

## АНОТАЦІЯ

*Рудницька О.В.* Вплив карбонових наночастинок на експресію генів, які контролюють проліферацію, у клітинах людини та тварин. – 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, 2023.

Дисертація присвячена дослідженню механізмів дії малих доз карбонових наночастинок, а саме, одностінних карбонових нанотрубок (SWCNTs) і оксиду графену, на експресію ключових генів, які регулюють проліферацію та виживання клітин, і мікроРНК у нормальних астроцитах лінії NHA/TS і клітинах гліобластоми лінії U87MG для з'ясування ролі стресу ендоплазматичного ретикулула у механізмах їхньої дії.

Актуальність даної теми пов'язана з бурхливим розвитком нанотехнологій, які знаходять все ширше застосування у різних сферах, зокрема, біомедичній. Їх активно розглядають для впровадження в діагностику та лікування різноманітних захворювань, зокрема онкологічних. Серед найбільш перспективних виділяють наночастинок на основі карбону, зокрема, завдяки великій різноманітності їх структури та високій стабільності. Проте поряд з великою кількістю позитивних ефектів відмічаються також і негативні ефекти від їх використання, при цьому механізми їхньої дії залишаються ще не достатньо з'ясованими. Це є особливо важливим, оскільки користь від застосування карбонових наночастинок для лікування злоякісних новоутворень повинна бути більша, ніж потенційна шкода, яка може бути завдана здоровим клітинам.

Одним з найбільш можливих механізмів впливу карбонових наночастинок на клітини людини розглядають стрес ендоплазматичного ретикулула (ER). Він відіграє важливу роль у підтриманні життєдіяльності клітини шляхом перебудови внутрішньоклітинних процесів направлених на

виживання клітини, а у випадку довготривалих негативних ефектів призводить до запуску програми загибелі клітини.

Важливим завданням роботи було порівняти чутливість нормальних астроцитів людини і клітин гліобластоми до дії карбонових нанотрубок на експресію генів, враховуючи їх використання у біомедицині. Крім того, для дослідження можливого впливу карбонових наночастинок на розвиток нервової системи, оскільки однією із функцій астроцитів є регуляція процесів нейрогенезу, були здійснені експерименти на ембріонах *Danio rerio*, препарати РНК з яких були досліджені на наявність змін в експресії мікроРНК. Ці дані сприятимуть кращому розумінню механізмів розвитку різноманітних ускладнень за умов використання цих наночастинок як терапевтичних чи діагностичних агентів, зокрема, при онкотерапії.

В ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології: культивування клітин, виділення РНК, визначення спектральних характеристик РНК нано-спектрофотометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Для з'ясування впливу одностінних карбонових нанотрубок на нормальні астроцити людини на молекулярно-генетичному рівні, нами було досліджено експресію поліфункціональних генів, що кодують протеїн 3 раку грудної (молочної) залози стійкий до антиестрогену (BCAR3), карбоангідразу 9 (CA9), кластерин (CLU), член В9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (DNAJB9), протеїн 5, що зв'язує жирні кислоти (FABP5), інгібітор альфа-субодиниці фактора 1, що індукується гіпоксією (HIF1AN), головний комплекс гітосумісності класу I G (HLA-G), член 9 родини А малих протеїнів теплового шоку (HSPA9), ізоцитрат дегідрогеназу 2 (IDH2), протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGFBP3), протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGFBP6), протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB (MYBL1), протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB (MYBL2), пептидилгліцин альфа-

амідууючу монооксигеназу (PAM) та член 8 родини 6 розчинних транспортерів (SLC6A8), що контролюють проліферацію і виживання, у цих клітинах за дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок (2 і 8 мкг/мл). Більше того, деякі з цих генів тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума та розвитком канцерогенезу, що також є надзвичайно важливим з погляду дослідження генотоксичності впливу карбонових наночастинок на нормальні астроцити.

З метою вивчення молекулярних механізмів дії оксиду графену на нормальні астроцити людини лінії NHA/TS і з'ясування його негативних ефектів нами були проведені дослідження впливу цих карбонових наночастинок на рівень експресії ключових генів, які кодують важливі регуляторні протеїни та ензими, що пов'язані з контролем метаболізму і проліферацією клітин. Головна увага була зосереджена на таких генах як *BCAR3* (протеїн 3 раку грудної залози, стійкий до антиестрогену), *BRCA1* (протеїн, чутливий до 1-го типу раку молочної залози), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *IGFBP6* (протеїн 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), *MYBL1* (протеїн 1, подібний до протоонкогена MYB), *MYBL2* (протеїн 2, подібний до протоонкогена MYB), *NAMPT* (нікотинамід фосфорибозилтрансфераза) та *TSPAN13* (тетраспанін 13).

