

АНОТАЦІЯ

Лузіна О.Я. Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми. – 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, 2021.

Актуальним напрямком сучасних біохімічних та медико-біологічних досліджень є вивчення молекулярних механізмів міжгенних взаємодій в пухлинах різного типу з метою удосконалення та створення нових стратегій боротьби з цим захворюванням. Гліоми є високоагресивними злоякісними пухлинами центральної нервової системи, що характеризуються швидкими темпами росту та важко піддаються терапії. Наразі ведеться пошук потенційних протеїнів-мішеней з метою їх комбінованого застосування у лікуванні пухлин.

Злоякісна трансформація супроводжується репрограмуванням тотального метаболізму клітини з метою адаптації до гіпоксії, дефіциту поживних речовин та підтримки процесів проліферації на сталому рівні. Для виживання та протидії стресовим чинникам у пухлинних клітинах відбувається активація мережі сигнальних каскадів, що веде до посилення процесів проліферації та ангиогенезу.

Стрес ендоплазматичного ретикулума поряд з гіпоксією є ключовими модуляторами пухлинного росту, а хронічна активація сигнальних шляхів стресу ER сприяє виживанню та проліферації онкоклетин, зокрема гліомних.

Сенсорно-сигнальний шлях ендоплазматичного ретикулума ERN/IRE1 є важливим активатором клітинної відповіді на стрес, а за умови блокади IRE1-опосередкованого сигнального шляху відбувається

пригнічення процесів проліферації в результаті метаболічного репрограмування в клітинах гліоми. Тому дослідження міжгенних взаємодій в клітинах гліоми є вкрай важливим для розуміння анти-проліферативних ефектів пригнічення IRE1.

Плейтропний ензим NAMPT (фосфорибозилтрансфераза нікотинаміду) є ключовим фактором стабільності геному, експресія якого відіграє критичну роль у процесах метаболізму та проліферації. Внутрішньоклітинний NAMPT лімітує синтез NAD, важливого регулятора енергетичного обміну. Гіперекспресія NAMPT спостерігається в багатьох типах пухлин, а пригнічення його активності знижує проліферацію, міграцію, інвазію та сприяє апоптозу клітин. Оскільки NAMPT є одним з ключових регуляторів метаболізму та посилює проліферативні процеси, дослідження механізмів міжгенних взаємодій, зокрема через IRE1 сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума є важливим для розкриття механізмів пухлинного росту.

В даній роботі досліджувалась експресія пухлинозалежних генів, дерегуляція яких спостерігається при злоякісній трансформації, а їх протеїни пов'язані з процесами проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування. Вивчення експресії даних генів за умов пригнічення IRE1, а також NAMPT є надзвичайно актуальним для розуміння механізмів антипухлинного росту в гліомах.

Метою дисертаційної роботи було виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом дослідження експресії генів за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1, а також сайленсінгу мРНК NAMPT.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні завдання: 1) вивчити рівень експресії генів функціонально різних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1; 2) дослідити рівень експресії мРНК та протеїну NAMPT за умов повного та часткового пригнічення функції IRE1; 3) визначити

рівень експресії генів, що кодують пухлинозалежні протеїни за умови сайленсінгу мРНК *NAMPT*; 4) дослідити вплив гіпоксії на рівень експресії генів у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1; 5) визначити рівень експресії генів у клітинах гліоми за дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1.

Дослідження рівня експресії мРНК генів протеїнів, що контролюють процеси проліферації, апоптозу, виживання, ангиогенезу та міграції, а також мікроРНК, здійснювали у клітинах гліоми лінії U87 за різних експериментальних умов методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази або лише ендорибонуклеази сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 спостерігається різке зниження рівня експресії мРНК про-проліферативного гена *NAMPT* у порівнянні з контрольними клітинами, що свідчить про опосередкованість цих змін саме ендорибонуклеазою IRE1.

Виявлено, що пригнічення IRE1 підвищує експресію *miR-182*, сайти зв'язування з якою були виявлені на 3'-кінцевій нетранслюючій послідовності мРНК *NAMPT*. Таким чином, було показано, що IRE1-залежна регуляція експресії мРНК *NAMPT* може відбуватись на пост-транскрипційному рівні за рахунок підвищення активності мікроРНК *miR-182*.

Встановлено, що пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1 впливає на експресію більшості генів, пов'язаних з процесами проліферації, виживання та міграції у клітинах гліоми лінії U87, а за сайленсінгу мРНК *NAMPT* зафіксовані протилежно спрямовані зміни експресії генів. Так показано, що у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1 знижується експресія онкогенів *ATF6*, *BIRC5*, *GLO1*,

RAB5C, *COL6A1* і *TGM2* тоді як за умов пригнічення *NAMPT* рівень експресії генів *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2* підвищується. Продемонстровано зниження експресії *ATF3* та *DEK* за умов пригнічення мРНК *NAMPT* та блокади функціональної активності IRE1, що свідчить про можливу причетність їх до активації антипроліферативних механізмів в клітинах гліоми.

