

М. Гром, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,  
Л. Яковенко, канд. биол. наук, Л. Сидорик, канд. биол. наук, О. Корнелюк, д-р биол. наук  
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина,  
В. Григоренко, д-р мед. наук, М. Викарчук, врач  
Институт урологии НАМН Украины, Киев, Украина

### ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗА И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ВЕРОЯТНЫЕ АУТОИММУННЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПАТОГЕНЕЗА РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Показано статистически значимое повышение уровней аутоантител к тирозил-тРНК синтетазе и ее отдельным доменам с просполительными и ангиогенными свойствами у пациентов с раком предстательной железы в сравнении с таким у клинически здоровых доноров. Максимальная аутоагрессия наблюдалась к С-концевому домену фермента, в то время как наиболее низкий уровень аутоантител к N-концевому модулю тирозил-тРНК синтетазы.*

*Ключевые слова:* тирозил-тРНК синтетазы, аутоантитела, рак предстательной железы.

M. Grom, PhD Stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine, Kyiv, Ukraine,  
L. Yakovenko, PhD., L. Sidorik, PhD., A. Kornelyuk, Doctor of Biological Sciences  
Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,  
V. Grygorenko, Doctor of Medical Sciences, M. Vikarchuk, doctor  
SI Institute of Urology NMAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

### TYROSYL-tRNA SYNTHETASE AND ITS SEPARATED DOMAINS ARE SUPPOSITIONAL COMPONENTS OF PROSTATE CANCER PATHOGENESIS

*Elevated levels of autoantibodies against tyrosyl-tRNA synthetase and its separated fragments enriched with proinflammatory and angiogenic properties in sera of patients with prostate cancer were shown. In serum samples of patients the highest levels of autoantibodies against C-terminal domain were observed. Minimal autoreactivity among persons with oncopathology was shown against N-terminal domain of tyrosyl-tRNA synthetase.*

*Key words:* tyrosyl-tRNA synthetase, autoantibodies, prostate cancer.

УДК 577.112.7

А. Харькова, асп.,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Київ,  
О. Мінченко, проф.  
Институт біохімії імені О.В. Палладіна, Київ

### ЭКСПРЕСИЯ ГЕНОВ ПОДИБНЫХ ДО ИНСУЛИНУ ФАКТОРОВ РОСТУ ТА ЇХ РЕЦЕПТОРА У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ З ПРИГНІЧЕНОЮ ФУНКЦІЄЮ ЕНЗИМУ ERN1 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

*Встановлено, що за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 спостерігається зниження рівня експресії генів подібних до інсуліну факторів росту (IGF1 та IGF2), а також зростання експресії гена, що кодує IGF рецептор (IGF1R). За умов відсутності у поживному середовищі глюкози рівень експресії гена IGF1 знижується, а IGF2 та IGF1R – істотно не змінюється. Пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 не впливає на чутливість експресії генів IGF1 та IGF1R до умов дефіциту глюкози у поживному середовищі, але інгібування ERN1 знімає ефект дефіциту глюкози на експресію гена IGF2. Таким чином, експресія генів IGF1, IGF2 та IGF1R, що задіяні у регуляції процесів проліферації клітин гліоми, є чутливою до умов дефіциту глюкози та залежить від функціональної активності ензиму ERN1.*

*Ключові слова:* експресія генів, IGF1, IGF2, IGF1R, клітини гліоми, дефіцит глюкози, ERN1.

**Вступ.** Процеси проліферації, апоптозу та утворення пухлин тісно пов'язані з внутрішньоклітинними шляхами трансдукції сигналів, які є високо чутливими до впливу різноманітних сторонніх чинників. Зміна клітинного гомеостазу, концентрації йонів  $Ca^{2+}$ , нестача глюкози, амінокислот, дія хімічних токсинів, оксидативного стресу, гіпоксії, інгібіторів глікозилювання, тощо викликає в клітині комплекс реакцій відомих під загальною назвою стресу ендоплазматичного ретикулу (ЕР). Це є адаптивна реакція клітини на накопичення в люмені ЕР невірно згорнутих чи не згорнутих протеїнів внаслідок дії різноманітних зовнішніх чи внутрішніх стресових факторів [9].

