

АНОТАЦІЯ

Xima O.O. Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Актуальним напрямком сучасних наукових досліджень в області онкології є з'ясування біохімічних та молекулярних механізмів злоякісного росту, зокрема на рівні експресії генів. Найбільш злоякісними пухлинами головного мозку є гліоми, що характеризуються високоагресивною поведінкою, та важко піддаються терапії. Краще розуміння механізмів, що лежать в основі патогенезу цих пухлин, є дуже важливим для вдосконалення існуючих та створення нових перспективних стратегій анти-пухлинної терапії.

Клітинам злоякісних пухлин, у тому числі і гліомним, властиве тотальне репрограмування метаболізму, що дозволяє забезпечити високі біосинтетичні потреби, швидку проліферацію і адаптацію до жорстких умов мікрооточення. Відомо, що виживання та проліферація пухлинних клітин залежить від інтегральної взаємодії численних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, ремоделювання клітинного метаболізму і функціонального стану мітохондрій, а також впливу факторів мікрооточення. Важливими модуляторами пухлинного росту є стрес ендоплазматичного ретикулума (ER) та гіпоксія, що виступають ключовими індукторами ангіогенезу та забезпечують стійкість до апоптозу і таким чином сприяють проліферації та виживанню пухлинних клітин навіть в екстремальних умовах мікрооточення.

Існування тісного взаємозв'язку між виживанням пухлинних клітин та хронічною активацією стресу ER, а також зниження проліферації клітин гліоми за умови пригнічення IRE1-опосередкованого сигнального шляху, свідчить про

важливість та необхідність кращого розуміння механізмів, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми.

Мітохондрії виступають центральною ланкою багатьох метаболічних та сигнальних шляхів, що зазнають ремоделювання в пухлинах та є вирішальними для виживання або загибелі клітини. Порушення функціонування цих органел тісно пов'язані з онкотрансформацією, тому не дивно, що мітохондрії на сьогоднішній день розглядаються в якості фармакологічних мішеней для протипухлинної терапії.

Функціональна активність мітохондрій перебуває під контролем численних протеїнів, що кодуються ядром, причому більшість із цих факторів та ензимів є полі-функціональними і відіграють важливу роль у контролі проліферації та апоптозу як у мітохондріях, так і поза ними. Більше того, численні гени протеїнів мітохондріону є мішенями IRE1-залежного транскрипційного репрограмування, що вказує на можливу участь мітохондрій у відповіді на стрес ER.

Саме тому, вивчення ролі сигнального ензиму IRE1, що запускає найбільш консервативний шлях стресу ER, в регулюванні експресії генів ключових протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми є надзвичайно актуальним напрямком сьогодення. Дослідження експресії цих генів за умов пригнічення IRE1, а також в залежності від гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну, необхідне для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії цих генів та їх ролі у злоякісному рості, що може бути корисним для подальших досліджень у напрямку пошуку нових підходів протипухлинної терапії.

Метою дисертаційної роботи було дослідження експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умови пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 для з'ясування можливої ролі цих генів у пригніченні проліферації клітин гліоми через IRE1-залежний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума в залежності від гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози. Для досягнення поставленої мети було необхідно виконати наступні задачі: 1) визначити рівень експресії генів ензимів трикарбонного циклу мітохондрій у клітинах гліоми лінії U87 із

повним пригніченням ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1; 2) вивчити рівень експресії ядерних генів факторів, що контролюють процеси транскрипції, трансляції та біоенергетику в мітохондріях, у клітинах гліоми з пригніченим IRE1; 3) визначити рівень експресії генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси апоптозу, у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сигнального ензиму IRE1; 4) вивчити рівень експресії ядерних генів різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності IRE1, а також за умови індукованого тунікамідіном стресу ендоплазматичного ретикулума в цих клітинах; 5) дослідити вплив гіпоксії на рівень експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1; 6) визначити рівень експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за дефіциту глюкози або глутаміну залежно від функції сигнального ензиму IRE1.

