

АНОТАЦІЯ

Слюсар М. Ю. Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину 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, 2025.

Дисертація присвячена вивченню механізмів регуляції експресії генів синтезу серину, який відіграє важливу роль у рості різних злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, оскільки задіяний у багатьох метаболічних циклах. Головна увага була зосереджена на з'ясуванні ролі стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії у регуляції експресії генів синтезу серину, оскільки саме ці чинники є важливими для пухлинного росту. Для цього були проведені експерименти із використанням генетично модифікованих клітин гліобластоми лінії U87MG, що мали пригнічену ензиматичну активність ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol-requiring enzyme 1), основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, і знижену проліферативну активність. Було також досліджено вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у залежності від функціональної активності сигнального протеїну ERN1.

Актуальність цієї теми пов'язана з тим, що онкологічні захворювання посідають друге місце у світі за рівнем смертності і їх кількість постійно зростає при відчутній недостатності ефективного їх лікування. Гліобластоми є найбільш злоякісними і досить поширеними первинними пухлинами головного мозку, які надто тяжко піддаються лікуванню та характеризуються короткою тривалістю життя пацієнтів. І саме тому, інтенсивний пошук принципово нових підходів до вияснення молекулярних основ патогенезу гліобластом, як і інших злоякісних пухлин, є важливим і необхідним для покращення існуючих та створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

Надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин є стрес ендоплазматичного ретикулума і гіпоксія, які перепрограмовують геном пухлинних клітин для посиленого забезпечення пухлин поживними речовинами шляхом активації ангіогенезу, розвитку резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до ефектів гіпоксії. У зв'язку з цим, детальне вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих процесів, буде сприяти більш глибокому розумінню молекулярних механізмів росту злоякісних пухлин та пошуку принципово нових підходів боротьби з ними.

Не менш важливим фактором росту злоякісних пухлин є також амінокислота серин, яка задіяна у регуляції численних метаболічних процесів як у нормальних, так і пухлинних клітинах. Більше того, для інтенсивного росту багатьох злоякісних пухлин важливим є посилений синтез серину. І тому пізнання молекулярних механізмів регуляції синтезу серину за злоякісного росту сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за гіпоксії є досить важливим у пошуку молекулярних мішеней для боротьби зі злоякісним ростом.

Важливим і принципово новим моментом цієї роботи було виявлення причетності ERN1/IRE1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума до регуляції експресії генів, що контролюють синтез серину, у тому числі і ролі ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей цього сигнального протеїну в реалізації його впливу на експресію генів. Окремим завданням роботи було дослідити дію гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення ERN1, оскільки це пригнічення призводить до зниження проліферації пухлинних клітин і має виражений анти-пухлинний ефект.

У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології. Це культивування трьох стабільно трансфікованих субліній: 1) трансфіковані порожнім вектором контрольні клітини, 2) клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 і 3) клітини без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної), а також методи виділення РНК із клітин гліобластоми,

визначення концентрації і спектральних характеристик препаратів РНК за допомогою нано-спектрофотометра. Для визначення експресії генів спочатку проводили синтез комплементарних ДНК шляхом зворотної транскрипції, а потім методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі визначали рівень експресії мРНК ензимів синтезу серину, а також транскрипційного фактора ATF4, який контролює транскрипцію *PSAT1*. Спеціальний метод був застосований для визначення експресії мікроРНК, що включав поліаденилювання мікроРНК, їх зворотну транскрипцію і ампліфікацію. Були використані також методи сайленсінгу мРНК ERN1 та XBP1 для створення моделі пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 або лише головної функції ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну, а саме сайленсінгу XBP1. Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом в агарозному гелі. Для аналізу можливих механізмів регуляції експресії досліджених генів використовували методи біоінформатики, а отримані результати опрацьовані статистично.