Сигнальний шлях біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму ERN1/IRE1 $\alpha$  (Endoplasmic Reticulum to Nuclei Signaling 1/Inositol Requiring Enzyme-1  $\alpha$ ), який має серин-треонінкіназну та ендорибонуклеазну активності, являє собою найбільш універсальний та еволюційно консервативний механізм відповіді клітини на стрес ЕР. Ензим ERN1 залучений до початкових реакцій клітини на накопичення неправильно згорнутих протеїнів в ЕР як за фізіологічних, так і патологічних умов, зокрема в процесі розвитку злоякісних пухлин [7, 9]. Шаперони, що

за нормальних умов перебувають у комплексі з ERN1, при накопиченні неправильно згорнутих протеїнів у люмені ЕР дисоціюють. Це призводить до димеризації та аутофосфорилування ERN1, а також активації рибонуклеазного домену ERN1, який здійснює сплайсинг мРНК транскрипційного фактора XBP1 (X-box binding protein 1) та деградацію низки мРНК [1]. У результаті сплайсована форма мРНК транскрипційного фактора XBP1 транслюється з утворенням транскрипційного фактора, що регулює експресію великої групи генів, продукти яких відповідають за фолдинг протеїнів, виживання чи апоптоз клітини в залежності від інтенсивності і тривалості дії стресових чинників [9].

Апоптоз, індукований стресом ЕР, є важливим етапом у розвитку нейродегенеративних захворювань, атеросклерозу, ожиріння, різних форм діабету [14, 19]. З іншого боку, активація реакцій стресу ЕР у пухлинних клітинах, що характеризуються швидким поділом та підвищеним рівнем метаболічних процесів, доводить провідну роль реакцій стресу ЕР у регуляції проліферації та виживання пухлинних клітин [10]. Участь ERN1 у стресових реакціях клітини за умов пухлинного росту підтверджується тим фактом, що інгібування його акти-

вності має протипухлинні ефекти. Зокрема було показано, що клітини гліоми лінії U87 із повним пригніченням ERN1 характеризуються меншими розмірами, нижчою щільністю, уповільненням росту, а також зниженням здатності до утворення пухлин на моделі ембріонів курчат [15], але молекулярні механізми пригнічення пухлинного росту шляхом інгібування ERN1 поки що не до кінця з'ясовані та потребують детального вивчення.

Пухлина, що активно росте, перебуває в умовах гіпоксії, дефіциту поживних речовин, що призводить до функціональних перебудов її метаболізму та репрограмування геному пухлинних клітин з метою адаптації до цих умов [5, 20]. Роль глюкози в проліферації та метаболізмі пухлинних клітин важко переоцінити. Порушення вуглеводного обміну в таких клітинах полягає, поперше, в тому, що катаболізм глюкози здійснюється переважно шляхом її анаеробного окиснення, причому навіть підвищення оксигенації пухлин у процесі ангиогенезу не гальмує гліколітичне розщеплення глюкози, що призводить до підвищення стійкості клітин до гіпоксії [5]. По-друге, в пухлинних клітинах спостерігається інтенсифікація процесу розщеплення вуглеводів у пентозофосфатному шунті, який є основним джерелом пентоз для біосинтезу нуклеїнових кислот, що є вкрай необхідним для проліферації та поділу цих клітин [20].

Важлива роль у регуляції проліферації, виживання та запрограмованої клітинної загибелі за умов онкогенної трансформації належить секреторним факторам росту та протеїнам, що регулюють їх активність. Одним із таких сигнальних шляхів є система інсуліноподібного фактора росту (IGF – Insulin-like Growth Factor), компоненти якої залучені до регуляції проліферації і диференціації клітин у нормі та за багатьох патологічних станів. До системи IGF входять ліганди (IGF1 та IGF2), рецептор IGF1R, секреторні регуляторні протеїни, що зв'язують IGF (IGFBP) та протеази, які здійснюють протеоліз IGFBP, вивільняючи IGF із неактивного комплексу [16]. Результати багатьох досліджень вказують на існування зв'язку між рівнем циркулюючих IGF1 та IGF2 та ризиком утворення пухлин. Так, наприклад, у пацієнтів з акромегалією, коли рівень IGF в плазмі є вищим за фізіологічну норму, ризик розвитку захворювань на рак шлунково-кишкового тракту підвищується [11], і навпаки – говорять про захисний протипухлинний ефект у пацієнтів із вродженою недостатністю IGF1 [2]. Епідеміологічні дослідження показали, що підвищення рівня IGF-1 у плазмі крові асоціюється із підвищеним ризиком розвитку раку простати, тонкого кишечника, молочної залози і прямої кишки [4]. В останні роки було неодноразово показано, що IGF фактори сприяють виживанню, проліферації, міграції та інвазії пухлинних клітин багатьох типів [6, 17]. Виявлено також зв'язок між підвищенням рівня IGF та активацією індукованого гіпоксією ангиогенезу, який є необхідною умовою для росту злоякісних пухлин [13].

