може відображати один з механізмів підвищення міграційного потенціалу даних клітин за умов виключення IRE1.

3. Показано, що інгібування IRE1 у клітинах гліоми призводить до зростання рівня експресії низки генів пухлинних супресорів, а саме KRT18, ING1, ING2, MYL9 та MEST, які можуть бути причетними до опосередкованого сигнальним шляхом IRE1 пригнічення проліферації клітин гліоми.

4. Дані, щодо експресії CD24 у нормальних астроцитах людини, клітинах гліоми, та сублініях клітин гліоми із повним та частковим пригніченням сенсорно-сигнального ензиму IRE1 свідчать про можливу пухлино-супресорну роль CD24 у розвитку гліом.

5. Встановлено, що експресія більшості досліджених генів регулюється як кіназою, так і ендорибонуклеазою активністю IRE1, причому ефект повного пригнічення IRE1 та лише його ендорибонуклеази може бути різним як по величині, так і за напрямком змін, що свідчить про часткову незалежність функцій кінази і ендорибонуклеази IRE1 та їх взаємодію. Отримані дані мають важливе значення для розробки інгібіторів IRE1 в якості потенційних хіміотерапевтичних агентів.

6. Встановлено, що пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми здебільшого модифікує вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну на експресію досліджених генів.

7. Проведені дослідження дозволяють встановити, що транскрипційні фактори NOXC6 та TBX2, а також субодиниця A2 рецептора інтерлейкіну 13 є перспективними мішенями для досліджень у галузі пошуку нових препаратів для лікування гліом.

8. Створені експресуючі кДНК-конструкції, які забезпечують стабільну, дозо-залежну експресію рекомбінантного цитозольного домену IRE1 та його домінант-негативної форми, злитих на С-кінці із гексагістидиною та с-Мус пептидними мітками, що полегшує детекцію відповідних протеїнів. Дані конструкції є перспективними для використання у подальших дослідженнях IRE1-залежної гілки сенсорно-сигнального шляху ендоплазматичного ретикулума в пухлинних клітинах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Inhibition of kinase and endoribonuclease activity of ERN1/IRE1 α affects expression of proliferation-related genes in U87 glioma cells / O.H. Minchenko, **D.O. Tsymbal**, D.O. Minchenko, M. Moenner, O.V. Kovalevska, N.M. Lypova // Endoplasmic reticulum stress in diseases. – 2015. – Vol. 2, N 1. – P. 18 – 29. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів та обробку даних, підготовлено матеріали до друку).*

2. Inhibition of ERN1 signaling enzyme affects hypoxic regulation of the expression of E2F8, EPAS1, HOXC6, ATF3, TBX3, and FOXF1 genes in U87 glioma cells / O.H. Minchenko, **D.O. Tsymbal**, D.O. Minchenko, O.V. Kovalevska, L.L. Karbovskyi, A. Bikfalvi // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, N 2. – P. 76 – 87. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів та обробку даних).*

3. Експресія генів ATF3, FOXF1 та CENPU у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за умов дефіциту глутаміну і глюкози / **Д. Цимбал**, Д. Мінченко, І. Кривдюк, О. Мінченко // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2015. – Т. 1, № 69. – С. 32 – 36. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів ATF3 та FOXF1).*

4. Експресія генів NEK2, NEK4, EIF2AK1, PIM1 та MEST у клітинах гліоми лінії U87 за умов дефіциту глутаміну і глюкози в залежності від функції сигнального ензиму ERN1 / Т. Бакалець, **Д. Цимбал**, І. Кривдюк, Д. Мінченко // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Пробл. регул. фізіол. функцій. – 2015. – Т. 1, № 18. – С. 15 – 18. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії гена MEST).*

5. **Tsymbal D.O.** Overexpression of dominant-negative IRE1 in H1299-shE6AP cells increases HSE-dependent transcription / **D.O. Tsymbal**, O.H. Minchenko // Biotechnologia Acta. – 2015. – Vol. 8, N 6. – P. 9 – 15. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження та обробку даних, підготовлено матеріали до друку).*

6. Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation / **D.O. Tsymbal**, D.O. Minchenko, I.V. Kryvdiuk, O.O. Riabovol, O.V. Halkin, O.O. Ratushna, O.H. Minchenko // Фізіол. журн. – 2016. – Т. 62, № 1. – С. 3 – 15. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів E2F8, EPAS1, HOXC6, TBX3, TBX2, MAZ, SNAI2, TCF3 та TCF8).*

7. Hypoxic regulation of the expression of cell proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of IRE1 signaling enzyme / O.H. Minchenko, **D.O. Tsymbal**, D.O. Minchenko, O.O. Riabovol, O.O. Ratushna, L.L. Karbovskyi // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, N 1. – P. 11 – 21. *(Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів IL13RA2, KRT18, CD24, ING1, ING2 та MYL9).*

8. IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells / **D.O. Tsymbal**, D.O. Minchenko, O.O. Riabovol, O.O. Ratushna, O.H. Minchenko // Biotechnologia Acta.

– 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 26 – 37. (*Особистий внесок здобувача – проведено експериментальні дослідження із вивчення експресії генів IL13RA2, KRT18, CD24, ING1, ING2 та MYL9, підготовлено частину матеріалів до друку*).

9. Експресія генів *PERP*, *EPAS1*, *E2F8* і *ATF3* у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності ERN1 / **Д.О. Бова**, Д.О. Мінченко, Л.Л. Карбовський, О.Г. Мінченко // XI Український біохімічний конгрес, Київ, 6 – 10 жовтня 2014: матер. конгр. – Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, N 5 (Suppl. 1). – P. 93 – 94.

10. Цимбал Д.О. Вплив індукції стресу ендоплазматичного ретикулума в клітинах гліоми U87 з пригніченою ендорибонуклеазної активністю ERN1 на експресію транскрипційних факторів *E2F8*, *TBX3*, *EPAS1*, *ATF3*, *FOXF1* та *HOXC6* / **Д.О. Цимбал**, К.І. Кубайчук, О.Г. Мінченко // XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених Шевченківська весна 2015: Біологія, Київ, 1 – 3 квітня 2015: матер. конф. – Київ, 2015. – С. 92.

11. Цимбал Д. Вплив гіпоксії на експресію генів *HOXC6*, *TBX3* та *FOXF1* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функцією ERN1 / **Д. Цимбал**, О. Мінченко // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів Молодь і поступ біології (Львів, 20 – 23 квітня 2015): матер. конф. – Львів, 2015. – С. 77 – 78.

12. Inhibition of IRE1, a major signaling pathway of endoplasmic reticulum stress, affects the expression of proliferation related genes and suppresses glioma cell proliferation / О.Н. Minchenko, **D.O. Tsybmal**, D.O. Minchenko, I.V. Kryvdiuk, T. V. Bakalets // International Conference “Chromatin Regulation in Proliferation and Differentiation”, 2 – 4 September 2015: матер. конф. – Essen, Germany, 2015. – P. 50.

13. IRE1-залежний механізм репрограмування геному за умов злякисного росту / О.Г. Мінченко, **Д.О. Цимбал**, І.В. Кривдюк, А.П. Харькова, Д.О. Мінченко, Я.А. Гармаш, Т.В. Бакалець // 3-я Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 24 – 25 вересня 2015: матер. конф. – Дніпропетровськ, 2015. – P. 51 – 53.

14. Цимбал Д.О. Пригнічення IRE1 модифікує ефект дефіциту глюкози або глутаміну на експресію генів *CD24*, *ING1*, *ING2*, *KRT18*, *BET1* та *BET3* в клітинах гліоми лінії U87 / **Д.О. Цимбал** // XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна: біологія-2016”, 6 – 8 квітня 2016: матер. конф. – Київ, 2016. – С. 206 – 207.

15. Цимбал Д.О. Удосконалення кДНК-конструкцій для експресії домінант-негативної форми та цитоплазматичного домену ензиму IRE1 / **Д.О. Цимбал** // V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії», 12 – 13 травня 2016: матер. конф. – Київ, 2016. – С. 112 – 113.

16. Tsybmal D.O. IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway as an important factor of glioma growth / **D.O. Tsybmal**, O.O. Riabovol // Конференція-конкурс молодих учених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016”, 26 – 27 травня 2016: матер. конф. – Київ, 2016. – С. 58.