Для з'ясування ролі сигнального протеїну ERN1 та його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) нами було досліджено експресію генів, що кодують такі ензими синтезу серину як PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), PSAT1 (phosphoserine aminotransferase 1), PSPH (phosphoserine phosphatase), SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1) і SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2). Для в'яснення механізмів регуляції

р

і

в З метою вивчення молекулярних механізмів залежності експресії генів синтезу серину від стресу ендоплазматичного ретикулума і зокрема його сигнального шляху ERN1/IRE1 у клітинах гліобластоми були проведені дослідження на клітинах з пригніченими ензиматичними активностями (протеїнкінази та ендорибонуклеази) ERN1 та за умов інгібування лише ендорибонуклеази цього сигнального протеїну. Виявлена залежність експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми від функціональної активності ERN1 і можливий вклад цих генів у анти-проліферативний ефект пригнічення

р

е

ERN1, а також роль протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей цього сигнального протеїну в опосередкованій стресом ендоплазматичного ретикулума регуляції експресії досліджених генів. Встановлено також, що експресія генів синтезу серину є чутливою до умов гіпоксії і дефіциту як глутаміну, так і глюкози в залежності від функціональної активності сигнального протеїну ERN1.

Отримані результати продемонстрували, що експресія генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1*, *SHMT2* та *ATF4*, які контролюють синтез серину, залежить від ERN1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума і впливає на проліферацію клітин гліобластоми. Була виявлена залежність ефектів гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози, які є важливими факторами контролю пухлинного росту, на експресію цих генів від функціональної активності ензиматичних активностей цього сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми лінії U87MG змінювало рівень експресії всіх досліджених нами генів, які контролюють синтез серину. Встановлено також, що виявлені зміни були різними як по величині, так і по напрямку, і що це обумовлено особливостями регуляції експресії досліджених генів сигнальним протеїном ERN1, а також їх функціональним значенням, причому це відображає перепрограмування геному в результаті інгібування одного із сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Так, рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4* знижувався, а гена *SHMT1* – істотно збільшувався у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1. Подібні зміни в експресії генів, що контролюють синтез серину, були виявлені і за умов сайленсінгу ERN1, що вказує на залежність змін в експресії досліджених нами генів саме від ERN1, а не від способу його пригнічення. Проведено також визначення ензиматичної активності *PHGDH*, ключового ензиму синтезу серину, і показано зниження активності цього ензиму у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1.

У той же час, за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 рівень експресії генів *PSAT1* і *PSPH* змінювався по-різному у клітинах гліобластоми із різним типом пригнічення ензиматичних активностей протеїну ERN1, а це свідчить про участь обох ензиматичних активностей ERN1 у цій регуляції, їх взаємодію через опосередковані ними сигнальні шляхи. Разом з тим, зміни рівня експресії гена *ATF4* у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 і клітинах з пригніченими обома його ензиматичними активностями істотно не відрізнялися за величиною, що свідчило про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Серед досліджених нами генів, які контролюють синтез серину, були виявлені і такі, рівень експресії яких змінювався лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 і не змінювався у клітинах гліобластоми з пригніченою *SHMT1* та *SHMT2*. Отримані результати вказують на опосередкованість виявлених змін в їх експресії саме протеїнкіназною активністю протеїну ERN1. за умов сайленсінгу лише ERN1, а не XBP1, що вказує на залежність виявлених змін в експресії цих генів саме від протеїнкіназної активності ERN1. А от зміни рівня експресії гена *ATF4* у клітинах гліобластоми після сайленсінгу ERN1 і XBP1 істотно не відрізнялися за величиною, що свідчило про опосередкованість виявлених змін в експресії цього гена саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1, шляхом утворення XBP1s за участі ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну.

Вестерн блот-аналіз протеїнів PSAT1, PSPH і ATF4 показав зниження рівня всіх цих протеїнів як у клітинах гліобластоми з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну, що узгоджується із виявленими нами змінами рівня експресії відповідних мРНК.

Була проведена оцінка проліферативного потенціалу клітин гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 двома методами (протоковою цитометрією на BD Accuri C6 Flow Cytometer та по рівню ДНК у клітинах) і показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну знижувало проліферативний потенціал таких клітин більше ніж у два рази, а пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 мало значно більший ефект.

Методами біоінформатики було встановлено, що 3'-послідовності мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1 містять сайти зв'язування мікроРНК: miR-145-5p в мРНК PSAT1, miR-429-3p в мРНК PSPH, а miR-218-5p в мРНК SHMT1, причому виявлені зміни в експресії цих мікроРНК є протилежно направленими до змін в експресії відповідних мРНК і можуть бути причетними до регуляції експресії мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1 сигнальними шляхами протеїну ERN1 на пост-трансляційному рівні.