Продемонстровано, що сайленсінг мРНК *NAMPT* підвищує рівень експресії генів *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* і *IRS1* та знижується рівень експресії мРНК *Ki-67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3* та *PER2*. Зниження рівня експресії маркера проліферації *Ki-67* та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) за даних умов свідчить про послаблення проліферативного потенціалу клітин гліоми.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором пухлинного росту.

Виявлено, що блокада активності IRE1 модифікує вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії більшості досліджених генів, що є одним з механізмів IRE-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

Отримані нами дані демонструють дерегуляцію більшості онкогенів після сайленсінгу *NAMPT* та складність міжгенних взаємодій в умовах порушення функціональної цілісності в гліомах. Результати роботи мають практичне значення, оскільки є важливими для оцінки і прогнозування наслідків таргетної терапії з урахуванням побічних ефектів, а також ідентифікації потенційних мішеней для подальших досліджень та створення нових підходів боротьби з цим захворюванням.

Ключові слова: гліома, експресія генів, пригнічення IRE1, сайленсінг *NAMPT*, стрес ендоплазматичного ретикулула, репрограмування геному, гіпоксія, дефіцит глутаміну.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Luzina O.Y.**, Riabovol O.O., Danilovskyi SV, Minchenko O.H. Silencing of NAMPT leads to up-regulation of insulin receptor substrate 1 gene expression in U87 glioma cells. *Endocr. Reg.*, 2020, 54 (1): 31-42. doi: 10.2478/enr-2020-0005. *Scopus*
2. Minchenko O.H., Kharkova A.P., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Kryvdiuk I.V., Kuznetsova A.Y. ERN1 modifies effect of glutamine deprivation on tumor growth related factors expression in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90 (3): 49-61. doi.org/10.15407/ubj90.03.049. *Scopus*
3. Kharkova A.P., Garmash Y.A., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Danilovsky S.V., Kuznetsova A.Y., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on DEK, TPD52, BRCA1, ADGRE5, LIF, GNPDA1, and COL6A1 gene expressions in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Biotechnol. Acta*, 2017, 10(6): 19-27. doi: 10.15407/biotech10.06.019.
4. Minchenko O.H., **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Minchenko D.O., Garmash I.A., Ratushna O.O. Expression of tumor growth related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia. *Ukr. Biochem. J.*, 2017, 89 (5): 40-51. doi.org/10.15407/ubj89.05.040. *Scopus*
5. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Garmash I.A., Minchenko O.H. Effect of hypoxia on the expression of subset proliferation related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Adv. Biol. Chem.*, 2017, 7: 195-210. doi: 10.4236/abc.2017.76014
6. Ratushna O.O., Minchenko D.O., Riabovol O.O., **Luzina O.Y.**, Minchenko O.H. Endoplasmic reticulum stress as a key factor of genome reprogramming in cancer cells. International VACTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases. Karolinska Institutet, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Stockholm, January 16-17, 2017. Stockholm, Sweden, 2017, 5.

7. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Halkin O.V., Karbovskyi L.L. Hypoxic regulation of the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. 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, 89(3): 87.

8. **Luzina O.**, Minchenko D., Hnatiuk O., Riabovol O., Garmash I. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of proliferation related genes. Integrative Biology & Medicine, October 2-7, 2017, Kyiv, 2017: 47.

9. Мінченко О.Г., Ратушна О.О., Рябовол О.О., Мінченко Д.О., **Лузіна О.Я.** Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань. 4-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017 року, Дніпро, 2017: 70-72.

10. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Garmash Y.A., Kharkova A.P. Effect of glutamine deprivation on the expression of *DEK*, *TPD52*, *BRCA1*, *ADGRE5*, *LIF*, *GNPDA1*, and *COL6A1* genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology - 2018”, May 23-25, Kyiv. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(3): 124.

11. Hnatiuk O., **Luzina O.**, Minchenko D., Garmash I., Minchenko O. IRE1 inhibition modifies the expression of tumor growth related genes in glioma cells. Materials of symposium and summer school “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”. May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine. Experimental Oncology, 2018, 40(2): Conference Reports: 13.

12. **Luzina O.Y.**, Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., Kuznetsova A.Y. Hypoxic regulation of endoplasmic reticulum stress responsive gene expressions in IRE1 knockdown glioma cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference –

Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, Kyiv, 2018: Ukr. Biochem. J. 2018, 90 (Special Issue): 136.

13. **Luzina O.Y.**, Tsybal D.O., Minchenko D.O., Lebid-Biletska K.M. The effect of IRE1 knockdown and silencing of NAMPT on the expression of a subset of proliferation related genes in U87 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, 91(2): 84.

14. **Лузіна О.Я.**, Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Лагановська Ю.О., Мінченко О.Г. IRE1-залежний характер гіпоксичної регуляції експресії пропроліферативних генів у клітинах гліоми. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 111-112.

15. Sliusar M.Y., Minchenko D.O., **Luzina O.Y.**, Khita O.O., Minchenko O.H. Molecular mechanisms of interaction of hypoxia with *endoplasmic reticulum stress signaling pathways*. The 5th Int. Sci. Conf. “Current Problems Biochem., Cell Biol. Physiol”, Dnipro, 1-2 October, 2020: 39-40.