

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
“ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ ІМЕНІ Д. Ф. ЧЕБОТАРЬОВА
НАМН УКРАЇНИ ”**



ДАНИЛОВСЬКИЙ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК 577.112:616

**РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ TP53 ТА ЗАЛЕЖНИХ ВІД НЬОГО
ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ ЛІНІЇ U87**

03.00.04. – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Київ - 2016

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 медичних наук, професор
Досенко Віктор Євгенович,
завідувач відділу загальної та молекулярної
патофізіології Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України;

доктор медичних наук, професор
Мхітарян Лаура Сократівна,
завідуюча відділом біохімії Інститут кардіології імені
академіка М.Д. Стражеска НАМН України

Захист відбудеться “ 19 ”січня 2017 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.551.01 в Державній установі "Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України" (04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67)

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Державної установи "Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України" за адресою: 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67

Автореферат розіслано “14” грудня 2016 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Р.І. Потапенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Гліоми – це пухлини головного мозку, які виникають в результаті злякисного переродження астроцитів і характеризуються дуже високою агресивністю. За рахунок швидкої проліферації клітин у цих пухлинах створюються умови гіпоксії і дефіциту поживних речовин, що призводить до змін і в мікрооточенні пухлини, а тому у пухлинних клітинах для їх виживання та подальшого росту ініціюються специфічні зміни метаболізму. На сьогоднішній день ще не з'ясовані до кінця ті молекулярні механізми, що лежать в основі такої агресивної поведінки клітин гліоми і на даний момент ще немає ефективних протоколів боротьби з цим захворюванням.

Відомо, що злякисні пухлини використовують стрес ендоплазматичного ретикулула та ішемію для свого виживання та активації процесів проліферації, оскільки вони направляють метаболізм клітин на активацію ростових процесів, активують ангиогенез, а також сприяють толерантності до гіпоксії (Wang et al., 2012; Manié et al., 2014; Pluquet et al., 2014; Lee and Ozcan, 2014; Minchenko et al., 2015). За фізіологічних умов стрес ендоплазматичного ретикулула також є невід'ємною частиною нормального функціонування клітин, так як всі секреторні клітини постійно знаходяться в цьому стані, тому що стрес репрограмує геном на створення нових протеїнів для нормального фізіологічного функціонування організму.

Клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулула відома як відповідь на не згорнуті протеїни (unfolded protein response). Ця відповідь спрямована на відновлення нормального функціонування ендоплазматичного ретикулула. Таким чином, клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулула є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного поділу, а тому вплив на сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулула може бути використаний в якості нової стратегії для розробки ефективних протипухлинних ліків.

Існує три основні шляхи відповіді на не згорнуті чи не правильно згорнуті протеїни, кожен з яких включає трансмембранну молекулу, локалізовану в ендоплазматичному ретикулумі: PERK, ERN1 та ATF6 (Wu and Kaufman, 2006), серед яких ERN1 є найважливішим. Шлях PERK відповідає за блокування основної трансляції під час стресу ендоплазматичного ретикулула. Раніше було показано, що сигнальний шлях ERN1 пов'язаний із розвитком ішемії і гіпоксії, а також із процесами проліферації клітин та ростом злякисних пухлин (Hetz et al., 2013; Manié et al., 2014; Hetz and Chevet, 2015; Chevet et al., 2015; Wang and Kaufman, 2016), причому повне блокування ERN1 призводить до різкого пригнічення росту пухлин, процесів ангиогенезу та проліферації (Мінченко О. Г. та ін., 2013; Auf et al., 2010, 2013; Minchenko et al., 2015, 2016).

В останні роки детально вивчаються молекулярні основи вищих рівнів регуляції найважливіших процесів у клітинах різних організмів, головним чином тих, що визначають активацію контрольних точок протікання клітинного циклу, виявлення і виправлення пошкоджень в ДНК, убіквітинуювання і деградацію протеїнів, передачу мітогенного сигналу, індукцію апоптозу, диференціацію та специфікацію клітин, їх міграцію, пухлинний ангиогенез та ін. (Pluquet O., et

al., 2014). Одним з найголовніших регуляторів даних процесів є пухлинний супресор TP53. Він відіграє важливу роль у забезпеченні генетичного гомеостазу багатоклітинного організму, завдяки цьому його ще називають «стражем геному» (Mills, 2013). TP53 є фактором транскрипції і активує або пригнічує транскрипцію більше сотні генів, а також взаємодіє з великою кількістю інших протеїнів (Riley et al., 2008). Для виконання таких різнобічних функцій TP53 є велика кількість регуляторів.

Так, було встановлено, що впродовж клітинного циклу рівень та функціональна активність TP53 контролюється різноманітними факторами, зокрема такими як MDM2, PERP, USP7, RBL1, CSNK2, NME6, TOPORS, ZMAT3, TP53BP1 та TP53BP2, які приймають участь у регуляції активності та стабільності цього пухлинного супресора. Відомо, що інактивація TP53 призводить до неопластичної трансформації та канцерогенезу (Golubovskaya and Cance, 2013).

Таким чином, вивчення експресії гена *TP53* та пов'язаних з ним протеїнів за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну у клітинах гліоми з пригніченою опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулума для в'яснення їх ролі у регуляції проліферації клітин є актуальним напрямком медико-біологічних досліджень і може сприяти виявленню перспективних генів-мішеней для розробки нових способів створення анти-пухлинних 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 2011-2015 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.) та «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012-2016 р.р.).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – вивчення залежності експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* від функціональної активності сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози у клітинах гліоми лінії U87.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Вивчити рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю ензиму ERN1.

2. Дослідити вплив пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 на експресію *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87.

3. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сигнального ензиму ERN1.

4. Дослідити ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ензиму ERN1.

5. Вивчити вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ензиму ERN1.

Об'єкт дослідження: функція генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2*.

Предмет дослідження: зміни рівнів експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функціональною активністю сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що експресія генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлені зміни в експресії досліджених генів корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин з пригніченою активністю ERN1. Встановлено, що зміни в експресії генів *TP53*, *MDM2* та *USP7* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної, а не ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1, а гена *PERP* – обома активностями, оскільки за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму спостерігається різке підвищення експресії гена *PERP*, причому у напрямку нормалізації (до рівня експресії цього гена у нормальних астроцитах). Показано також, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *RBL1*, *CSNK2B* та *ZMAT3* і збільшує рівень *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2* та *PERP* у клітинах гліоми. Виявлений ефект гіпоксії на експресію генів *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2* та *ZMAT3* знімається пригніченням функції сигнального ензиму ERN1. Пригнічення функції ERN1 також робить чутливими до гіпоксії ген *TP53BP1*. Крім того, встановлено, що рівень експресії мРНК *TP53* і більшості залежних від нього протеїнів збільшується за умов дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. За умов дефіциту глюкози експресія генів *TP53*, *MDM2*, *USP7* та *PERP* не змінюється у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 робить чутливими до дефіциту глюкози експресію генів *TP53*, *MDM2* та *PERP* і посилює вплив дефіциту глюкози на експресію гена *TOPORS*, а також знімає вплив дефіциту глюкози на ген *ZMAT3*. Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі TP53 та асоційованих з ним протеїнів в процесах проліферації клітин, а також механізми взаємодії гіпоксії та ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулума.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що вони розкривають певні сторони молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов виключення ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, через зміни в експресії генів пухлинного супресора TP53 і залежних від нього протеїнів як за нормальних умов, так і за гіпоксії, що буде сприяти виявленню нових перспективних мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Результати досліджень включені до програм

