

## АНОТАЦІЯ

*Красницька Д.А.* Експресія генів родини *Homeobox* у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення *IRE1*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню ролі стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів, що кодують ключові транскрипційні фактори родини *Homeobox*, які контролюють процеси проліферації як у нормі, так і за пухлинного росту. Експресію цих генів вивчали у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функціональної активності *IRE1/ERN1*, основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози.

Актуальність цієї теми пов'язана з тим, що онкологічні хвороби посідають друге місце у світі за рівнем захворюваності і смертності, причому ці показники постійно зростають за фактичної відсутності ефективних підходів до лікування. Гліобластома (астроцитом IV ступеня) є найбільш злоякісною і досить поширеною первинною пухлиною головного мозку з агресивним фенотипом, яка важко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю життя пацієнтів. Саме тому пошук нових підходів до розкриття молекулярних основ патогенезу цих злоякісних пухлин є вкрай необхідним для покращення існуючих і створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин шляхом перепрограмування геному у бік активації ангіогенезу, посиленого

забезпечення пухлини поживними речовинами, резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії, то детальне вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих ефектів буде сприяти кращому розумінню молекулярних механізмів росту злоякісних пухлин та пошуку нових підходів боротьби з ними.

Одним з найбільш можливих механізмів перепрограмування геному у пухлинних клітинах за умов стресу ендоплазматичного ретикулума є зміни експресії ключових транскрипційних факторів, що контролюють інтенсивність численних метаболічних процесів у клітинах пухлин і організму в цілому. В цьому плані важливу роль відіграють також транскрипційні фактори родини Nucleobox, причому більшість з них задіяні у рості пухлин і є мішенями для боротьби зі злоякісним ростом.

Важливим моментом цієї роботи було в'яснити роль IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів цих транскрипційних факторів, у тому числі і роль 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 ключових транскрипційних факторів родини Nucleobox у клітинах гліоми в залежності від пригнічення IRE1, що має протипухлинний ефект і знижує проліферативний потенціал клітин гліобластоми.

В ході виконання роботи були використані такі сучасні методи біохімії та молекулярної біології, як культивування стабільно трансфікованих клітин гліобластоми з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 та клітин без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної), виділення РНК, визначення концентрації та спектральних

характеристик отриманих препаратів РНК за допомогою наноспектрофотометра, синтез комплементарних ДНК шляхом зворотної транскрипції, а також методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для визначення рівня експресії мРНК досліджених транскрипційних факторів і мікроРНК, сайленсінг мРНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Для з'ясування ролі сигнального протеїну ERN1 та його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) нами було досліджено експресію генів таких транскрипційних факторів родини Homeobox як ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2), SPAG4 (sperm associated antigen 4), NKX3-1 (NK3 homeobox 1), MEIS1 (Meis homeobox 1), MEIS2, MEIS3; LHX1 (LIM homeobox 1), LHX2, LHX6, TGIF1 (TGFB induced factor homeobox 1), PAX6 (Paired box 6), PBX3 (PBX homeobox 3), PRRX1 (Paired related homeobox 1) і PBXIP1/HPIP (PBX homeobox interacting protein 1 / Hematopoietic PBX-interacting protein). Для в'яснення механізмів залежності рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox від глутаміну було досліджено експресію гена SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5), який кодує синтез переносника глутаміну та деяких інших амінокислот.

З метою вивчення молекулярних механізмів залежності експресії генів родини Homeobox від стресу ендоплазматичного ретикулула і зокрема його сигнального шляху IRE1/ERN1 у клітинах гліобластоми були проведені дослідження на клітинах з пригніченими ензиматичними активностями (протеїнкіназа та ендорибонуклеаза) IRE1 та за умов інгібування лише ендорибонуклеази цього сигнального протеїну.