Показано також, що експресія більшості генів, що контролюють синтезу серину, є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії більшості із них збільшується, особливо таких генів як *PHGDH* і *ATF4*, а інших генів – зменшується у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Разом з тим, у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною та протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1 чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4* до впливу гіпоксії змінюється, що переконливо свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії цих генів. Отримані результати є підґрунтям для виявлення механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Було також показано, що рівень експресії майже всіх досліджених нами генів, що контролюють синтез серину, змінюється як за умов дефіциту глутаміну, так і глюкози, але по-різному, і що пригнічення обох ензиматичних (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної) активностей сигнального протеїну ERN1 істотно модифікує їх ефект, але ці модифікації мають генно-специфічний характер. Так, у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах

гліобластоми за умов дефіциту глутаміну збільшується рівень експресії таких генів як *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4*. Разом з тим, рівень експресії гена *SHMT1* різко знижується у контрольних клітинах гліобластоми за цих умов. Встановлено також, що чутливість експресії усіх досліджених генів до дефіциту глутаміну змінюється у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) активностей протеїну ERN1. Так, чутливість таких генів як *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4* до дефіциту глутаміну різко посилюється за умов пригнічення ERN1, а особливо *PSAT1*, тоді як гена *SHMT1* – зменшується. Менш виражені зміни в експресії генів, що контролюють синтезу серину, були виявлені за умов дефіциту глюкози у середовищі у порівнянні з дефіцитом глутаміну. Так, дефіцит глюкози у середовищі призводив до збільшення рівня експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *SHMT2* та *ATF4* у контрольних клітинах гліобластоми, тоді як експресія гена *PSPH* істотно не змінювалася, а гена *SHMT1* – зменшувалася. Разом з тим, пригнічення ERN1 також істотно змінювало чутливість експресії усіх досліджених генів до дефіциту глюкози у середовищі, а особливо *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4*. Ці результати чітко вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Наукова новизна цієї роботи в тому, що вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів, що контролюють синтезу серину, у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, та що виявлені зміни в експресії досліджених генів були генно-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Виявлена також посилена експресія генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами, яка є важливою умовою посиленого росту злоякісних пухлин, а виявлене нами зниження експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах з пригніченою функціональною активністю ERN1 добре узгоджується зі зниженим їх проліферативним потенціалом. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеазної активності ERN1 у регуляції експресії гена *ATF4*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю

сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цього гена істотно не відрізнявся за величиною. Вперше показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є важливим регулятором експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*, оскільки інгібування ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотно не впливало на рівень їх експресії і лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей протеїну ERN1 змінювався рівень експресії цих генів.

Вперше показано, що експресія всіх генів, що контролюють синтез серину, є чутливою до гіпоксії у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін. Встановлено також, що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* і *ATF4* до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі й клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні чутливості експресії генів, які забезпечують синтезу серину, до дефіциту як глютаміну, так і глюкози, і що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, посилює чутливість усіх досліджених генів до цих експериментальних умов за винятком гена *SHMT1*. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глютаміном.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні ролі ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей ERN1 у регуляції експресії генів, задіяних у синтезі і метаболізмі серину, пригнічення яких може бути причетним до зниження проліферативного потенціалу клітин гліобластоми, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК *PSAT1*, *PSPH* та *SHMT1* на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними

мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, що важливо для розробки нових підходів до терапії злоякісних пухлин.

Ключові слова: синтез серину, експресія генів, РНК, гліобластома, ендоплазматичний ретикулум, пригнічення ERN1, гіпоксія, глютамін, глюкоза, промотор, пухлинні клітини, мембрана, АСТВ, ПЛР, ядро.

ANNOTATION

Slusar M.Y. Molecular mechanisms of the serine synthesis gene regulation in glioma 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, 2025.