спецкурсів „Сучасні біотехнології” та „Конструювання генів” ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом було самостійно виконано аналіз даних літератури по темі роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP* та *TP53BP2*, а також обробку отриманих результатів. Дослідження експресії генів *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *TP53BP1*, *NME6*, *TOPORS* та *ZMAT3* проводились за участі к.мед.н. Д. О. Мінченка, к.б.н. Карбовського Л. Л. та провідних інженерів Харькової А. П. і Кривдюк І. В., розробка методології, аналіз та обговорення результатів здійснювались за участі наукового керівника, д.б.н., проф. Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях: Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference Science and Art for the Advancement in Medicine, Budapest, 2012; X та XII Міжнародних міждисциплінарних науково-практичних конференціях студентів, аспірантів та молодих вчених ”Шевченківська весна” 2012 та 2014. Київ; 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Lviv, 2013; конференціях молодих учених Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології”, Київ, 2013, 2014, 2016; XI Українському біохімічному конгресі, Київ, 2014.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 робіт, з них 6 статей, опублікованих у фахових іноземних журналах та наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних з'їздів і конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 151 сторінці друкованого тексту та складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел, що включає 251 посилання (5 кирилицею та 246 латиницею). Робота ілюстрована 52 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури детально висвітлено сучасні відомості про гени-супресори пухлинного росту та їх біологічне значення. Наведено дані про структурну організацію і механізми регуляції експресії гена-супресора пухлинного росту *TP53*, а також проаналізована роль протеїну TP53. Наведено дані про молекулярні механізми регуляції експресії генів, залучених до регуляції рівня та функціональної активності TP53. Проаналізовано дані стосовно ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у канцерогенезі та репрограмуванні геному, а також щодо ролі гіпоксії в механізмах регуляції експресії генів та в рості злоякісних пухлин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на культурах клітин гліоми лінії U87, які були отримані із American Type Culture Collection (США). У цій роботі були використані також дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфектованих вектором pcDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1). Для отримання другої сублінії було використано домінант-негативну конструкцію на основі вектора pcDNA3.1, що містила кДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1), яка була індукована введенням в структуру каталітичного домена ендорибонуклеази чотирьох нуклеотидних залишків, що змінили рамку зчитування і ініціювали появу передчасного термінуючого трансляцію кодону. Створена таким чином конструкція могла кодувати синтез вкороченого з С-кінця ензиму без ендорибонуклеазної активності [GenBank accession number JQ425696].

Використані у роботі домінант-негативні конструкції на основі вектора pcDNA3.1, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1) була надана професором М. Moenner (Франція), а з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1) створена науковим керівником, професором О. Г. Мінченком.

У роботі використовували спектрофотометричні методи визначення кількості ДНК та РНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот та фрагментів ампліфікації, методи виділення РНК із клітинних ліній, виділення плазмідних та рекомбінантних ДНК, зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції.

Клітини гліоми лінії U87 вирощувалися згідно рекомендацій фірми-виробника у середовищі DMEM з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят, пеніцилін (100 одиниць/мл) та стрептоміцин (0,1 мг/мл) при 37⁰C в атмосфері з 5% CO₂.

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

Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума клітини витримували в середовищі з тунікаміцином (0,01 мг/мл) протягом 2 год.

Для ампліфікації кожної кДНК використовували пари специфічних праймерів.

Аналіз результатів ПЛР у реальному часі виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми „Differential expression calculator”. Дані, отримані з ампліфікатора, є показником інтенсивності флуоресценції на певному циклі реакції, що відповідає рівню накопичення дволанцюгового продукту реакції, зв'язаного із флуоресцентним барвником SybrGreen. При обчисленні дані виражають у координатах: логарифм значення інтенсивності флуоресценції/номер циклу. За допомогою функції auto-threshold встановлюється порогова лінія, у якій аналізовані криві флуоресценції мають лінійний характер. Статистичний аналіз результатів проводили як описано (Bochkov et al., 2006). Результати виражали як M

\pm *m.* Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$ (Гланц, 1998).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії *U87* з пригніченою активністю ензиму *ERN1*

На першому етапі досліджень ми вивчали вплив пригнічення активності ензиму *ERN1* на рівень експресії *TP53* та залежних від нього протеїнів.

Результати, які були одержані із використанням методу кількісної полімеразної реакції у реальному часі показують, що за умов повного виключення *ERN1* підвищується рівень експресії мРНК *TP53* та його активаторів, таких як *USP7*, *TP53BP2* і *CSNK2B*, а також пригнічується експресія інгібіторів експресії та функціональної активності *TP53*: *MDM2*, *TOPORS* і *NME6* (рис. 1).

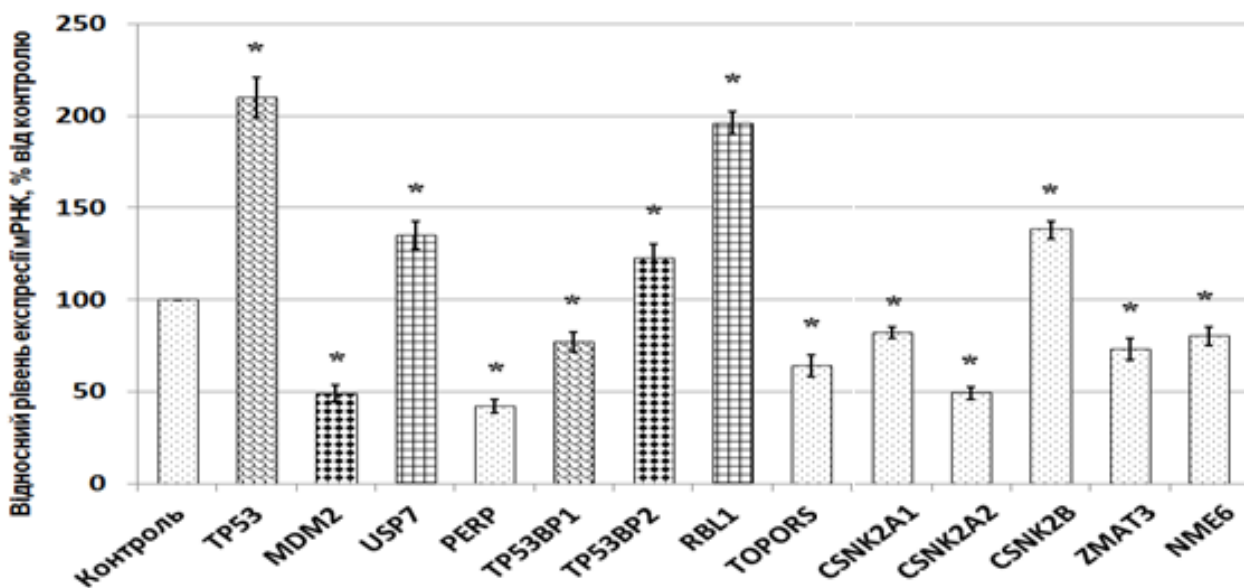


Рис. 1. Рівень експресії *TP53* залежних генів у клітинах гліоми лінії *U87* за умов пригнічення функції *ERN1*. Тут і на всіх рисунках нижче величину експресії мРНК нормалізували по β -актину і виражали у відсотках від контролю (100%). $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Також нами було визначено рівень протеїну *TP53* із використанням методу вестерн-блот аналізу, і як видно на рис. 2, рівень протеїну *TP53* також підвищується, як і рівень експресії мРНК *TP53*.

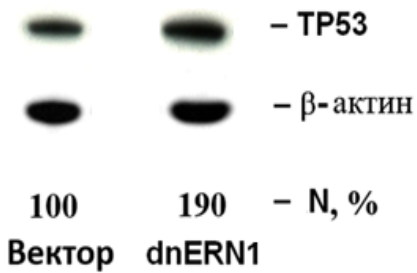


Рис. 2. Рівень протеїну TP53 у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та її сублінії з пригніченою функцією ензиму ERN1 (dnERN1). N – кількісна оцінка рівня TP53, що була нормалізована по β -актину і виражена у відсотках від контролю (100%).