АНОТАЦІЯ

Цимбал Д.О. Роль сигнального ензиму IRE1 у регуляції експресії про- та анти-проліферативних генів 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 транскрипційних факторів, пухлинних супресорів, та факторів, що контролюють процеси проліферації пухлинних клітин, у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного та часткового пригнічення ензиматичних активностей IRE1, ключового ефектора стресу ендоплазматичного ретикулума (ЕР), а також за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну для виявлення можливої ролі цих генів в IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації клітин гліоми.

Вперше отримано дані про те, що експресія генів *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* та *MYRL2*, серед яких є про- та анти-проліферативні транскрипційні фактори, пухлинні супресори та онкогени, у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності IRE1. Зміни в експресії досліджуваних генів узгоджуються з даними літератури щодо пригнічення проліферації клітин гліоми за умов виключення IRE1 та можуть відігравати ключову роль у IRE1-залежному контролі проліферативних процесів. Проведені дослідження дозволяють встановити, що транскрипційні фактори *HOXC6* та *TBX2*, а також субодиниця A2 рецептора інтерлейкіну 13 є перспективними мішенями для досліджень у галузі пошуку нових препаратів для лікування гліом. Отримані результати розширюють уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі IRE1-опосередкованого контролю проліферації пухлинних клітин.

Ключові слова: експресія генів, гліома, стрес ендоплазматичного ретикулума, транскрипційні фактори, пухлинні супресори, IRE1, гіпоксія, дефіцит глутаміну, дефіцит глюкози.

АННОТАЦІЯ

Цымбал Д.А. Роль сигнального энзима IRE1 в регуляции экспрессии про- и анти-пролиферативных генов в клетках глиомы. – Рукопись.

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

Диссертационная работа посвящена исследованию экспрессии генов транскрипционных факторов, опухолевых супрессоров и факторов, контролирующих процессы пролиферации опухолевых клеток, в клетках глиомы линии U87 при условии полного или частичного подавления энзиматических активностей IRE1, ключевого эффектора стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР), а также при гипоксии, дефиците глюкозы или глутамина для выявления

возможной роли этих генов в IRE1-опосредованном угнетении пролиферации клеток глиомы.

Впервые получены данные о том, что экспрессия генов *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* и *MYRL2*, среди которых присутствуют про- и анти-пролиферативные транскрипционные факторы, опухолевые супрессоры и онкогены, в клетках глиомы линии U87 зависит от функциональной активности IRE1. Изменения в экспрессии исследуемых генов согласуются с данными литературы касательно угнетения пролиферации клеток глиомы при условии выключения IRE1 и могут играть ключевую роль в IRE1-зависимом контроле пролиферативных процессов. Проведенные исследования позволяют установить, что транскрипционные факторы *HOXC6* и *TBX2*, а также субединица A2 рецептора интерлейкина 13 являются перспективными мишенями для исследований в области поиска новых препаратов для лечения глиом. Полученные результаты расширяют представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе IRE1-опосредованного контроля пролиферации опухолевых клеток

Ключевые слова: экспрессия генов, глиома, стресс эндоплазматического ретикулума, транскрипционные факторы, опухолевые супрессоры, IRE1, гипоксия, дефицит глутамина, дефицит глюкозы.

SUMMARY

Tsymbal D. O. Role of signaling enzyme IRE1 in the regulation of expression of pro- and anti-proliferative genes in glioma cells. - Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of biological sciences, 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 was to investigate the expression of transcription factor and tumor suppressor genes, as well as of a number of genes implicated in control of cancer cells' proliferation, in U87 glioma cell line upon either complete or partial inhibition of enzymatic functions of IRE1, which is a key effector of an endoplasmic reticulum stress pathway. We also aimed to investigate the expression of the aforementioned genes in glioma cells under hypoxic conditions and upon either glucose or glutamine deprivation. The described experimental approach was aimed to identify the possible role of the studied genes in IRE1-mediated suppression of glioma cells' proliferation.