The dissertation is devoted to the study of the mechanisms of regulating the expression of serine synthesis genes, which plays an important role in the growth of various malignant tumors, including glioblastoma, as it is involved in many metabolic cycles. The main attention was focused on elucidating the role of endoplasmic reticulum stress and hypoxia in regulating the expression of serine synthesis genes, since these factors are important for tumor growth. For this, experiments were conducted using genetically modified glioblastoma cells of the U87MG line, which had suppressed enzymatic activity of ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol-requiring enzyme 1), the main sensor-signaling protein of endoplasmic reticulum stress, and reduced proliferative activity. This is due to the need to clarify the molecular mechanisms of reducing the intensity of proliferation of such glioblastoma cells. The effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the expression of serine synthesis genes in glioma cells was also investigated, depending on the functional activity of the ERN1 signaling protein.

The relevance of this topic is due to the fact that oncological diseases rank second in the world in terms of mortality and their number is constantly increasing with a noticeable lack of effective treatment. Glioblastomas are the most malignant and quite common primary brain tumors, which are difficult to treat and are characterized by a short life expectancy of patients. And that is why intensive search for fundamentally new approaches to deciphering the molecular bases of the pathogenesis of glioblastoma, as well as other malignant tumors, is important and necessary for improving existing and creating new promising strategies for anticancer therapy.

Endoplasmic reticulum stress and hypoxia are extremely important factors in the intensive growth of malignant tumors, which reprogram the genome of tumor cells to increase the supply of nutrients to tumors by activating angiogenesis, developing resistance of tumor cell to various toxic substances, including the toxic effects of hypoxia. In this regard, a detailed study of the regulatory mechanisms underlying these processes will contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms of the growth of malignant tumors and the search for fundamentally new approaches to combating them.

An equally important factor in the growth of malignant tumors is the amino acid serine, which is involved in the regulation of numerous metabolic processes in both normal and tumor cells. Moreover, for the intensive growth of many malignant tumors, it is not so much the level of this amino acid in cells that is important, but its enhanced synthesis. Therefore, knowledge of the molecular mechanisms of regulation of serine synthesis during malignant growth by signaling pathways of endoplasmic reticulum stress and hypoxia is quite important in the search for molecular targets to combat malignant tumor growth.

An important and fundamentally new moment of this work was the clarification of the involvement of the ERN1/IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of the expression of genes that control the synthesis of serine, including the role of endoribonuclease and protein kinase activities of this signaling protein in realizing its effect on gene expression. A separate task of the work was to investigate the effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the gene expression level of key enzymes of serine synthesis in glioblastoma cells depending on

IRE1 inhibition, as this inhibition leads to a decrease in tumor cell proliferation and has a pronounced anti-tumor effect.

In the course of the work, modern methods of biochemistry and molecular biology were used. This is the cultivation of three stably transfected sublines: 1) control U87MG glioblastoma cells transfected with an empty vector, 2) U87MG cells with only the endoribonuclease activity of ERN1 inhibited, and 3) cells without both enzymatic activities of this signaling protein (endoribonuclease and protein kinase), as well as methods of RNA isolation from these glioblastoma cells, measurement of RNA concentration, and their spectral characteristics using a nano-spectrophotometer. To determine the expression of genes, complementary DNA synthesis was first carried out by reverse transcription, and then the mRNA expression level of serine synthesis enzymes, as well as the transcription factor ATF4, which controls the transcription of PSAT1, was determined by the method of real time quantitative polymerase chain reaction. A special method was used to determine miRNA expression, including microRNA polyadenylation, reverse transcription, and amplification. ERN1 and XBP1 mRNA silencing methods were also used to create a model of inhibition of both enzymatic activities of ERN1 or only the main function of the endoribonuclease activity of this protein, namely XBP1 splicing. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Bioinformatics methods were used to analyze the possible mechanisms of expression regulation of the studied genes, and the obtained results were processed statistically.

To find out the role of the signaling protein ERN1 and its enzymatic activities (endoribonuclease and protein kinase), we studied the expression of genes encoding such enzymes of serine synthesis as PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), PSAT1 (phosphoserine aminotransferase 1), PSPH (phosphoserine phosphatase), SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1) and SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2). To find out the mechanisms of regulation of the expression level of the PSAT1 gene, the expression of the transcription factor ATF4 (activating transcription factor 4), which controls *PSAT1* gene expression and is dependent on endoplasmic reticulum stress, was studied.