Проведеними дослідженнями була виявлена залежність експресії генів родини Homeobox у клітинах гліоми від функціонування IRE1 і можливий внесок цих генів до антипроліферативного ефекту пригнічення

IRE1, а також роль протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей цього сигнального протеїну в опосередкованій стресом ендоплазматичного ретикулума регуляції експресії генів родини *Notch*. Була досліджена чутливість експресії генів родини *Notch* до умов гіпоксії та дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності IRE1.

Отримані результати продемонстрували роль IRE1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів родини *Notch*, які контролюють проліферацію пухлинних клітин, а також за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози, що є важливими компонентами підтримання пухлинного росту. Було показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми лінії U87MG змінювало рівень експресії усіх досліджених генів родини *Notch*, але по-різному, як по величині змін, так і по напрямку, що може бути обумовлено особливостями регуляції їх експресії сигнальним протеїном IRE1, а також їх функціональним значенням, особливо за умов репрограмування геному за участі сигнальних шляхів, асоційованих зі стресом ендоплазматичного ретикулума. Так, рівень експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6*, *PBXIP1*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2* і *MEIS1* зростав, а генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6*, *MEIS2* та *MEIS3* – істотно знижувався у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну IRE1.

У той же час, за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 для більшості досліджених генів родини *Notch* зміни в їх експресії були іншими як за величиною, так і напрямком. Разом з тим, рівень експресії генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6* та *MEIS3* у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 і клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 істотно не відрізнявся за величиною, що свідчило про

опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Серед досліджених нами генів родини Homeobox були виявлені і такі, рівень експресії яких змінювався лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 і не змінювався у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1. Ними виявилися гени *PBX3* і *PRRX1*, що вказує на опосередкованість виявлених змін в їх експресії саме протеїнкіназною активністю сигнального протеїну ERN1. Рівень експресії інших генів цієї родини транскрипційних факторів змінювався по-різному у клітинах гліоми з різним типом пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1, що свідчить про участь обох ензиматичних активностей ERN1 у цій регуляції, їх взаємодію через опосередковані ними сигнальні шляхи.

Метами біоінформатики було встановлено, що 3'-последовності мРНК ZEB2 і PAX6 містять сайти зв'язування мікроРНК: miR-145-5p і miR-182-5p в мРНК ZEB2, а miR-19a-3p і miR-96-5p в мРНК PAX6, причому виявлені зміни в експресії цих мікроРНК є протилежно направлені до змін в експресії відповідних мРНК і можуть бути причетними до регуляції експресії мРНК ZEB2 і PAX6 на посттрансляційному рівні.

Показано також, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Homeobox є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії частини із них збільшується, особливо *SPAG4* і *ZEB2* генів, 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 до впливу гіпоксії переважно змінюється, що переконливо свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів цих транскрипційних факторів. Ці результати є підґрунтям для розкриття

механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулула.

Було також показано, що експресія більшості досліджених генів родини Homeobox змінюється як за умов дефіциту глутаміну, так і глюкози, але по-різному, і що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 переважно модифікує їх ефект. Так, у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну знижується рівень експресії таких генів цієї родини транскрипційних факторів: *LHX2*, *LHX6*, *MEIS2*, *PRRX1*, *PBX3* and *SPAG4*. Разом з тим, рівень експресії генів *LHX1*, *MEIS3*, *ZEB2*, *TGIF1*, *PBXIP1*, *PAX6* та *NKX3-1* підвищується у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну. Встановлено також, що чутливість деяких генів транскрипційних факторів родини Homeobox до дефіциту глутаміну змінюється у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1. Так, чутливість таких генів транскрипційних факторів як *PBXIP1*, *NKX3-1* та *PAX6* до дефіциту глутаміну повністю втрачається за умов пригнічення ERN1, а генів *ZEB2*, *LHX1* і *PBX3* – знижується. У той же час, чутливість гена *PBXIP1* до дефіциту глутаміну істотно збільшується у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1. Було також показано, що за умов дефіциту глюкози знижується рівень експресії генів таких транскрипційних факторів, як *PAX6*, *MEIS1* та *MEIS2* у контрольних клітинах гліобластоми. Разом з тим, експресія генів *PBX3* і *PBXIP1* у цих клітинах була резистентною до дефіциту глюкози. Встановлено також, що пригнічення ERN1 змінює чутливість генів транскрипційних факторів *PAX6*, *MEIS1*, *MEIS2*, *PBX3* та *PBXIP1* до дефіциту глюкози. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Наукова новизна цієї роботи полягає в тому, що вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів транскрипційних факторів родини *Homeobox* у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і що виявлені зміни в експресії досліджених генів були геноспецифічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 в регуляції експресії генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6* та *MEIS3*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1, рівень експресії цих генів істотно не відрізнявся. Це переконливо свідчить про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Вперше також показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є ключовим регулятором експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 не впливало на рівень їхньої експресії.