На основі отриманих результатів було зроблено висновок, що пригнічення сигнального ензиму ERN1 призводить до підвищення рівня протеїну TP53. Таким чином, пригнічення росту пухлинних клітин, що спостерігається за умов виключення ERN1, може бути опосередковано і підвищенням рівня та функціональної активності TP53.

2. Вплив пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 на експресію TP53 та залежних від нього протеїнів за індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином

Було встановлено, що виключення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 збільшує рівень експресії гена *PERP* та істотно не змінює рівень експресії генів *TP53*, *MDM2* і *USP7* (рис. 3 А), але експресія всіх цих генів зберігає чутливість до індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином, який є інгібітором глікозилювання протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі і блокує утворення доліхол-пірофосфат-N-ацетил-глюкозаміну, в результаті чого і виникає стрес ендоплазматичного ретикулума (рис. 3 Б).

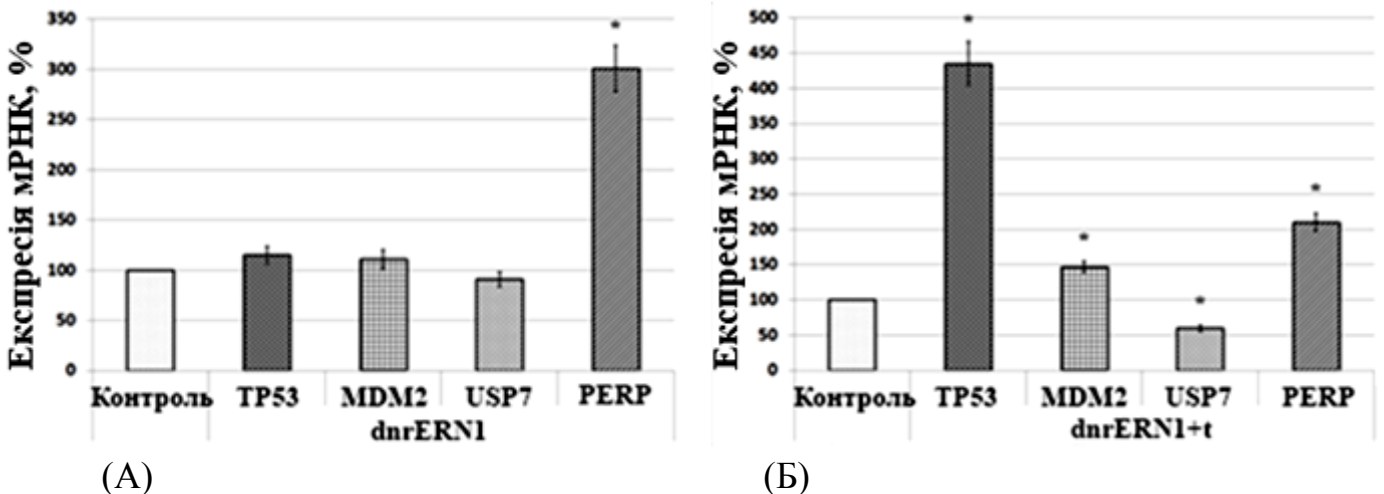


Рис. 3(А, Б). Рівень експресії TP53 залежних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов:

контроль – клітини із збереженою функцією ERN1;

dnERN1 – клітини із пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1;

dnERN1+t – вплив тунікаміцину на клітини з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1.

* – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Отже, на основі отриманих даних, можна висловити припущення, що зміни в рівні експресії генів *TP53*, *MDM2* і *USP7* опосередковані саме активністю кінази ERN1, а до регуляції експресії гена *PERP* залучені обидві ензиматичні активності цього сигнального ензиму.

3. Рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії в залежності від активності сигнального ензиму ERN1

Дослідження показали, що гіпоксія по-різному впливає на рівень експресії *TP53* та залежних від нього генів за умови пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Експресія генів *TP53*, *USP7* та *ZMAT3* зменшується за умов гіпоксії тільки в контрольних клітинах гліоми, але за умови виключення функції ензиму ERN1 дані гени проявляють чітку резистентність до умов гіпоксії (рис. 4 - 6). Стан гіпоксії є більш значущим для генів *MDM2* і *PERP*, так як спостерігалось підвищення їх експресії в обох типах клітин. Таким чином, ефект гіпоксії на експресію генів *MDM2* і *PERP* залежить як від активності ERN1, так і від інших факторів. Було встановлено, що виключення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 призводить до збільшення експресії гена *TP53BP1* і робить його чутливим до гіпоксії (рис. 7). Таким чином, гіпоксія знижує рівень експресії генів *TP53*, *USP7*, *RBL1* та *TOPORS* і збільшує *MDM2*, *PERP*, *TP53BP1*, *TP53BP2* та *CSNK2B* у клітинах гліоми, причому ефект гіпоксії на експресію більшості генів залежить від функції сигнального ензиму ERN1 (дані підсумовані в табл. 1).

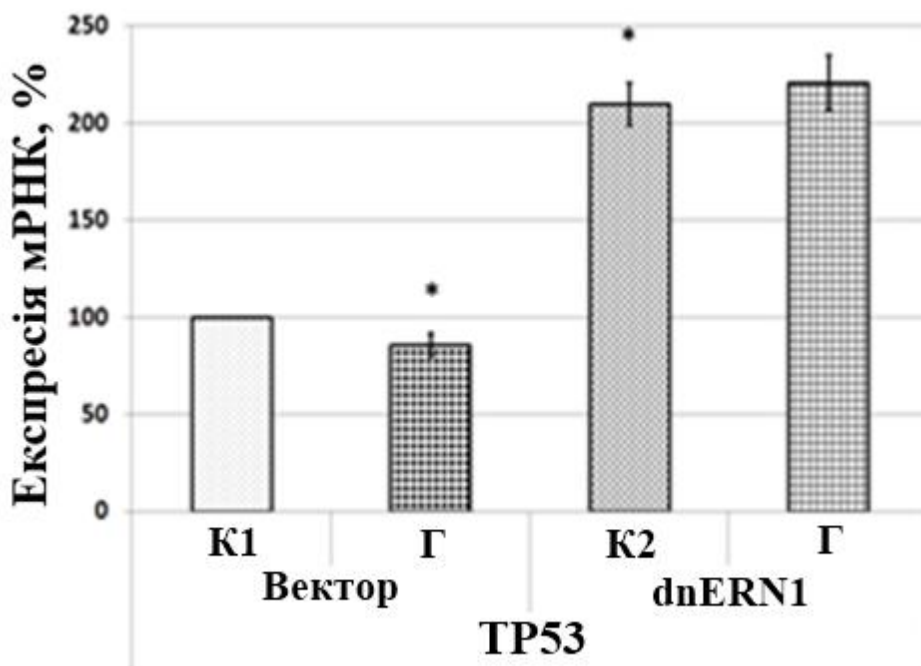


Рис. 4. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК досліджуваних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов:

- К1 – контроль 1;
- К2 – контроль 2;
- Г – гіпоксія;
- Вектор – збереження функцій ERN1;
- dnERN1 – пригнічення функції ERN1.

* – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1.