To study the molecular mechanisms of the dependence of the expression of serine synthesis genes on the stress of the endoplasmic reticulum and in particular its signaling pathway ERN1 in glioblastoma cells, studies were carried out on cells with suppressed enzymatic activities (protein kinase and endoribonuclease) of ERN1 and under conditions of inhibition of only the endoribonuclease of this signaling pathway protein. The dependence of the expression of serine synthesis genes in glioblastoma cells on the functional activity of IRE1 and the possible contribution of these genes to the anti-proliferative effect of IRE1 inhibition was revealed. It was also established that the expression of serine synthesis genes is sensitive to hypoxia conditions and glutamine and glucose deficiency, depending on the functional activity of the signaling protein ERN1.

The obtained results demonstrated that the expression of PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1, SHMT2 and ATF4 genes, which control serine synthesis, depends on the ERN1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress and affects the proliferation of glioblastoma cells.

Also, the dependence of the effects of hypoxia and glutamine or glucose deficiency, which are important factors in tumor growth control, on the expression of these genes on the functional activity of the IRE1 signaling protein was established. Thus, it was shown that inhibition of both enzymatic activities of this signaling protein of endoplasmic reticulum stress in glioblastoma cells of the U87MG line changed the expression level of all the genes we studied genes controlling the synthesis of serine. It was established that the detected changes were different both in magnitude and direction, and that this is due to the peculiarities of the regulation of the expression of the studied genes by the signaling protein IRE1, as well as their functional value, and this reflects the reprogramming of the genome as a result of the inhibition of one of the endoplasmic reticulum stress signaling pathways.

Thus, the level of expression of the PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT2, and ATF4 genes decreased, and the SHMT1 gene significantly increased in glioblastoma cells under conditions of inhibition of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein. Similar changes in the expression of genes controlling the synthesis of serine were also detected under conditions of ERN1 silencing, which indicates the

dependence of changes in the expression of the genes we studied on ERN1, and not on the method of its suppression. The enzymatic activity of PHGDH was also determined and the activity of this enzyme decreased in glioblastoma cells under the conditions of inhibition of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein.

At the same time, under the conditions of inhibition of only the endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein, the expression level of PSAT1 and PSPH genes changed differently in glioma cells with different types of inhibition of the enzymatic activities of the ERN1 signaling protein, which indicates the participation of both ERN1 enzymatic activities in this regulation, their interaction through signaling pathways mediated by them. At the same time, changes in the expression level of the ATF4 gene in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein did not differ significantly in value, which indicated that the detected changes in the expression of these genes were mediated by endoribonuclease rather than protein kinase activity of ERN1. Among the genes we studied, which control the synthesis of serine, there were also those whose expression level changed only under conditions of suppression of both enzymatic activities of ERN1 and did not change in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein. These are the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes. These results indicate that the detected changes in their expression are mediated by the protein kinase activity of the ERN1 protein. Similar changes in the expression of the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes were also detected under the conditions of silencing only ERN1, but not XBP1, which indicates the dependence of the detected changes in the expression of these genes precisely on the protein kinase activity of ERN1. However, the changes in the expression level of the ATF4 gene in glioblastoma cells after ERN1 and XBP1 silencing did not differ significantly in magnitude, which indicated that the detected changes in the expression of this gene were mediated by the endoribonuclease, and not the protein kinase, activity of ERN1, through the formation of XBP1s with the participation of the endoribonuclease activity of this signaling protein.

Western blot analysis of PSAT1, PSPH, and ATF4 proteins showed a decrease in the level of all these proteins both in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of ERN1 and in cells without both enzymatic activities of

this signaling protein, which is consistent with the changes in the expression level of the corresponding mRNAs we detected.

The proliferative potential of glioblastoma cells with suppressed ERN1 was evaluated by two methods (flow cytometry on a BD Accuri C6 Flow Cytometer and by the level of DNA in the cells) and it was shown that inhibition of both enzymatic activities of this signaling protein reduced the proliferative potential of such cells by more than two times and inhibition of ERN1 endoribonuclease activity alone had a significantly greater effect.