**Метою даної роботи** було вивчення впливу дефіциту глюкози на експресію генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 для визначення його ролі у регуляції експресії цих генів та їх можливу причетність до регуляції процесів проліферації у клітинах гліоми, що не експресують функціонально активний ензим ERN1.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на клітинах гліоми людини лінії U87, отриманих із "ATCC" (США). Клітини культивували у поживному середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; "Gibco", "Invitrogen", США) з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), до якого додавали 2 ммоль/л глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят

("Equitech-Bio, Inc.", США), пеніцилін (100 одиниць/мл; "Gibco") та стрептоміцин (0,1 мг/мл; "Gibco") за температури 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>. У цій роботі були використані дві сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини (вектор), що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1; 2) клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1), трансфіковані домінант-негативною конструкцією dnERN1, що експресувала ERN1 без протеїніназного та ендорибонуклеазного доменів. Пригнічення функції ензиму ERN1 було раніше оцінено по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулулу [12]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози спочатку видаляли середовище вирощування, промивали фосфатно-сольовим розчином (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), а потім додавали середовище DMEM без глюкози і витримували протягом 16 годин в інкубаторі.

РНК із клітин гліоми виділяли як було описано раніше [12, 15]. Осади РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосадували етанолом для додаткового очищення від можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію РНК та її спектральні характеристики визначали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК проводили за допомогою "QuantiTect Reverse Transcription Kit" ("QIAGEN", Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі, використовуючи "7900 HT Fast Real-Time PCR System" (Applied Biosystems) або "Mx 3000P QPCR" ("Stratagene", La Jolla, CA, США) та "SYBRGreen Mix" ("AB gene", "Thermo Fisher Scientific", Epsom, Surrey, UK). Ампліфікацію проводили протягом 40 циклів для всіх досліджених генів за таких температурних умов циклу: 95°C – 30 сек., 55°C -30 сек. та 72°C – 30 сек. Нуклеотидні послідовності праймерів, що використовували для ампліфікації кДНК генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R*, послідовності генів, що їм відповідають, а також довжина продуктів ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції наведені в табл. 1. Дизайн та селекцію праймерів проводили у програмі "Primer3web", версія 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>). По рівню експресії мРНК гена бета-актину оцінювали рівень експресії мРНК досліджуваних генів. Олігонуклеотидні праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* виконували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення – програми "Differential expression calculator", статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію однієї проби (one sample *t* test) або *t*-критерію для двох незалежних вибірок. Значення експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* нормалізували по рівню експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %), ефект дефіциту глюкози у клітинах (dnERN1) порівнювали з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози. Представлені середні значення  $\pm m$  чотирьох експериментів.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як видно із даних, приведених у табл. 2, рівень експресії гена *IGF1* за умов дефіциту глюкози у середовищі знижується у контрольних клітинах гліоми (вектор), що мають функціонально активний сенсорно-сигнальний ензим ERN1, (-35 %;  $p < 0,05$ ) у порівнянні з цими ж клітинами гліоми, що росли у середовищі з глюкозою. Разом

з тим, у клітинах з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 (dnERN1) рівень експресії гена *IGF1* також знижується за умов дефіциту глюкози, але значно більшою мірою: -84 % ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і -63 % ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з клітинами гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1 (dnERN1), що росли за присутності глюкози (табл. 2 та рис. 1). Це

свідчить про значно більшу чутливість експресії гена *IGF1* до дефіциту глюкози за умов пригнічення ензиматичної активності сигнального ензиму ERN1. Крім того, було показано, що пригнічення ензиму ERN1 також призводить до зниження рівня експресії гена цього ростового фактора у клітинах гліоми лінії U87 (-57 %;  $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольними клітинами (вектор) за нормальних умов інкубації (табл. 2).