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

Принципово нові результати були отримані при вивченні гіпоксичної регуляції проонкогенного Homeobox гена *SPAG4* у клітинах гліобластоми, які продемонстрували різке зниження його чутливості до гіпоксії за умов пригнічення ERN1 і які вказують на можливу участь транскрипційного фактора *SPAG4* у зниженні інтенсивності проліферації цих клітин за умов нокдауну ERN1.

Показано, що експресія більшості досліджених генів родини Homeobox є чутливою до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що пригнічення сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 переважно модифікує їхні ефекти. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні ролі протеїнкіназної активності ERN1 у регуляції експресії генів, пригнічення якої може бути причетним до посиленої інвазивності клітин гліоми шляхом індукції експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК *ZEB2* і *PAX6* на посттрансляційному 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:** експресія генів, ядро, пригнічення IRE1, стрес ендоплазматичного ретикулума, РНК, АСТВ, ПЛР, гліома, пухлинні клітини, гени родини Homeobox, транскрипція, гіпоксія, дефіцит глутаміну.

## ANNOTATION

*Krasnytska D.A.* Expression of Homeobox family genes in glioma cells under hypoxia and IRE1 inhibition.

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, 2024.

The dissertation is devoted to the study of the role of endoplasmic reticulum stress in regulating the expression of genes encoding key transcription factors of the Homeobox family, which control proliferation processes in normal and tumor growth. The expression of these genes was studied in glioma cells of the U87 line under the conditions of suppression of the functional activity of IRE1/ERN1, the main sensory and signaling protein of endoplasmic reticulum stress, as well as under conditions of hypoxia and glutamine and glucose deficiency.

The relevance of this topic is because oncological pathologies rank second in the world in terms of morbidity and mortality, and these indicators are constantly increasing, and there is practically no effective treatment. Glioblastoma (grade IV astrocytoma) is the most malignant and fairly common primary brain tumor with aggressive behavior that is difficult to treat and characterized by a short life expectancy of patients. That is why the search for new approaches to reveal the molecular basis of the pathogenesis of these malignant tumors is necessary for improving existing and creating new promising strategies of anticancer therapy.

Since endoplasmic reticulum stress and hypoxia are essential factors in the intensive growth of malignant tumors by reprogramming the genome for angiogenesis, enhanced tumor supply with nutrients, resistance of tumor cells to various toxic substances, including the toxic effects of hypoxia, a detailed study of the regulatory mechanisms that underlying these processes will contribute to a

better understanding of the molecular mechanisms of the growth of malignant tumors and the search for new approaches to combating them.

One of the most possible mechanisms of genome reprogramming in tumor cells under endoplasmic reticulum stress conditions is changes in the expression of key transcription factors that control the intensity of numerous metabolic processes in tumor cells and the body as a whole. In this regard, transcription factors of the Homeobox family also play an important role, and most of them are involved in the growth of tumors and are targets for fighting malignant growth.

An important point of this work was to clarify the role of IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of gene expression of these transcription factors, including the role of endoribonuclease and protein kinase activities of this signaling protein in implementation of its influence on gene expression. A separate task of the work was to investigate the effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the expression level of key transcription factors of the Homeobox family in glioma cells depending on the inhibition of IRE1, which has an anti-tumor effect and reduces the proliferation of glioblastoma cells.