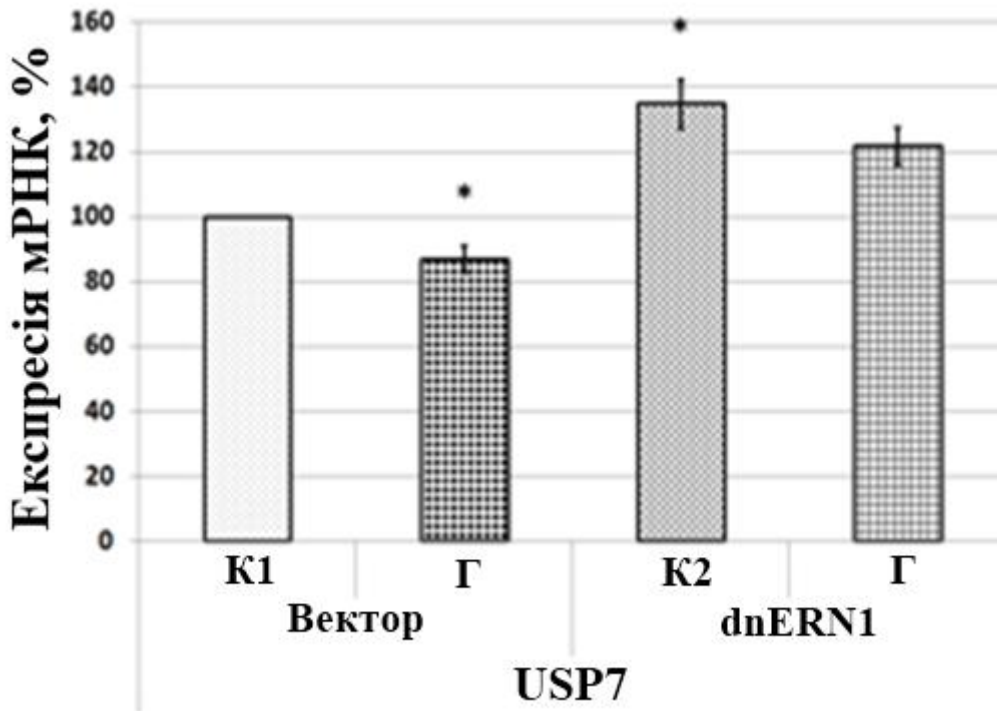


Рис. 5. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК досліджуваних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов:

- К1 – контроль 1;
 - К2 – контроль 2;
 - Г – гіпоксія;
 - Вектор – збереження функцій ERN1;
 - dnERN1 – пригнічення функцій ERN1.
- * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1.

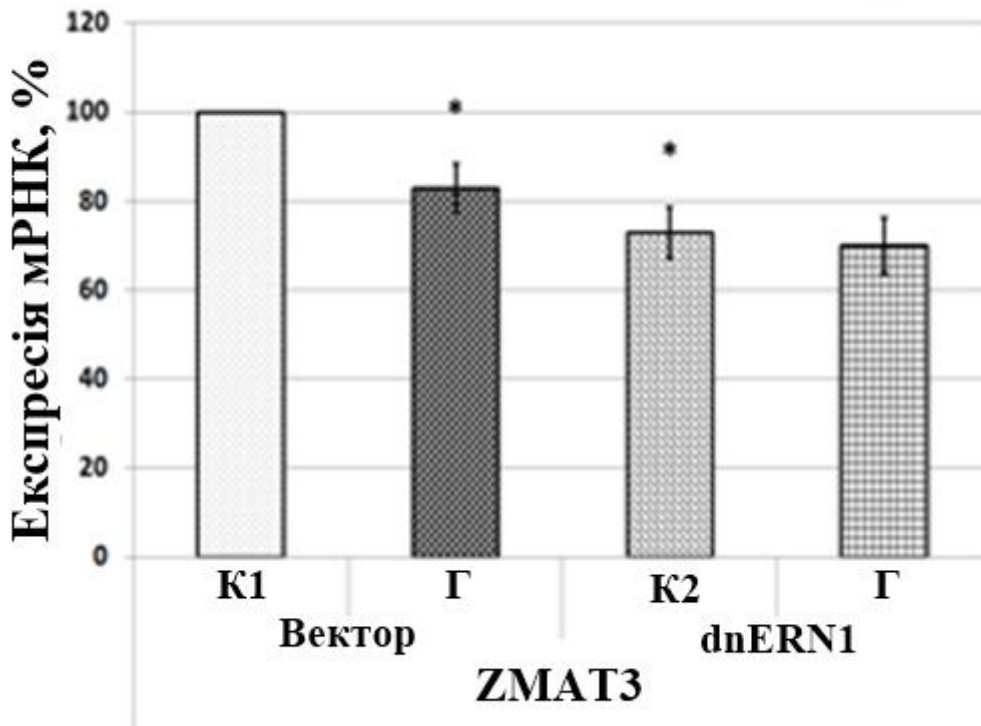


Рис. 6. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК досліджуваних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов:

- К1 – контроль 1;
 - К2 – контроль 2;
 - Г – гіпоксія;
 - Вектор – збереження функцій ERN1;
 - dnERN1 – пригнічення функцій ERN1;
- * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1.

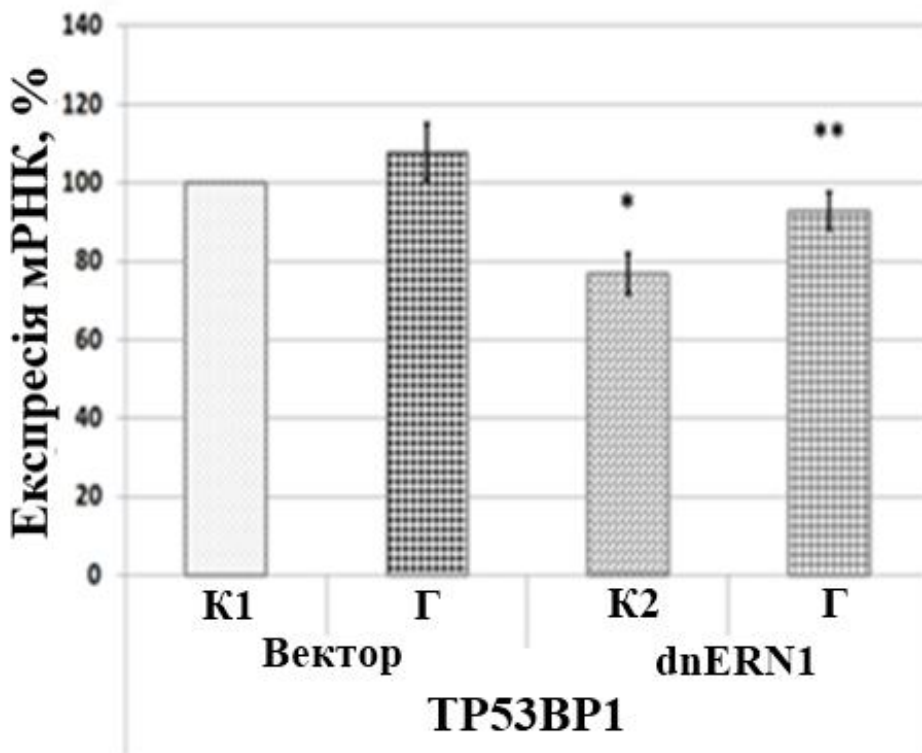


Рис. 7. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК досліджуваних генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов:

- K1 – контроль 1;
 - K2 – контроль 2;
 - Г – гіпоксія;
 - Вектор – збереження функцій ERN1;
 - dnERN1 – пригнічення функції ERN1;
- * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1.
 ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2.

Таблиця 1.