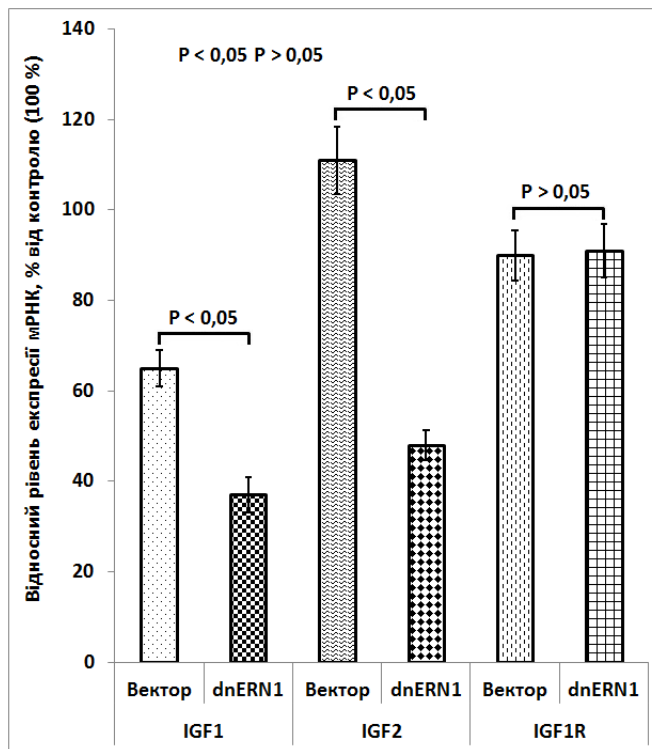
**Таблиця 1.** Олігонуклеотидні праймери, що використовувались для визначення рівня експресії мРНК досліджуваних генів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК

Ген	Послідовності праймерів (п – прямий, з – зворотний)	Відповідні послідовності генів	Довжина ампліфікованого фрагмента (п.н.з.)	Номер гена в базі GenBank
<i>β-актин (ACTB)</i>	п: 5'-cgtaccactggcatcgtgat-3' з: 5'-gtgtggcgtacaggtcttt-3'	п: 704-723 з: 937-918	233	X00351
<i>IGF1</i>	п: 5'-catgtcctcctcgcatctct-3' з: 5'-ggtagcgaatacatctccag-3'	п: 297-316 з: 551-532	254	NM_000618
<i>IGF2</i>	п: 5'-caatggggaagtgcgatgctg-3' з: 5'-ggaaacagcactcctcaacg-3'	п: 763-782 з: 969-950	206	NM_000612
<i>IGF1R</i>	п: 5'-gccactactatgcccgt-3' з: 5'-gtgcatccttggagcatctg-3'	п: 875-856 з: 1111-1092	255	NM_000875

**Таблиця 2.** Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глюкози.

Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину) і представляли у відсотках від контролю (контрольні клітини з вектором), прийнятого за 100 %;  $n = 4$ ; \* –  $p < 0,05$  при порівнянні з контролем

№ п/п	Ген	Дефіцит глюкози у клітинах з вектором	Пригнічення ERN1 (dnERN1)	Дефіцит глюкози у клітинах з dnERN1
1	<i>IGF1</i>	65 ± 4,1 *	43 ± 2,8 *	16 ± 1,7 *
2	<i>IGF2</i>	111 ± 7,5	62 ± 3,8 *	30 ± 2,1 *
3	<i>IGF1R</i>	90 ± 5,6	126 ± 6,26 *	115 ± 7,4



**Рис. 1.** Рівень експресії генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором, та клітинах із домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за дефіциту глюкози по даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували за рівнем експресії гена бета-актину і представляли у відсотках від контролю для клітин з вектором і для клітин з dnERN1, прийнятих за 100 %;  $n = 4$