Using bioinformatics methods, it was established that the 3'-sequences of PSAT1, PSPH, and SHMT1 mRNAs contain microRNA binding sites: miR-145-5p in PSAT1 mRNA, miR-429-3p in PSPH mRNA, and miR-218-5p in SHMT1 mRNA, and the detected changes in the expression of these microRNAs are oppositely directed to the changes in the expression of the corresponding mRNAs and may be involved in the regulation of mRNA expression of PSAT1, PSPH, and SHMT1 signaling pathways of the ERN1 protein at the post-translational level.

It was also shown that the expression of most genes controlling serine synthesis is sensitive to hypoxia, and the expression level of most of them increases, especially genes such as PHGDH and ATF4, and other genes decrease in control glioblastoma cells transfected with an empty vector. At the same time, in cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1, the sensitivity of the PHGDH, PSAT1, PSPH, and ATF4 genes to the influence of hypoxia changes, which convincingly indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of these genes. The obtained results are the basis for elucidating the mechanisms of tumor cell resistance to the toxic effects of hypoxia under conditions of endoplasmic reticulum stress.

It was also shown that the level of expression of almost all the genes we studied, which control the synthesis of serine, changes both under conditions of glutamine and glucose deficiency, but differently, and that inhibition of both enzymatic (endoribonuclease and protein kinase) activities of the signaling protein ERN1 significantly modifies their effect, but these modifications are gene-specific. Thus, in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, the level of expression of

such genes increases under conditions of glutamine deficiency of *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4*. However, the *SHMT1* gene expression level is dramatically reduced in control glioblastoma cells under conditions of glutamine deficiency. It was also established that the sensitivity of the expression of all these genes to glutamine deficiency changes in glioblastoma cells under conditions of suppression of both (endoribonuclease and protein kinase) activities of the ERN1 protein. Thus, the sensitivity of such genes as *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4* to glutamine deficiency is sharply increased under the conditions of suppression of ERN1, and especially *PSAT1*, while the *SHMT1* gene is decreased. Less pronounced changes in the expression of genes that control the synthesis of serine were detected under conditions of glucose deficiency in the medium compared to glutamine deficiency. Thus, the lack of glucose in the environment led to an increase in the level of expression of the *PHGDH*, *PSAT1*, *SHMT2* and *ATF4* genes in control glioblastoma cells, while the expression of the *PSPH* gene did not change significantly, and the expression of the *SHMT1* gene decreased. However, suppression of ERN1 also significantly changed the sensitivity of expression of all studied genes to glucose deficiency in the medium, especially *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4*. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The scientific novelty of this work is that, for the first time, pronounced changes in the level of expression of genes controlling the synthesis of serine were detected in the culture of glioblastoma cells of the U87MG line under conditions of suppression of IRE1/ERN1, of the main endoplasmic reticulum stress signaling pathway, and the detected changes in the expression of the studied genes were gene-specific and depended on the type of ERN1 knockdown. Increased expression of serine synthesis genes in glioblastoma cells compared to normal astrocytes was also detected, which is an important condition for enhanced growth of malignant tumors, and the decrease in expression of genes that control serine synthesis in cells with suppressed functional activity of ERN1 is well consistent with their reduced proliferative potential. The obtained results demonstrated the important role of endoribonuclease ERN1 in the regulation of *ATF4* gene expression, because both in glioma cells with suppressed

endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1, and in cells without both enzymatic activities of ERN1, the level of expression of this gene did not differ significantly in size. It was shown for the first time that the protein kinase ERN1 is the key regulator of the expression of the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes, since their expression level changed only under the conditions of inhibition of both (endoribonuclease and protein kinase) activities of the ERN1 protein, and inhibition of the endoribonuclease activity of this signaling protein did not significantly affect their level expression.