Вплив гіпоксії на рівень експресії *TP53* та залежних від нього генів за умов виключення ензиму ERN1

Умови дослідження Гени	dnERN1 vs контроль	Гіпоксія vs контроль	Гіпоксія vs контроль у клітинах з dnERN1
<i>TP53</i>	↑	↓	—
<i>MDM2</i>	↓	↑	↑
<i>USP7</i>	↑	↓	—
<i>PERP</i>	↓↓	↑	↑
<i>RBL1</i>	↑	↓	↓
<i>TP53BP1</i>	↓	—	↑
<i>TP53BP2</i>	↑	↑	↑↑
<i>TOPORS</i>	↓	↓	↓↓
<i>NME6</i>	↓	↓	↓↓
<i>ZMAT3</i>	↓	↓	—
<i>CSNK2A1</i>	↓	—	—
<i>CSNK2A2</i>	↓	↑	—
<i>CSNK2B</i>	↑	↓	↓

Нами також було досліджено вплив гіпоксії на рівень протеїну TP53 у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму ERN1 за допомогою вестерн-блот аналізу. Як видно із даних, представлених на рис. 8, гіпоксія підвищує рівень протеїну TP53 лише у клітинах з пригніченим ERN1, що узгоджується з даними експресії мРНК *TP53*.

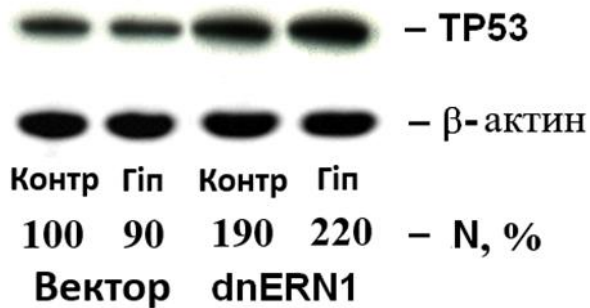


Рис. 8. Вплив гіпоксії на рівень протеїну TP53 у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і її сублінії з пригніченою функцією ензиму ERN1 (*dnERN1*) за умов гіпоксії. Контр – контроль; Гіп – Гіпоксія. N – кількісна оцінка рівня TP53, що була нормалізована по β -актину і виражена у відсотках від контролю (100%).

Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що гіпоксія проявляє пропухлинний ефект, а інгібування ензиму ERN1 підвищує експресію не лише мРНК *TP53*, а і його активаторів (*TP53BP1*, *USP7*, *TP53BP2* та *CSNK2B*), що узгоджується із пригніченням росту пухлини.

4. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ензиму ERN1

Клітини злоякісних пухлин споживають значно більше глутаміну, ніж нормальні клітини, причому висока інтенсивність його споживання не пояснюється лише збільшенням біосинтезу протеїнів клітинами пухлин. На сьогоднішній день відомо, що метаболізм глутаміну використовується для поповнення рівня проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот, забезпечує пухлинні клітини субстратами, необхідними для їх поділу, і контролює редокс-потенціал в клітинах за допомогою регуляції синтезу в них NADPH і відновленого глутатіону.

Глутамін також може перетворюватися в лактат або в аланін, якщо мітохондріальний малат експортується в цитозоль і декарбоксилюється малатдегідрогеназою в піруват, генеруючи NADPH. Дослідження показали, що в клітинних культурах злоякісних пухлин близько 60% глутаміну перетворюється в лактат і аланін.

Метаболізм глутаміну безпосередньо регулюється фактором транскрипції Мус через підвищення експресії мембранних переносників глутаміну і глутамінази-1. Саме цим можна пояснити, важливість глутаміну для процесів проліферації.

Враховуючи важливість глутамін-залежного анаплерозу для функціонування циклу трикарбонових кислот і для проліферації клітин, регулятори цього процесу можуть володіти онкогенними властивостями. Тому нами було проведено дослідження впливу дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього генів за умови пригніченої функції ензиму ERN1, у клітинах гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченою функцією ензиму ERN1. Показано, що дефіцит

глутаміну впливає на експресію більшості вивчених TP53-залежних генів і що ці зміни в експресії залежали від функції сигнального ензиму ERN1, що схематично зображено на рис. 9.

Встановлено, за гострого дефіциту глутаміну спостерігається підвищення рівня експресії гена *TP53*, а також і *MDM2*, негативного регулятора *TP53*. Експресія генів *USP7*, *PERP*, *NME6* та *TP53BP2* не змінювалася за стану дефіциту глутаміну за умови пригнічення ензиму ERN1, що вказує на їх резистентність до цих умов.

Експресія генів *TOPORS*, *TP53BP1* і *ZMAT3* збільшується за дефіциту глутаміну в контрольних клітинах гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 модифікує ефект гіпоксії на експресію цих генів: експресія *TP53BP1* і *ZMAT3* значно підвищується, а гена *TOPORS* – стає резистентною до дефіциту глутаміну.

Цілком можливо, що дефіцит глутаміну може збільшувати стабільність TP53 і його транскрипційну активність за умов виключення ензиму ERN1 шляхом змін в експресії генів *TP53BP1* і *ZMAT3*, і ініціюючи таким чином TP53-залежне пригнічення росту клітин і апоптоз.

Більше того, виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 підсилює вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *TP53*, *MDM2*, *TP53BP1*, *ZMAT3*, але нівелює його вплив на експресію генів *USP7*, *TP53BP2* та *TOPORS*. Дефіцит глутаміну не впливає на експресію генів *PERP* та *NME6* в обох типах досліджуваних клітин (табл. 2).

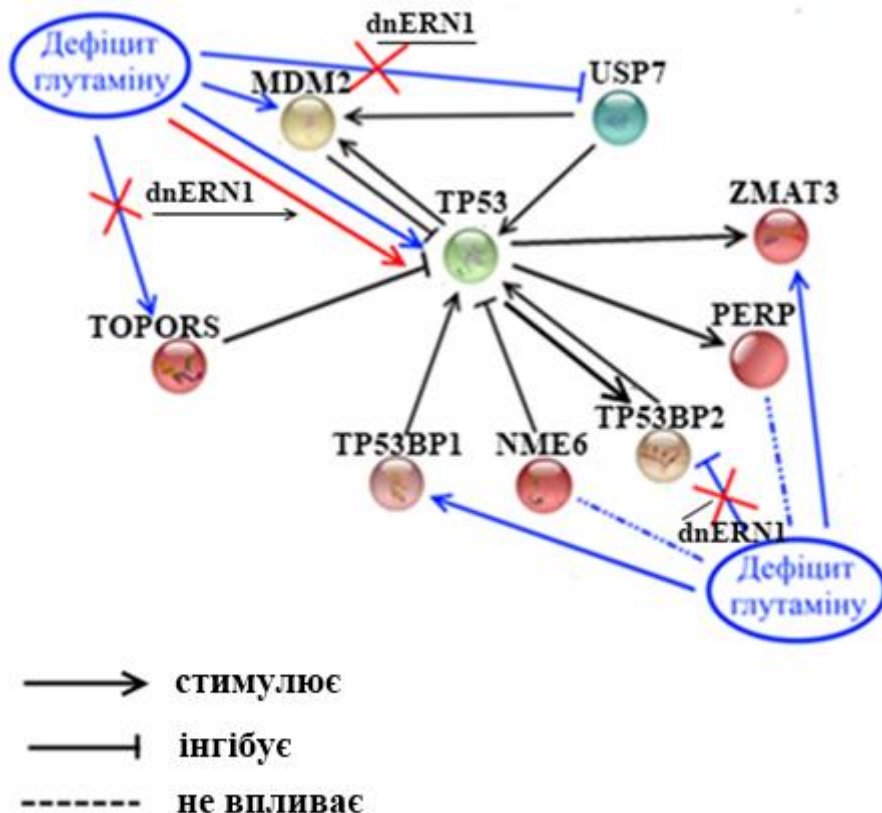


Рис. 9. Схематичне зображення впливу дефіциту глутаміну на зміну експресії TP53 та залежних від нього генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1 (dnERN1).