У зв'язку з тим, що зміна в експресії мікроРНК може впливати на пост-транскрипційну регуляцію рівня експресії тих мРНК, які мають відповідні сайти зв'язування з мікроРНК, нами були також проведені дослідження по з'ясуванню впливу SWCNTs на рівень експресії низки мікроРНК. У 3'-последовностях деяких із досліджених нами мРНК були виявлені сайти зв'язування з miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-144-3p, miR-145-5p та miR-182-5p і визначений рівень їхньої експресії у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за дії карбонових наночастинок. Крім того, були проведені дослідження впливу оксиду графену на рівень експресії мікроРНК miR-96a-5p та miR-145-5p, які мали специфічні сайти зв'язування з мРНК NAMPT і TSPAN13.

Оскільки мікроРНК відіграють важливу роль у цереброваскулярному розвитку, для з'ясування впливу карбонових наночастинок на розвиток тканини

головного мозку нами було здійснено дослідження впливу малих доз SWCNTs на рівень експресії мікроРНК miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p і miR-206-5p, які пов'язані з регулюванням метаболізму, проліферацією клітин та нейрогенезом, в ембріонах *Danio rerio*.

Оскільки численні дослідження свідчать про можливість залучення сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула до реалізації токсичної дії наночастинок, нами були проведені дослідження на клітинах гліобластоми з нативним і пригніченим ERN1 сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулула. Для цього було обрано декілька генів, які кодують ключові регуляторні протеїни, пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула, такі як протеїн чутливий до 1-го типу раку молочної залози (BRCA1), кластерин (CLU) і член B9 родини протеїнів теплового шоку DnaJ (DNAJB9), з метою з'ясування ролі стресу ендоплазматичного ретикулула в механізмі дії карбонових нанотрубок, а також порівняння чутливості експресії цих генів до дії малих доз цих наночастинок у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS та у двох сублініях клітин гліобластоми U87: з нативним ERN1 сигнальним шляхом (трансфікованих вектором) і з пригніченим домінант-негативною конструкцією ERN1.

Новизною роботи є результати стосовно того, що одностінні карбонові нанотрубки і оксид графену мають виражений вплив на експресію низки важливих регуляторних генів, продукти яких приймають участь у контролі проліферації та виживання клітин, у нормальних астроцитах людини. Так, результати дослідження впливу карбонових наночастинок на нормальні астроцити людини вперше показали наявність геноспецифічного характеру дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок і оксиду графену на експресію генів, пов'язаних з регуляцією проліферації та виживання клітин, у нормальних астроцитах лінії NHA/TS, причому вплив оксиду графену був більш вираженим, у порівнянні з SWCNTs. Ці гени є поліфункціональними і пов'язані не лише з регуляцією проліферації та виживання клітин, а також з контролем різноманітних клітинних процесів, зокрема імунної відповіді. Слід зазначити, що зміни рівня експресії цих генів асоційовані з розвитком канцерогенезу, оскільки

пригнічення експресії більшості із цих генів сприяє зниженню проліферації, інвазії та метастазування.

Встановлено, що за дії малих доз цих карбонових наночастинок суттєво змінюється рівень експресії мікроРНК, які мають специфічні сайти зв'язування з деякими із досліджених нами мРНК, а це свідчить про наявність і пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії цих генів поліфункціональних протеїнів, які тісно пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, проліферацією і виживанням клітин, а також канцерогенезом.

Такі зміни в експресії мікроРНК та мРНК саме у нормальних астроцитах людини можуть стати передумовою для розвитку змін у нервовій тканині. Виявлені нами порушення в експресії мікроРНК у ембріонах *Danio rerio* за дії різних концентрацій карбонових нанотрубок добре узгоджуються з появою в них нейротоксичних ефектів, які проявляються на ранніх стадіях ембріонального розвитку центральної нервової системи і були дозозалежними.