It is also shown for the first time that the expression of all genes controlling the synthesis of serine is sensitive to hypoxia in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, and the level of expression of these genes changes differently both in the magnitude of the effect and in the direction of changes. It was also established that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1 changes the sensitivity of the PHGDH, PSAT1, PSPH, and ATF4 genes to hypoxia, and this indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes we studied. The basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells, including glioblastoma cells, to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

Fundamentally new results were obtained when studying the sensitivity of the expression of genes that ensure the synthesis of serine to the deficiency of both glutamine and glucose, and that inhibition of both enzymatic activities of ERN1, the main signaling protein of endoplasmic reticulum stress, increases the sensitivity to these experimental conditions of all genes under except SHMT1. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The practical significance of the obtained results lies in revealing the role of protein kinase ERN1 in the regulation of the expression of genes controlling the synthesis of serine, the suppression of which may be involved in reducing the proliferative potential of glioma cells, as well as in the identification of microRNAs that control the expression of PSAT1, PSPH and SHMT1 mRNA at the post-translational level and can be potential targets for inhibiting the proliferation of

glioblastoma cells. The ERN1-dependent sensitivity of glioblastoma cells to hypoxia revealed by us is the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under conditions of endoplasmic reticulum stress, which is important for the development of new approaches to the therapy of malignant tumors.

Keywords: serine synthesis, gene expression, RNA, glioblastoma, endoplasmic reticulum, ERN1 inhibition, hypoxia, glutamine, glucose, promoter, tumor cells, membrane, ACTB, PCR, nuclei.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації:

1. **Sliusar MY**, Minchenko DO, Khita OO, Tsymbal DO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Ratushna OO, Minchenko OH. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. *Endocrine Regulations*, 2023, 57(4): 252-261. doi:10.2478/enr-2023-0028. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії генів SHMT1 та ATF4. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Юлія Вілецька, Сергій Даніловський та Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed (Q3)**

2. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khikhlo YP, Halkin OV, Viletska YM, Khita OO, Minchenko DO. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 759: 110104. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104>. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко і Євген Хіхло допомагали у вивченні експресії генів PHGDH та ATF4. Олена Хіта, Олег Галкін та Юлія Вілецька приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко

керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus, Web of Sciences (Q1)**

3. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Minchenko DO, Viletska YM, Halkin OV, Levadna LO, Cherednychenko AA, Khikhlo YP. Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells. *Endocrine Regulations*, 2024, 58(1): 91-100. doi:10.2478/enr-2024-0010. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка даних та участь у написанні статті)*. Анастасія Чередниченко і Євген Хіхло допомагали у вивченні експресії генів *SHMT1* та *ATF4*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Олег Галкін, Людмила Левадна та Дмитро Мінченко приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

Scopus i PubMed (Q3)

4. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Minchenko DO. Endoplasmic reticulum stress-dependent regulation of the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. *Endocr Reg*, 2024, 58(2): 1-9. doi:10.2478/enr-2024-001x. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена SHMT2 за умов пригнічення ERN1, гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози, обробка даних та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко допомагав у вивченні регуляції експресії цього гена за дефіциту глюкози. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Лузіна та Сергій Даніловський приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed (Q3)**

5. **Слюсар М.**, Хіта О. Вплив гіпоксії на експресію генів, що відповідають за біосинтез серину, у клітинах гліоми з пригніченим ERN1. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 42-43.

6. Khita O, **Sliusar M**, Viletska Y, Minchenko O. Downregulation of the expression of genes responsible for serine synthesis may contribute to suppression of

glioma cell proliferation introduced by ERN1 inhibition. FEBS Open Bio, 2023, 13 (Suppl. S2):64. doi: 10.1002/2211-5463.13646. The 47th FEBS Congress, July 8-12, 2023, Tours, France.

7. Minchenko DO, Khita OO, **Sliusar MY**, Krasnytska DA, Viletska YM, Cherednychenko AA, KhikhloYP, Minchenko OH. Hydrocortisone modifies the impact of tunicamycin, thapsigargin, and hypoxia on the expression of ATF3 and other transcription factors in normal human astrocytes and U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 73.

8. **Sliusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of PSAT1, PSPH, and PHGDH mRNA expressions in U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 79.

9. **Sliusar MY**, Minchenko OH. The endoplasmic reticulum stress controls the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 54.

Abramchuk AI, **Sliusar MY**, Minchenko OH. Regulation of carboxypeptidase E expression in glioblastoma cells is controlled by ERN1. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology", Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 48-50.

. Khikhlo EP, **Sliusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown disrupts the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and associated genes in glioblastoma cells. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology", Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 53-54.