Вплив дефіциту глутаміну на експресію *TP53* та залежних від нього генів за умов виключення ензиму ERN1

Умови досліджу Гени	dnERN1 vs контроль	Дефіцит глутаміну vs контроль	Дефіцит глутаміну vs контроль у клітинах з dnERN1
<i>TP53</i>	↑	↑	↑↑
<i>MDM2</i>	↓	↑↑	↑↑
<i>USP7</i>	↑	↓	—
<i>PERP</i>	↓↓	—	—
<i>TP53BP1</i>	↓	↑	↑↑
<i>TP53BP2</i>	↑	↓	—
<i>TOPORS</i>	↓	↑	—
<i>NME6</i>	↓	—	—
<i>ZMAT3</i>	↓	↑	↑↑

Отримані дані показали залежність рівня експресії *TP53* та пов'язаних з ним генів у клітинах гліоми від дефіциту глутаміну, причому пригнічення сигнального ензиму ERN1 модифікує цей ефект дефіциту глутаміну гено-специфічно.

5. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ензиму ERN1

Збільшення швидкості гліколізу є характерною рисою більшості злоякісних пухлин, що супроводжується збільшенням активності основних ензимів гліколізу - гексокінази, фосфофруктокінази і піруваткінази. У пухлинах відбувається розпад вуглеводів до пірувату і перетворення його в лактат у присутності кисню. Відомо, що чим менш диференційована пухлина і чим вище швидкість її росту, тим інтенсивніше протікає в ній гліколіз і послаблюється окисне фосфорилування, а за рахунок активації гліколізу посилюються процеси проліферації. Ми також вивчили ефект дефіциту глюкози як моделі ішемії на експресію *TP53* та *TP53*-залежних генів за умов повного виключення ензиму ERN1.

Проведеними дослідженнями було показано, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *TP53* та *MDM2* істотно не змінюється у контрольних клітинах гліоми, але індукується в клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1 (табл. 3). Таким чином, збільшення експресії гена *TP53* за умов дефіциту глюкози може вносити свій вклад в пригнічення росту клітин гліоми з пригніченою активністю ERN1.

В ході дослідження було виявлено зниження рівня експресії генів *PERP* і *NME6*, а також значне зниження рівня експресії гена *TOPORS* за умов дефіциту глюкози, причому ці ефекти переважно залежали від функції сигнального ензиму ERN1. У той же час, рівень експресії генів *USP7* та *ZMAT3* істотно не змінювався за дефіциту глюкози незалежно від пригнічення сигнального ензиму ERN1 (рис. 10).

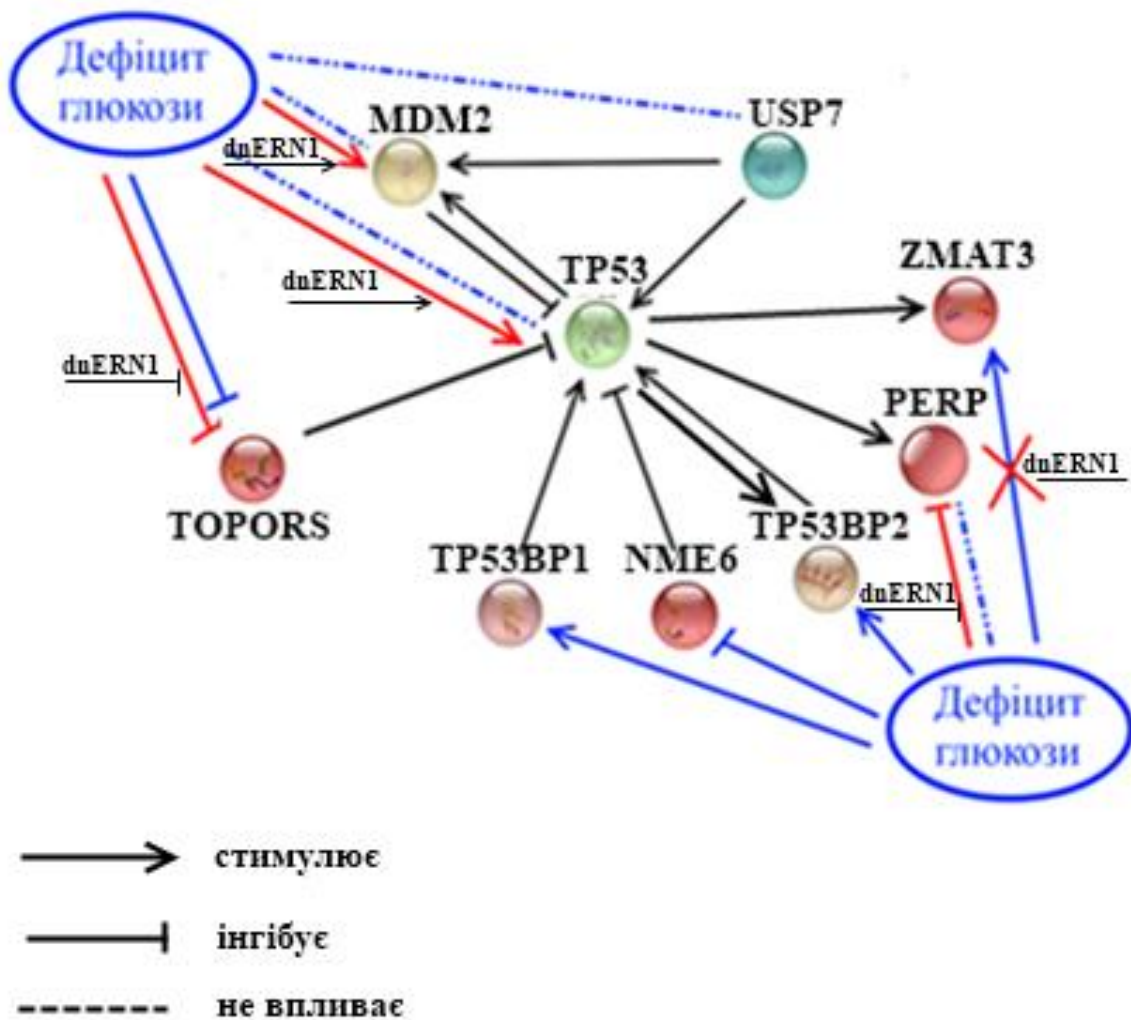


Рис. 10. Схематичне зображення впливу дефіциту глюкози на рівень експресії TP53 та залежних від нього генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1 (dnER1).

Дослідження експресії гена *TP53BP1* показало, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії цього гена підвищується, однак пригнічення функції ензиму ERN1 значно посилювало цей ефект у клітинах гліоми. В той же час, рівень експресії гена *TP53BP2* за умов дефіциту глюкози підвищується в обох типах клітин гліоми подібним чином (табл. 3).

Вплив дефіциту глюкози на експресію *TP53* та залежних від нього генів в залежності від активності сигнального ензиму ERN1

Умови досліджу Гени	dnERN1 vs контроль	Дефіцит глюкози vs контроль	Дефіцит глюкози vs контроль у клітинах з dnERN1
<i>TP53</i>	↑	—	↑
<i>MDM2</i>	↓	—	↑
<i>USP7</i>	↑	—	—
<i>PERP</i>	↓↓	—	↓
<i>TP53BP1</i>	↓	↑	↑↑
<i>TP53BP2</i>	↑	↑	↑
<i>TOPORS</i>	↓	↓	↓↓
<i>NME6</i>	↓	↓	↓
<i>ZMAT3</i>	↓	↑	—

Таким чином, експресія генів, які кодують *TP53* та пов'язані з ним фактори, переважно залежить від дефіциту глюкози стресу ендоплазматичного ретикулуму, оскільки виявлені зміни корелюють з пригніченням росту пухлинних клітин при виключенні ензиму ERN1.