Дослідження рівня експресії мРНК функціонально різних протеїнів мітохондріону здійснювали у клітинах гліоми лінії U87 з повним або частковим пригніченням функціональної активності ензиму IRE1 методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Вперше було показано, що пригнічення функціональної активності сигнального ензиму IRE1 призводить до істотного зниження експресії генів ключових ензимів циклу трикарбонових кислот та факторів, які регулюють функцію геному мітохондрій і біоенергетику цих органел, в той час як експресія генів *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* і *FAM162A*, навпаки, зростає у клітинах гліоми.

Виявлено різні механізми стрес-залежної регуляції експресії генів протеїнів мітохондріону, що можуть опосередковуватись як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активностями IRE1, а у випадку генів *GOT2*, *NNT*, *FAM162A* і *TRADD* – обома ензиматичними активностями IRE1. Методом біоінформаційного аналізу в промоторних послідовностях більшості досліджених генів було ідентифіковано специфічні регуляторні послідовності

CCACG/CGTGG, що розпізнаються транскрипційним фактором XBP1. Такі результати вказують на можливу роль фактору XBP1 у транскрипційній регуляції експресії цих генів. Більше того, у 3'-кінцевій нетранслюємій ділянці мРНК *ME2*, *POLG*, *TSMF*, *TRADD* та *ATG7* було знайдено сайти зв'язування із мікроРНК miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588. Оскільки у клітинах гліоми з пригніченням IRE1 зниження експресії генів *ME2*, *POLG*, *TSMF*, *TRADD* та *ATG7* супроводжувалося одночасним посиленням експресії miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588, можна стверджувати про можливість регуляції експресії цих генів і на пост-транскрипційному рівні.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором росту пухлин. Крім того, методом біоінформаційного аналізу було виявлено регуляторні елементи, що розпізнаються транскрипційним фактором HIF, ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, у промоторних ділянках більшості ядерних генів протеїнів мітохондріону, причому частина таких сайтів одночасно містила у своїй структурі сайти зв'язування із фактором XBP1. Отримані результати розкривають можливі механізми залежності гіпоксичної регуляції від функціональної активності IRE1, а також демонструють механізм комплексної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами.

Показано, що блокада активності IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 модифікувала вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію більшості досліджених генів, а це свідчить про IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму клітин і лежить в основі пригнічення проліферації пухлинних клітин, опосередкованому активністю IRE1.

Виявлено диференційний характер змін експресії ядерних генів, які кодують локалізовані у мітохондріях фактори та ензими, у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1, що переконливо свідчить про функціональне репрограмування мітохондрій, за якого спостерігається зниження процесів

транскрипції, трансляції та циклу трикарбонових кислот з одночасною активацією різноманітних шляхів апоптозу та пригніченням активності онкогенів.

Отримані в цій роботі результати розкривають молекулярні механізми пригнічення росту гліом, опосередкованого інгібуванням IRE1, та можуть бути використані для пошуку нових перспективних протипухлинних препаратів.

Ключові слова: гліома, експресія генів, пригнічення IRE1, стрес ендоплазматичного ретикулума, протеїни мітохондрій, репрограмування мітохондрій, гіпоксія, дефіцит глюкози, дефіцит глутаміну.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3, Issue 1. – P. 1 – 15.. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена *TRADD*, обробка даних та участь у написанні статті). **Web of Science**
2. Hypoxic regulation of the expressions of proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of IRE1 signaling / Minchenko O. H., Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 1. – P. 11 – 21. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *ENDOG*, *POLG*, *MTIF* і *TSMF*, обробка даних та участь в оформленні статті). **Scopus i PubMed**
3. IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells / Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 26 – 37. (Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів *ENDOG*, *POLG*, *MTIF* та *TSMF*, обробка даних та участь в оформленні статті).
4. IRE-1 α regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V., Ratushna O. O., Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3. – P. 50 – 62. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена *ATG7*, обробка даних). **Web of Science**
5. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Danilovskyi S. V., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 2. – P. 25 – 34. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена *AIFM1*, обробка даних). **Scopus i PubMed**

6. Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 3. – P. 54 – 65. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

7. IRE1 knockdown modifies the glutamine and glucose deprivation effect on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 37 – 47. (*Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробку даних та оформлення статті*).