Вперше показано, що нормальні астроцити на рівні експресії генів є більш чутливими до дії одностінних карбонових нанотрубок порівняно з клітинами гліобластоми. Так, під впливом одностінних карбонових нанотрубок рівень експресії генів *BRCA1* та *DNAJB9* змінюється у нормальних астроцитах більш виражено порівняно з клітинами гліобластоми лінії U87MG, а пригнічення ERN1 сигнального шляху ER стресу у клітинах гліобластоми майже повністю інгібує дію наночастинок на експресію цих генів. Знижена чутливість клітин гліобластоми до дії одностінних карбонових нанотрубок може бути обумовлена індукованою стресом ендоплазматичного ретикулума резистентністю пухлинних клітин. Таким чином, стрес ендоплазматичного ретикулума відіграє важливу роль у модулюванні SWCNTs на експресію генів.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні більш високої чутливості нормальних астроцитів порівняно з клітинами гліобластоми до дії одностінних карбонових нанотрубок на рівень експресії генів. Цей факт може бути використаним як важливе попередження до застосування карбонових наночастинок у медико-біологічних цілях, у тому числі при діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань. Встановлені ефекти карбонових

наночастинок на рівень експресії ключових регуляторних генів є підґрунтям для виявлення генетичних маркерів метаболічних порушень, що є вкрай важливим для ранньої діагностики розвитку вад головного мозку, лікування яких пов'язане з різними побічними ефектами, що становлять серйозні ризики для здоров'я та життя пацієнтів.

Отримані результати доводять важливість вивчення молекулярних механізмів дії карбонових наночастинок при оцінці біобезпеки їхнього застосування для різних біомедичних цілей, оскільки за дії одностінних карбонових нанотрубок і оксиду графену порушується експресія важливих регуляторних генів у результаті перепрограмування геному за участі стресу ендоплазматичного ретикулула. Виявлені порушення експресії мРНК і мікроРНК, які відповідають за регуляцію проліферації та виживання клітин, розглядаються як можливі молекулярні механізми розвитку різноманітних патологічних станів і можуть бути корисними для оцінки токсичних впливів наночастинок.

**Ключові слова:** карбонові наночастинки, ядро, експресія генів, РНК, BRCA1, DNAJB9, АСТВ, кПЛР, стрес ендоплазматичного ретикулула, нормальні астроцити людини, пухлинні клітини, гліобластома.

## ANNOTATION

*Rudnytska O.V.* The impact of carbon nanoparticles on the expression of proliferation-related genes in human and animal cells.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 "Biology" – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the mechanisms of action of low doses of carbon nanoparticles, namely, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and graphene oxide, on the expression of key genes that regulate cell proliferation and survival, and miRNAs in normal astrocytes of the NHA/TS line and glioblastoma cells

of the U87MG line for elucidation of the role of endoplasmic reticulum stress in the mechanisms of their action.

The dissertation is devoted to the study of the mechanisms of action of low doses of carbon nanoparticles, namely, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and graphene oxide, on the expression of key genes that regulate cell proliferation and survival, and miRNAs in normal astrocytes of the NHA/TS line and glioblastoma cells of the U87MG line for elucidation of the role of endoplasmic reticulum stress in the mechanisms of their action.

The relevance of this topic is related to the rapid development of nanotechnologies, which are increasingly used in various fields, in particular, biomedical. They are being actively considered for use in the diagnosis and treatment of various diseases, including oncology. Nanoparticles based on carbon are among the most promising, in particular, due to the wide variety of their structure and high stability. However, along with a large number of positive effects, there are also negative effects from their use, while the mechanisms of their action remain not yet sufficiently elucidated. This is particularly important because the benefit of using carbon nanoparticles for the treatment of malignant neoplasms should be greater than the potential harm that can be caused to healthy cells.

Endoplasmic reticulum (ER) stress is considered one of the most possible mechanisms of carbon nanoparticle impact on human cells. It plays an important role in maintaining cell vitality by restructuring intracellular processes aimed at cell survival, and in the case of long-term negative effects, it leads to the launch of the cell death program.

An important task of the work was to compare the sensitivity of normal human astrocytes and glioblastoma cells to the effect of carbon nanotubes on gene expression, taking into account their use in biomedicine. In addition, to investigate the possible influence of carbon nanoparticles on the development of the nervous system, since one of the functions of astrocytes is the regulation of neurogenesis processes, experiments were carried out on *Danio rerio* embryos, RNA preparations from which were examined for the presence of changes in miRNA expression. These data will contribute to a better understanding of the mechanisms of the development of various

complications under the conditions of using these nanoparticles as therapeutic or diagnostic agents, in particular, in oncology therapy.

In the course of the work, modern methods of biochemistry and molecular biology were used: cell cultivation, RNA isolation, determination of the spectral characteristics of RNA by the nano-spectrophotometric method, synthesis of complementary DNA using reverse transcription, methods of quantitative polymerase chain reaction in real-time, electrophoretic analysis of nucleic acids, methods of bioinformatics and statistical processing of results.