ВИСНОВКИ

Робота присвячена дослідженню ролі сенсорно-сигнального ензиму ERN1 в регуляції експресії гена *TP53* та пов'язаних з ним протеїнів, які контролюють процеси апоптозу та проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну, що є надзвичайно важливим напрямком медико-біологічних досліджень і може сприяти виявленню перспективних генів-мішеней для розробки нових способів створення анти-пухлинних препаратів.

Наукове завдання вирішено шляхом експериментального дослідження експресії генів *TP53*, *MDM2*, *TP53BP1*, *ZMAT3*, *RBL1*, *CSNK2*, *USP7*, *TP53BP2*, *TOPORS*, *PERP* та *NME6* за умов гіпоксії і дефіциту глутаміну або глюкози, що імітують ефекти ішемії, у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ензиму ERN1.

1. Встановлено, що експресія генів *TP53*, *USP7*, *TP53BP2* і *RBL1* посилюється, а *MDM2*, *PERP*, *POLO1*, *TOPORS*, *TP53BP1*, *NME6* і *ZMAT3* знижується у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1.

2. Показано, що виключення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 збільшує рівень експресії гена *PERP* та істотно не змінює рівень експресії генів *TP53*, *MDM2* і *USP7*, але експресія всіх цих генів зберігає чутливість до індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином.

3. Встановлено, що гіпоксія знижує рівень експресії генів TP53, USP7, RBL1, POLO1 та TOPORS і збільшує MDM2, PERP, TP53BP1, TP53BP2 та CSNK2B у клітинах гліоми, причому ефект гіпоксії на експресію більшості генів залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

4. Показано, що рівень експресії генів TP53, MDM2, TOPORS, TP53BP1 та ZMAT3 збільшується у контрольних клітинах гліоми за умови дефіциту глутаміну у середовищі, а рівень USP7 і TP53BP2, при цьому, знижується. Виключення функції ензиму ERN1 істотно посилює ефект нестачі глутаміну на експресію генів TP53, MDM2, TP53BP1 та ZMAT3, істотно не впливаючи на інші гени.

5. Встановлено, що дефіцит глюкози активує експресію генів ZMAT3, TP53BP1 і TP53BP2 та пригнічує NME6 і TOPORS, не впливаючи істотно на експресію генів TP53, MDM2, USP7 та PERP, але пригнічення ERN1 індукує чутливість експресії генів TP53, MDM2 та PERP до дефіциту глюкози.

Отримані результати розширюють уявлення про роль ERN1-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції експресії про-апоптотичних генів і процесів проліферації.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Minchenko D. O. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. / D. O. Minchenko, **S. V. Danilovskiy**, I. V. Kryvdiuk, T. V. Bakalets, N. M. Lypova, L. L. Karbovskiy, O. H. Minchenko // Endoplasmic reticulum stress in diseases – 2014. Vol.1, №1. – P. 18-26. *(Особистий внесок здобувача – досліджував експресію мРНК TP53 та залежних від нього генів, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті).*

2. **Danilovskiy S. V.** ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of TP53, MDM2, USP7 and PERP gene expressions in U87 glioma cells / **S. V. Danilovskiy**, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy, O. V. Hubenia, O. H. Minchenko // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol.85, №4. – P. 90-102. *(Особистий внесок здобувача – проводив дослідження та аналіз експресії мРНК TP53, MDM2, USP7 і PERP, брав участь у підготовці статті до друку).*

3. Minchenko D. O. Acute L-glutamine deprivation affects the expression of TP53-related protein genes in U87 glioma cells / D. O. Minchenko, **S. V. Danilovskiy**, I. V. Kryvdiuk, O. V. Kovalevska, L. L. Karbovskiy, O. H. Minchenko // Fiziol. Zh. – 2014. – Vol.60, №1. – P. 11-21. *(Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію TP53 залежних генів і аналізував отримані дані).*

4. Minchenko D. O. Effect of glutamine and glucose deprivation on the expression of TP53, MDM2, USP7 and PERP genes in glioma U87 cells with IRE-1 knockdown / D. O. Minchenko, **S. V. Danilovskiy**, I. V. Kryvdiuk, T. V. Bakalets, V. V. Yavorskiy, R. V. Sulik, O. V. Hubenia, O. H. Minchenko // Int. J. Adv. Med. Sci. – 2014. – Vol.2, №2. – P. 13-18. *(Особистий внесок здобувача – досліджував експресію мРНК TP53, MDM2, USP7 та PERP, аналізував дані).*

5. Minchenko D. O. Expression of casein kinase genes in glioma cell line U87: effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation / D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy, **S. V. Danilovskiy**, A. P. Kharkova, O. H. Minchenko // Nat. Sci. – 2012. –

Vol.4, №1. – P. 38-46. *(Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів CSNK2, проводив аналіз отриманих даних і їх підготовку до друку).*

6. Minchenko D. O. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line / D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy, **S. V. Danilovskiy**, M. Moenner, O. H. Minchenko // Am. J. Mol. Biol. – 2012. – Vol.2, №1. – P. 21-31. *(Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів ретинобластоми, проводив аналіз отриманих даних і їх підготовку до друку).*

7. **Даніловський С. В.** Блокада ERN1 модифікує регуляцію експресії генів TP53, MDM2, USP7 та PERP у клітинах гліоми лінії U87 / **С. В. Даніловський**, І. В. Кривдюк, О. В. Ковалевська, Д. О. Мінченко // Матеріали XI Укр. біохім. Конгресу. Укр. біохім. журн. – 2014. – випуск 86. №5. – С. 147. *(Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію TP53, MDM2, USP7 та PERP, проводив аналіз даних і підготовку їх до друку.)*

8. **Danilovskiy S.V.** ERN1 signalling system as a new target for anticancer therapy / **S. V. Danilovskiy**, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy, A. P. Kharkova, O. H. Minchenko // Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference Science and Art for the Advancement in Medicine. – Budapest, Hungary. – 2012. – Vol.28, №2. – P. 212. *(Особистий внесок здобувача – підготував тези до друку).*

9. **Danilovskiy S.** TP53 and TP53-related gene expressions in glioma U87 cells with IRE-1 loss of function: effect of glutamine or glucose deprivation / **S. Danilovskiy**, D. Minchenko, I. Kryvdiuk, V. Yavorskiy, O. Minchenko // 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry. – Lviv, Ukraine. – 2013. – P. 29. *(Особистий внесок здобувача – приймав участь у підготовці тез до друку).*

10. **Даніловський С. В.** Експресія гену TP53 та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 із пригніченою функцією ензиму ERN1 / **С. В. Даніловський**, Д. О. Мінченко, Кривдюк І. В., О. Г. Мінченко // Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2013”. Укр. біохім. журн. – 2013. – випуск 85. №4. С. 137. *(Особистий внесок здобувача – підготував тези до друку).*

11. Кривдюк І.В. Пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 змінює рівень експресії р53-залежних генів у клітинах гліоми / І. В. Кривдюк, Д. О. Мінченко, **С. В. Даніловський**, О. Г. Мінченко // Тези доповідей конференції молодих учених „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014”. Укр. біохім. журн. – 2014. – випуск 86. №4. – С. 204. *(Особистий внесок здобувача – приймав участь у підготовці тез до друку).*

12. Ratushna O. O. Hypoxic regulation of the expression of TP53 and TP53-related genes in glioma cell line U87 / O. O. Ratushna, D. O. Minchenko, **S.V. Danilovskiy**, O. H. Minchenko // Матеріали X міжнародної міждисциплінарної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених ”Шевченківська весна 2012: Біологічні науки”. Сучасний стан науки: досягнення, проблеми та перспективи розвитку. – Київ, Україна. – 2012. – С. 24-25. *(Особистий внесок здобувача – підготував тези до друку).*

АНОТАЦІЯ

Даніловський С. В. Регуляція експресії TP53 та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія. – ДУ “Інститут геронтології імені Д. Ф. Чеботарьова” НАМН України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню експресії TP53 та залежних від нього генів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну, для виявлення нових перспективних мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин.