In the course of the work, such modern methods of biochemistry and molecular biology were used in the cultivation of stably transfected glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of ERN1 and cells without both enzymatic activities of this signaling protein (endoribonuclease and protein kinase), RNA isolation, determination of the concentration and spectral characteristics of the obtained drugs RNA using a nano-spectrophotometer, synthesis of complementary DNA by reverse transcription, as well as real-time quantitative polymerase chain reaction methods for determining the level of mRNA expression of the studied transcription factors and microRNAs, mRNA silencing, electrophoretic analysis of nucleic acids, methods of bioinformatics and statistical processing of results.

To find out the role of the signaling protein ERN1 and its enzymatic activities (endoribonuclease and protein kinase), we studied the gene expression of such transcription factors of the Homeobox family as ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2), SPAG4 (sperm associated antigen 4), NKX3-1 (NK3 homeobox 1), MEIS1 (Meis homeobox 1), MEIS2, MEIS3; LHX1 (LIM homeobox 1), LHX2, LHX6, TGIF1 (TGFB induced factor homeobox 1), PAX6 (Paired box 6), PBX3 (PBX homeobox 3), PRRX1 (Paired related homeobox 1) and PBXIP1/HPIP (PBX homeobox interacting protein 1 / Hematopoietic PBX-interacting protein).

To find out the mechanisms of the dependence of the level of expression of genes of transcription factors of the Homeobox family on glutamine, the expression of the SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5) gene, which encodes the synthesis of the glutamine carrier and some other amino acids, was studied.

To study the molecular mechanisms of the dependence of Homeobox family gene expression on endoplasmic reticulum stress and in particular its IRE1/ERN1 signaling pathway in glioblastoma cells, studies were conducted on cells with suppressed enzymatic activities (protein kinase and endoribonuclease) of IRE1 and under conditions of inhibition of only the endoribonuclease of this signaling protein.

The conducted studies revealed the dependence of Homeobox gene expression in glioma cells on the functioning of IRE1 and the possible contribution of these genes to the anti-proliferative effect of IRE1 inhibition, as well as the role of protein kinase and endoribonuclease of this signaling protein in endoplasmic reticulum stress-mediated regulation of Homeobox gene expression. The sensitivity of the expression of Homeobox family genes to conditions of hypoxia and glutamine deficiency was investigated, depending on the functional activity of IRE1.

The obtained results demonstrated the role of the IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of the expression of genes of the Homeobox family, which control the proliferation of tumor cells, as well as under conditions of hypoxia and glutamine or glucose deficiency, which are important components of maintaining tumor growth. It was shown that inhibition of both enzymatic activities of IRE1 of the endoplasmic reticulum stress signaling protein in glioblastoma cells of the U87MG line changed the expression level of all studied genes of the Homeobox family, but in different ways, both in the magnitude of the changes and the direction, which may be due to the peculiarities of their regulation expression of the signaling protein IRE1, as well as their functional significance, especially under conditions of genome reprogramming by endoplasmic reticulum stress signaling pathways. Thus, the expression level of PBX3, PRRX1, PAX6, PBXIP1, SPAG4, LHX1, LHX2, and MEIS1 genes increased, and the ZEB2, TGIF1, LHX6, MEIS2, and MEIS3 genes significantly decreased in glioblastoma cells under the conditions of suppression of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein.

At the same time, under the suppression of only the endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1, for most of the studied genes of the Homeobox family, changes in their expression were different both in magnitude and direction of changes. However, the level of expression of ZEB2, TGIF1, LHX6, and MEIS3 genes in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein and cells without both enzymatic activities of ERN1 did not differ significantly in value, which indicated that the detected changes in the expression of these genes were mediated by endoribonuclease and not by the protein kinase activity of ERN1. Among the genes of the Homeobox family studied by us, there were also those whose expression level changed only under the conditions of inhibition of both enzymatic activities of ERN1 and did not change in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein. Thus, the detected changes in the expression of PBX3

and PRRX1 genes are mediated by the protein kinase activity of the ERN1 signaling protein. The level of expression of other genes of this family of transcription factors changed differently in glioma cells with different types of inhibition of the enzymatic activities of the ERN1 signaling protein, which indicates the involvement of both ERN1 enzymatic activities in this regulation, their interaction through signaling pathways mediated by them.