It was demonstrated that the expression levels of *HOXC6*, *ATF3*, *TBX3*, *TBX2*, *MAZ*, *SNAI2/SLUG*, *TCF3*, *TCF8*, *MYBL1*, *MYBL2*, *FOXF1*, *EPAS1*, *E2F8*, *MEST*, *CD24*, *KRT18*, *ING1*, *ING2*, *IL13RA2* and *MYRL2* genes (including pro- and anti-proliferative transcription factors, tumor suppressors and oncogenes) in U87 glioma cells depend on the functional activity of IRE1. Changes in the expression of studied genes fall in line with previously published data about suppressed proliferation of glioma cells with IRE1 knockdown. Detected changes in gene expression may play a key role in IRE1-dependent control of cells' proliferation. In particular, we observed that upon IRE1 inhibition the

expression levels of tumor suppressors KRT18, ING1, ING2, MYL9 and MEST were up-regulated. At the same time the expression levels of transcription factors with known pro-proliferative functions in tumor cells, such as E2F8, EPAS1, HOXC6, TBX2 and ATF3, were significantly down-regulated in glioma cells with IRE1 knockdown. Increased expression of tumor suppressors and decreased expression of pro-proliferative transcription factors may reflect one of the mechanisms of IRE1-mediated inhibition of glioma growth.

It was shown, that the expression of the majority of the studied genes depends on both kinase and RNase activities of IRE1. Moreover, the effects of complete (both kinase and RNase) and partial (RNase only) inhibition of IRE1 on the expression of studied genes can be different not only by magnitude, but also by direction of changes. The latter suggests that kinase and RNase enzymatic activities of IRE1 have at least partially independent roles with regard to control of gene expression. Obtained data must be taken into account when new pharmacological inhibitors of IRE1 are being developed as potential antio-cancer drugs.

It was demonstrated that such factors as hypoxia, glucose and glutamine deprivation modify the expression of most studied genes in glioma cells. Moreover, the effect of hypoxia and nutrient deprivation on the expression of studied genes depends on the activity of IRE1 bifunctional enzyme.

Obtained data let us conclude, that transcription factors HOXC6 and TBX2, as well as subunit A2 of interleukin 13 receptor are promising targets for further research in field of development of new chemotherapeutic agents for glioma treatment. Obtained results broaden our understanding of molecular mechanisms, which constitute the basis of IRE1-mediated control of cancer cells' proliferation.

Keywords: gene expression, glioma, endoplasmic reticulum stress, angiogenesis, pro-angiogenic and anti-angiogenic genes, ERN1, hypoxia, ischemia.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF3 – (activating transcription factor 3), активуючий транскрипційний фактор 3;
CD24 – (CD24 antigen), антиген CD24;
E2F8 – транскрипційний фактор 8 групи E2F;
EPAS1 – (endothelial PAS domain protein 1), ендотеліальний PAS домен протеїн 1;
FOXF1 – forkhead box F1;
HOXC6 – (homeobox C6), гомеобокс C6;
HSE – (heat shock response element), елемент відповіді на тепловий шок.
IL13RA2 – (interleukin 13 receptor subunit Alpha 2), субодиниця альфа 2 рецептора інтерлейкіну 13;
ING1 – (inhibitor of growth 1), інгібітор росту 1;
ING2 – (inhibitor of growth 2), інгібітор росту 2;
IRE1/ERN1 – (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), ензим, залежний від інозитулу 1 / сигналінг від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1;
KRT18 – (cytokeratin 18), цитокератин 18;

MAZ – (Myc-associated zinc finger protein), Мус-асоційований протеїн типу цинковий палець;
MEST – (mesoderm specific transcript), транскрипт, специфічний до мезодерми;
MYBL1 – (Myb-like protein 1), Myb-подібний протеїн 1;
MYBL2 – (Myb-like protein 2), Myb-подібний протеїн 1;
MYL9/MYRL2 – (myosin light chain 9/ myosin regulatory light chain 2), легкий ланцюг міозину 9, регуляторний легкий ланцюг міозину 2;
SNAI2/SLUG – (snail family zinc finger 2/neural crest transcription factor SLUG, Snail homolog 2), гомолог Snail 2;
TBX2 – (T-box protein 2), протеїн Т-бокс 2;
TBX3 – (T-box protein 3), протеїн Т-бокс 3;
TCF3 – (transcription factor 3), транскрипційний фактор 3;
TCF8 – (transcription factor 8), транскрипційний фактор 8;