Вперше було показано, що експресія генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, причому виявлені зміни в експресії досліджених генів корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин з пригніченою активністю ERN1. Встановлено, що зміни в експресії генів *TP53*, *MDM2* та *USP7* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної, а не ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1, а гена *PERP* – обома активностями, оскільки за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму спостерігається різке підвищення експресії гена *PERP*, причому у напрямку нормалізації (до рівня експресії цього гена у нормальних астроцитах). Показано також, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *RBL1*, *CSNK2B* та *ZMAT3* і збільшує рівень *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2* та *PERP* у клітинах гліоми, причому ефект гіпоксії на експресію генів *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2* та *ZMAT3* знімається пригніченням функції сигнального ензиму ERN1. В той же час, експресія гена *TP53BP1* стає чутливою до гіпоксії за умов пригнічення функції ERN1. Крім того, встановлено, що рівень експресії мРНК *TP53* і більшості залежних від нього протеїнів збільшується за умов дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. Показано, що за умов дефіциту глюкози експресія генів *TP53*, *MDM2*, *USP7* та *PERP* істотно не змінюється у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 робить чутливими до дефіциту глюкози гени *TP53*, *MDM2* і *PERP*, а також посилює вплив дефіциту глюкози на експресію гена *TOPORS*, та знімає вплив дефіциту глюкози на експресію гена *ZMAT3*. Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі *TP53* та асоційованих з ним протеїнів у процесах проліферації клітин, а також механізми взаємодії гіпоксії та ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулума.

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

АННОТАЦИЯ

Даниловский С. В. Регуляция экспрессии TP53 и зависимых от него протеинов в клетках глиомы линии U87. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – ГУ “Институт геронтологии имени Д. Ф. Чеботарёва” НАМН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена исследованию экспрессии TP53 и зависимых от него генов в клетках глиомы линии U87 в условиях подавления функции ERN1, гипоксии и дефицита глюкозы или глутамина, для выявления новых перспективных мишеней для разработки новых стратегий подавления роста злокачественных опухолей.

Впервые было показано, что экспрессия TP53 и зависимых от него генов в клетках глиомы зависит от функциональной активности ERN1, причем выявлены изменения в экспрессии исследованных генов коррелируют с уменьшением интенсивности пролиферации клеток с подавленной активностью ERN1. Установлено, что изменения в экспрессии генов *TP53*, *MDM2* и *USP7* в клетках глиомы в условиях подавления ERN1 обусловлены исключением именно киназной, а не эндорибонуклеазной активности ERN1, а гена *PERP* - обеих активностей. Показано также, что гипоксия снижает уровень экспрессии генов *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *RBL1*, *CSNK2B*, *ZMAT3* и увеличивает уровень *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2*, *PERP* в клетках глиомы. Показан эффект гипоксии на экспрессию генов *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2* и *ZMAT3* который снимается угнетением функции ERN1, а также делает чувствительным к гипоксии ген *TP53BP1*. Установлено, что уровень экспрессии мРНК *TP53* и большинства зависимых от него протеинов увеличивается в условиях дефицита глутамина и этот эффект зависит от функциональной активности ERN1. Показано, что в условиях дефицита глюкозы подавление ERN1 делает чувствительными к дефициту глюкозы экспрессию генов *TP53*, *MDM2*, *PERP* и усиливает влияние дефицита глюкозы на экспрессию гена *TOPORS*, а также снимает влияние дефицита глюкозы на ген *ZMAT3*. Полученные результаты раскрывают молекулярные механизмы участия TP53 и ассоциированных с ним протеинов в процессах пролиферации клеток, а также механизмы взаимодействия гипоксии и ишемических факторов с ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, гипоксия, глиома, гены-супрессоры опухолей, стресс эндоплазматического ретикулула, ERN1, ишемия.

SUMMARY

Danilovskiy S. V. Regulation of the expression of TP53 and its dependent proteins in glioma cells line U87. - Manuscript.

Dissertation for the PhD degree in specialty 03.00.04. - Biochemistry - D. F. Chebotareva Institute of Gerontology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The dissertation is devoted to research the expression of TP53 and its dependent genes in U87 glioma cell line under condition of inhibition of the main sensor and signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress, ERN1, as well as under conditions of hypoxia and glucose or glutamine deprivation, in order to identify new promising targets for developing new strategies to suppress the malignant tumor growth.

It was shown for the first time that the expression of *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* and *TP53BP2* genes in the glioma cell depended on functional activity of ERN1 and revealed that changes in the expression of the studied genes correlated with the decreasing of proliferation of cells with suppressed ERN1 activity. It was established that changes in the expression of *TP53*, *MDM2* and *USP7* genes in glioma cells under condition of ERN1 inhibition were caused by suppression of kinase, but not endoribonuclease activity of the ERN1 and changes in the expression of *PERP* gene - by both activities because under the condition of only endoribonuclease activity of this enzyme inhibition a significant increase of PERP gene expression was observed and it was directed to the normalization. Also it was shown that hypoxia reduced expression levels of *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *RBL1*, *CSNK2B* and *ZMAT3* genes and increased levels of *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2* and *PERP* genes in glioma cells. It was found, that the effect of hypoxia on the expression of *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2* and *ZMAT3* genes was removed by inhibition of ERN1 function. Suppression of ERN1 also makes gene *TP53BP1* sensitive to hypoxia. In addition, it was found that the level of mRNA expression of *TP53* and the majority of dependent from it proteins increased under condition of glutamine deprivation and that this effect depended on the functional activity of ERN1. The results reveal the molecular mechanisms of TP53 and its associated proteins participation in the processes of cell proliferation and mechanisms of interaction between hypoxia, ischemic factors and ERN1.

Keywords: gene expression, hypoxia, gliomas, tumor suppressor genes, endoplasmic reticulum stress, ERN1, ischemia.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ATF6 – (activating transcription factor 6), активуючий транскрипційний фактор 6;
 CSNK2 – (casein kinase 2), казеїнкіназа 2;
 ERN1 – (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), сигналювання від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1;
 MDM2 – (E3 ubiquitin protein ligase homolog), гомолог E3 убіквітин протеїн лігази;
 NME6 – (nucleoside diphosphate kinase 6), нуклеозид дифосфаткіназа 6;
 PERK – (double stranded RNA activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), кіназа ендоплазматичного ретикулума подібна до PKR (протеїн кіназа, що активується дволанцюговою РНК);
 PERP – (TP53 apoptosis effector), апоптотичний ефектор TP53;
 RBL1 – (retinoblastoma-like 1), подібний до ретинобластоми 1;
 TOPORS – (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase), збагачена аргінін/серином E3 убіквітин протеїн лігаза, що зв'язується з топоізомеразою 1;
 TP53 – (tumor protein 53), пухлинний протеїн 53;
 TP53BP1 – (tumor protein 53 binding protein 1), протеїн 1, який зв'язує пухлинний протеїн TP53;
 TP53BP2 – (tumor protein 53 binding protein 2), протеїн 2, який зв'язує пухлинний протеїн TP53;
 USP7 – (ubiquitin specific peptidase 7), убіквітин специфічна пептидаза 7;
 ZMAT3 – (zinc finger Matrin-type 3), цинковий палець 3 типу Матрин.