Using bioinformatics methods, it was established that the 3'-sequences of ZEB2 and PAX6 mRNA contain microRNA binding sites: miR-145-5p and miR-182-5p in ZEB2 mRNA, and miR-19a-3p and miR-96-5p in mRNA PAX6, and the detected changes in the expression of these miRNAs are oppositely directed to changes in the expression of the corresponding mRNAs and may be involved in the regulation of ZEB2 and PAX6 mRNA expression at the post-translational level.

It was also shown that the expression of most genes of the Homeobox family transcription factors is sensitive to hypoxia, and the expression level of some of them increases, especially SPAG4 and ZEB2 genes, 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 to the influence of hypoxia mainly changes, which convincingly indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes of these transcription factors that we studied. These results are the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

It was also shown that the expression of most of the investigated genes of the homeobox family changes both under conditions of glutamine and glucose deficiency, but in different ways and that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1 mainly modifies their effect. Thus, in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, under

conditions of glutamine deficiency, the expression level of the following genes of this family of transcription factors decreases: LHX2, LHX6, MEIS2, PRRX1, PBX3, and SPAG4. However, the expression level of LHX1, MEIS3, ZEB2, TGIF1, PBXIP1, PAX6, and NKX3-1 genes is increased in control glioblastoma cells under conditions of glutamine deficiency.

It was also established that the sensitivity of some genes of transcription factors of the Homeobox family to glutamine deficiency changes in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1. Thus, the sensitivity of such transcription factor genes as PBXIP1, NKX3-1, and PAX6 to glutamine deficiency is completely lost under the suppression of ERN1, and the ZEB2, LHX1, and PBX3 genes are reduced. At the same time, the sensitivity of the PBXIP1 gene to glutamine deficiency is dramatically increased in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the ERN1 signaling protein. It was also shown that under conditions of glucose deficiency, the gene expression level of such transcription factors as PAX6, MEIS1, and MEIS2 decreases in control glioblastoma cells. However, the expression of PBX3 and PBXIP1 genes in these cells was resistant to glucose deficiency. It was also established that suppression of ERN1 changes the sensitivity of genes of transcription factors PAX6, MEIS1, MEIS2, PBX3, and PBXIP1 to glucose deficiency. 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 expression level of genes of transcription factors of the homeobox family were detected in the culture of glioblastoma cells of the U87MG line under the conditions of suppression of IRE1/ERN1, the main signaling pathway of endoplasmic reticulum stress, and that the detected changes in the expression of the studied genes were gene-specific and depended on the type of ERN1 knockdown. The obtained results demonstrated the important role of

endoribonuclease ERN1 in the regulation of ZEB2, TGIF1, LHX6, and MEIS3 gene expression, since both in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1 and in cells without both enzymatic activities of ERN1, the expression level of these genes did not differ significantly in magnitude. This strongly indicates that the identified changes in the expression of these genes are mediated by the endoribonuclease, and not the protein kinase activity of ERN1. It was also shown for the first time that the ERN1 protein kinase is a key regulator of PBX3, PRRX1, PAX6, and PBXIP1 gene expression, as suppression of only the endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein did not affect their expression level.