To find out the effect of single-walled carbon nanotubes on normal human astrocytes at the molecular genetic level, we studied the expression of multifunctional genes encoding anti-estrogen-resistant breast cancer protein 3 (BCAR3), carbonic anhydrase 9 (CA9), clusterin (CLU), heat shock protein family member B9 DnaJ (DNAJB9), fatty acid binding protein 5 (FABP5), inhibitor of hypoxia-inducible factor 1 alpha subunit (HIF1AN), major histocompatibility complex, class I, G (HLA-G), small heat shock protein family A member 9 (HSPA9), isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP6), MYB proto-oncogene-like protein 1 (MYBL1), MYB proto-oncogene-like protein 2 (MYBL2), peptidylglycine alpha amidating monooxygenase (PAM), and soluble transporter family 6 member 8 (SLC6A8), which control proliferation and survival, in these cells under the action of small doses of single-walled carbon nanotubes (2 and 8  $\mu\text{g/ml}$ ). Moreover, some of these genes are closely related to the stress of the endoplasmic reticulum and the development of carcinogenesis, which is also extremely important from the point of view of studying the genotoxicity of carbon nanoparticle effects on normal astrocytes.

To study the molecular mechanisms of the action of graphene oxide on normal human astrocytes of the NHA/TS line and to clarify its negative effects, we conducted studies of the effect of these carbon nanoparticles on the expression level of key genes that encode important regulatory proteins and enzymes associated with control of metabolism and cell proliferation. The focus was on genes such as BCAR3 (breast cancer antiestrogen resistant protein 3), BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein), IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3), IGFBP6 (insulin-like



growth factor-binding protein 6), MYBL1 (MYB proto-oncogene-like protein 1), MYBL2 (MYB proto-oncogene-like protein 2), NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) and TSPAN13 (tetraspanin 13).

Because a change in miRNA expression can affect the post-transcriptional regulation of the expression level of those mRNAs that have the corresponding miRNA binding sites, we also conducted studies to find out the effect of SWCNTs on the expression level of several miRNAs. Binding sites with miR-19a-3p, miR-27a-3p, miR-144-3p, miR-145-5p and miR-182-5p were detected in the 3'-sequences of some of the mRNAs we studied, and their expression level was determined in normal human astrocytes of the NHA/TS line under the influence of carbon nanoparticles. In addition, studies of the effect of graphene oxide on the expression level of miR-96a-5p and miR-145-5p microRNAs, which had specific binding sites with NAMPT and TSPAN13 mRNA, were conducted.

Since microRNAs play an important role in cerebrovascular development, to find out the effect of carbon nanoparticles on the development of brain tissue, we conducted a study of the effect of small doses of SWCNTs on the expression level of microRNAs miR-143-3p, miR-145-5p, miR-182-5p and miR-206-5p, which are associated with regulation of metabolism, cell proliferation and neurogenesis, in *Danio rerio* embryos.

Since numerous studies indicate the possibility of involvement of endoplasmic reticulum stress signaling pathways in the implementation of the toxic effect of nanoparticles, we conducted studies on glioblastoma cells with native and suppressed ERN1 signaling pathways of endoplasmic reticulum stress. To this end, several genes encoding key regulatory proteins associated with endoplasmic reticulum stress, such as breast cancer-sensitive protein type 1 (BRCA1), clusterin (CLU), and member B9 of the heat shock protein family DnaJ (DNAJB9), to clarify the role of endoplasmic reticulum stress in the mechanism of action of carbon nanotubes, as well as to compare the sensitivity of the expression of these genes to the action of small doses of these nanoparticles in normal human astrocytes of the NHA/TS line and in two sublines of glioblastoma cells U87: with native ERN1 signaling pathway (transfected with a vector) and with a suppressed dominant-negative ERN1 construct.

The novelty of the work is the results that single-walled carbon nanotubes and graphene oxide have a pronounced effect on the expression of several important regulatory genes, the products of which are involved in the control of cell proliferation and survival, in normal human astrocytes. Thus, the results of the study of the effect of carbon nanoparticles on normal human astrocytes showed for the first time the presence of a gene-specific effect of small doses of single-walled carbon nanotubes and graphene oxide on the expression of genes related to the regulation of cell proliferation and survival in normal astrocytes of the NHA/TS line, and the effect of oxide of graphene was more pronounced compared to SWCNTs. These genes are polyfunctional and related not only to the regulation of cell proliferation and survival but also to the control of various cellular processes, including the immune response. It should be noted that changes in the level of expression of these genes are associated with the development of carcinogenesis since suppression of the expression of most of these genes contributes to the reduction of proliferation, invasion and metastasis.