8. Inhibition of IRE1 affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2016. – Vol. 50, Issue 3. – P. 127 – 136. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

9. Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2017. Vol. 51, Issue 1. – P. 8 – 19. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена FAM162A, обробка даних і участь у написанні статті*). **Scopus i PubMed**

10. ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and LONP1 genes expression in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V., Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, № 2. – P. 55 – 69. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

11. Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation / Halkin O. V., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Telychko V. V., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Ukr. Biochem.

J. – 2017. – Vol. 89, №5. – P. 52 – 61. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена ATG7, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

12. IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells / Halkin O. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Kuznetsova A. Y., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // *Biotechnologia Acta*. – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 34 – 43. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1 та обробка даних*).

13. Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Lebid-Biletska K. M., Sliusar M. Y., Rudnytska O. V., Minchenko O. H. // *Endocr. Regul.* – 2019. Vol. 53, Issue 4. – P. 237-249. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT за умов дефіциту глюкози та обробка даних*).

14. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, № 4. – P.116.

15. Гіпоксична регуляція експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // «Шевченківська весна: Біологія – 2016». Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених КНУ ім. Тараса Шевченка. – Київ. – 2016. – С. 172-173.

16. IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway as an important factor of glioma growth / Tsymbal D. O., **Riabovol O. O.** // *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, №5. – P. 123.

17. Endoplasmic reticulum stress as a key factor of genome reprogramming in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Luzina O. Y., Minchenko O. H. // International VACTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases. Karolinska Institutet, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), January 16-17, 2017, Stockholm, Sweden. – P. 5.

18. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози / **Рябовол О. О.**, Ратушна О. О., Мінченко О. Г. // “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances”. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. – Київ, Україна – Паливода А.В.– 2017. – С. 77-78.

19. IRE1 mediated regulation of the expression of a subset of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Joint Meeting 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June 2017, Kyiv – Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, № 4. – P. 89.

20. Inhibition of IRE1 signaling affects the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related proteins in U87 glioma cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // Materials of a mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” held on May 11, 2017 during the VACTRAIN summer school in Kyiv, Ukraine – Exp Oncol. – 2017. – Vol. 39, № 2. – P. 7.

21. Involvement of ubiquitin specific peptidases as well as IGFBP4, STC2, and GSA7/ATG7 proteins in IRE1 mediated control of glioma cell proliferation / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, From Conceptual Knowledge to Clinical Applications, 18-24 June 2017, Figueira da Foz, Portugal – Book of Abstracts. Figueira da Foz, Portugal. – 2017. – P. 67.

22. Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань / Мінченко О. Г., Ратушна О. О., **Рябовол О. О.**, Мінченко Д. О., Лузіна О. Я. // IV Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017: Збірник тез. – Дніпро. – 2017. – С. 70-72.

23. Inhibition of IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress signalling reprograms gene expressions in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // IUBMB SEOUL 2018, Young Scientist Program, June 2-4, Yonsei University, Seoul, Korea. Book of abstracts. – Seoul. – 2018. P. 19. 006.

24. IRE1 knockdown leads to suppression of glioblastoma growth / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.** // FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 144.

25. Metabolic reprogramming of mitochondria in IRE1 knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 145.

26. **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. Mitochondrion as an important component of integral reprogramming cancer cells metabolism and surviving. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 80.

27. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 81.

28. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019.

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J. – 2019. – V. 91, N 2. – P. 86.

29. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Lebid-Biletska K.M., Minchenko D.O. Molecular mechanisms of dependence of hypoxic regulation on endoplasmic reticulum stress. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 134.