It is also shown for the first time that the expression of most genes of the Homeobox family transcription factors is sensitive to hypoxia, and the level of expression of these genes changes differently both in the magnitude of the effect and in the direction of changes in control glioblastoma cells transfected with an empty vector. It was also established that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the ERN1 signaling protein changes the sensitivity of the vast majority of genes of the Homeobox family to hypoxia, and this indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes of these transcription factors that we studied. These results are the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

Fundamentally new results were obtained when studying the hypoxic regulation of the pro-oncogenic homeobox gene SPAG4 in glioblastoma cells, which demonstrated a sharp decrease in its sensitivity to hypoxia under conditions of ERN1 suppression and which indicates the possible participation of the SPAG4 transcription factor in reducing the intensity of proliferation of these cells under conditions of ERN1 knockdown.

It was shown that the expression of most of the studied genes of the homeobox family is sensitive to both glutamine and glucose deficiency and that

inhibition of the endoplasmic reticulum stress signaling pathway ERN1 preferentially modifies their effects. 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 gene expression, the suppression of which may be involved in increased invasiveness of glioma cells by inducing the expression of PBX3, PRRX1, PAX6 and PBXIP1 genes, as well as in the identification of microRNAs that control the expression of ZEB2 and PAX6 mRNA at the post-translational level and may be potential targets for inhibition of glioblastoma cell proliferation. The ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to hypoxia that we discovered is the basis for revealing the mechanisms of tumor cell resistance 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:** gene expression, nucleus, genome, IRE1 inhibition, endoplasmic reticulum stress, RNA, ACTB, PCR, glioma, tumor cells, Homeobox family genes, hypoxia, glutamine deprivation, glucose deprivation.

#### **Список публікацій здобувача за темою дисертації:**

1. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Bezrodny V.H., Minchenko D.O. The impact of glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2022, 56 (1): 38-47. doi:10.2478/enr-2022-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS3, SPAG4, LHX1 та LHX6, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко і Олена Хіта

допомагали у вивченні експресії гена *MEIS3*. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Дмитро Мінченко, Галина Козинкевич та Борис Безродний приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

2. **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Oksiom N.S., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on *PBX3*, *PBXIP1*, *PAX6*, *MEIS1*, and *MEIS2* gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2023, 57 (1): 37-47. doi:10.2478/enr-2023-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, TBXIP1, TBX3, PAX6 і MEIS2, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко, Наталія Оксіом і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS2*. Дарія Цимбал, Юлія Вілецька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

3. Minchenko D.O., **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Hoian S.L., Minchenko O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. *J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia.* 2023, 1:1-10. doi:10.59657/jedr.brs.23.004. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів TGIF1, ZEB2, PRRX1 та SLC1A5, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *NKX3-1*, *PRRX1* та *SLC1A5*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

4. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Halkin O.V., Rudnytska O.V., Hoian S.L., Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Reg.* 2024, 58(1): 47-56. doi:10.2478/enr-2024-0006. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, MEIS2, MEIS3, LHX6 і SPAG4, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів MEIS3 та LHX6. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Олег Галкін приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus і PubMed**

5. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Minchenko D.O., Viletska Y.M., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on homeobox gene expressions in ERN1 knockdown glioma cells. FEBS-IUBMB-ENABLE 1<sup>st</sup> Int. Mol. Biosciences PhD and Postdoc Conference, 16-18 Nov, 2022, The Institute of Biomedicine of Seville, Spain, 2022: 118.

6. **Krasnytska D.A.**, Minchenko D.O., Khita O.O., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on the expression of homeobox genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. 4<sup>th</sup> RECOOP Int. Student and 17<sup>th</sup> RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 6-9, 2022, Prague, Czech Republic: 133.

7. **Красницька Д.**, Слюсар М., Галкін О., Мінченко О. Залежна від стресу ендоплазматичного ретикулума регуляція експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox у клітинах гліоми. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 33-34.

8. Minchenko D.O., Khita O.O., Sliusar M.Y., **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Cherednychenko A.A., Khikhlo Y., Minchenko O.H. 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.

9. **Krasnytska D.A.**, Sliusar M.Y., Minchenko O.H. ERN1 inhibition modifies the hypoxic regulation of the expression of homeobox genes in U87MG glioblastoma cells. Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2024, BIMCO Journal, Chernivtsi, 2024: 110.