It was found that under the action of small doses of these carbon nanoparticles, the expression level of microRNAs, which have specific binding sites with some of the mRNAs we have studied, significantly changes, and this indicates the presence of post-transcriptional mechanisms of regulation of the expression of these genes of polyfunctional proteins, which are closely related associated with endoplasmic reticulum stress, cell proliferation and survival, as well as carcinogenesis.

Such changes in miRNA and mRNA expression in normal human astrocytes can become a prerequisite for the development of changes in nervous tissue. We detected violations in the expression of miRNA in *Danio rerio* embryos under the influence of different concentrations of carbon nanotubes are well consistent with the appearance of neurotoxic effects in them, which are manifested in the early stages of embryonic development of the central nervous system and were dose-dependent.

For the first time, it was shown that normal astrocytes are more sensitive to the action of single-walled carbon nanotubes compared to glioblastoma cells at the level of gene expression. Thus, under the influence of single-walled carbon nanotubes, the expression level of BRCA1 and DNAJB9 genes changes in normal astrocytes more pronounced compared to glioblastoma cells of the U87MG line, and inhibition of

ERN1 of the ER stress-signaling pathway in glioblastoma cells almost completely inhibits the effect of nanoparticles on the expression of these genes. Reduced sensitivity of glioblastoma cells to single-walled carbon nanotubes may be due to endoplasmic reticulum stress-induced resistance of tumor cells. Thus, endoplasmic reticulum stress plays an important role in the modulation of gene expression by SWCNTs.

The practical significance of the obtained results lies in the detection of a higher sensitivity of normal astrocytes compared to glioblastoma cells to the effect of single-walled carbon nanotubes on the level of gene expression. This fact can be used as an important warning before the use of carbon nanoparticles for medical and biological purposes, including in the diagnosis and treatment of oncological diseases. The established effects of carbon nanoparticles on the expression level of key regulatory genes are the basis for the detection of genetic markers of metabolic disorders, which is extremely important for the early diagnosis of the development of brain defects, the treatment of which is associated with various side effects that pose serious risks to health and patients' lives.

The obtained results prove the importance of studying the molecular mechanisms of action of carbon nanoparticles in assessing the biosafety of their use for various biomedical purposes, since under the action of single-walled carbon nanotubes and graphene oxide, the expression of important regulatory genes is disrupted as a result of genome reprogramming with the participation of endoplasmic reticulum stress. Identified abnormalities in the expression of mRNA and miRNA, which are responsible for the regulation of cell proliferation and survival, are considered possible molecular mechanisms for the development of various pathological conditions and may be useful for assessing the toxic effects of nanoparticles.

**Keywords:** carbon nanoparticles, nucleus, gene expression, RNA, BRCA1, DNAJB9, ACTB, PCR, endoplasmic reticulum stress, normal human astrocytes, tumor cells, glioblastoma.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз та експериментальні дані, спрямовані на вирішення актуальної наукової проблеми щодо впливу карбонових наночастинок, зокрема, одностінних карбонових нанотрубок та оксиду графену, на експресію ключових регуляторних генів у нормальних астроцитах людини та клітинах гліобластоми, а також в ембріонах *Danio rerio*. Встановлено, що нормальні астроцити людини є більш чутливими до дії карбонових нанотрубок порівняно з клітинами гліобластоми. Отримані результати розкривають механізми дії карбонових наночастинок на нормальні астроцити і клітини гліоми та вказують на потенційні ризики за умови їхнього використання у біомедичних цілях.

1. Встановлено, що під впливом малих доз одностінних карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини підвищується рівень експресії генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума та знижується рівень експресії генів, які задіяні у регуляції проліферації і виживання клітин.
2. Виявлено, що за дії малих доз карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини змінюється рівень експресії мікроРНК, задіяних у регуляції проліферації клітин.
3. Показано, що в ембріонах *Danio rerio* одностінні карбонові нанотрубки викликають зниження рівня експресії мікроРНК, які відіграють важливу роль у контролі проліферації клітин, різних метаболічних процесів та нейрогенезу.
4. З'ясовано, що малі дози оксиду графену порушують експресію багатьох регуляторних генів у нормальних астроцитах людини.
5. Виявлена більша чутливість експресії генів *BRCA1* і *DNAJB9*, які пов'язані зі підтриманням геномної цілісності та стресом ендоплазматичного ретикулума, до дії малих доз одностінних карбонових нанотрубок у нормальних астроцитах людини у порівнянні з клітинами гліобластоми.