Встановлено також, що у контрольних клітинах гліоми, що експресують функціонально активний ензим ERN1 (вектор) експресія гена *IGF2* є резистентною до дефіциту глюкози, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 експресія гена цього ростового фактора за умов дефіциту глюкози суттєво знижується: -70 % ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і -52 % ( $p < 0,05$ ), що росли за присутності глюкози (табл. 2 та рис. 1). Пригнічення функції ERN1 у клітинах гліоми за умов присутності глюкози у середовищі також призводить до зниження відносного рівня експресії *IGF2* (-38 %;  $p < 0,05$ ) (табл. 2). Таким чином, пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми не лише знижує рівень експресії гена *IGF2*, а і змінює чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Із даних, приведених у табл. 2 та на рис. 1 видно, що рівень експресії гена *IGF1R* не залежить від дефіциту глюкози як у контрольних клітинах гліоми (вектор) при порівнянні з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози, так і у клітинах гліоми з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1. У той же час, рівень експресії гена рецептора інсуліноподібного фактора росту за умов пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми (dnER1) зростає на 26 %; ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (вектор), що культивували за присутності глюкози у середовищі (табл. 2). Таким чином, пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1 посилює експресію гена *IGF1R* за присутності глюкози, але не впливає на чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Виявлене нами зниження рівня експресії гена *IGF1* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ERN1 за умов культивування цих клітин на повноцінному поживному середовищі, а також за умов дефіциту глюкози, узгоджується з даними літератури про здатність IGF1 посилювати проліферацію та інвазію ряду нормальних і пухлинних клітин, зокрема через активацію міграції та інвазії із залученням різних сигнальних шляхів, активації клітинного поділу насамперед через Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) і пригнічення апоптозу через сигнальний шлях PI3K/Akt (Phosphoinositol-3 Kinase) із залученням адаптерних протеїнів IRS1 та IRS2 (Insuline Reseptor Substrate) [18]. Більше того, отримані нами результати про значне зниження рівня експресії гена *IGF1* узгоджується з даними літератури про зменшення інтенсивності проліферації клітин гліоми лінії U87 з пригніченою активністю ERN1 та росту пухлин з цих клітин [15].

Ростовий фактор IGF2 також відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації, виживання та апоптозу, причому ріст пухлин центральної нервової системи контролюється переважно фактором IGF2 за аутокринним або паракринним механізмом, оскільки результати більшості досліджень свідчать про відсутність активації експресії гена *IGF1* в клітинах гліом, коли експресія гена *IGF2* часто підвищується, що і дозволяє говорити про специфічну регуляцію росту гліом за допомогою IGF2, але не IGF1 [19]. Припускається, що участь IGF-1 у розвитку гліальних пухлин може компенсуватися продуктами інших генів, що експресуються на високому рівні та є залученими до регуляції внутрішньоклітинних сигнальних каскадів MAPK та PI3K [19]. Є також дані про участь IGF-1 у регуляції апоптозу, індукованого стресом ER, що було показано на клітинах карциноми молочної залози людини лінії MCF-7 та фібробластах миші лінії NIH/3T3 [10]. У наших досліджен-

нях за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми людини лінії U87 було показано майже двократне зниження відносного рівня експресії обох генів (*IGF1* та *IGF2*), що може мати певний вклад у пригнічення проліферації клітин гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1. В той же час нами було показано підвищення відносного рівня експресії *IGF1R* за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму стресу ER. Підвищення відносного рівня експресії гена, що кодує рецептор IGF, за даних експериментальних умов можна пояснити компенсаторними механізмами адаптації клітини до зниження кількості лігандів (IGF1 та, особливо, IGF2). Аналогічні ефекти можна спостерігати на клітинах, що на високому рівні експресують інсулінові рецептори (наприклад, панкреатичні  $\beta$ -клітини). Так, було показано, що за умов зниження кількості інсуліну, підвищення рівня експресії гена інсулінового рецептора та *IRS2*, що кодує внутрішньоклітинний адапторний протеїн, який передає сигнал від інсулінового рецептора в середину клітини, попереджає розвиток діабету [8].

Одержані результати розкривають нові аспекти молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов інгібування сенсорно-сигнального ензиму стресу ER ERN1 за рахунок змін в експресії генів інсуліноподібних факторів росту (*IGF1* та *IGF2*) та їх рецептора (*IGF1R*), залучених до регуляції процесів проліферації, виживання та апоптозу, а також залежність їх експресії за умов дефіциту глюкози від сигнальних шляхів стресу ER, опосередкованого сенсорно-сигнальним ензимом ERN1.

Таким чином, результати даної роботи вказують на те, що експресія генів *IGF1*, *IGF2* та *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87 контролюється опосередкованою ERN1 сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулу, а виявлені зміни у функціонуванні системи подібного до інсуліну фактора росту за умов інгібування ензиму ERN1 можуть сприяти пригніченню проліферації цих клітин, оскільки протеїнові продукти цих генів є ключовими активаторами росту гліоми *in vitro* та *in vivo*.

## Висновки

1. Встановлено, що повне пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 призводить до зниження відносного рівня експресії генів *IGF1* і *IGF2* та посилення експресії гена *IGF1R* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування.

2. Показано, що у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози знижується рівень експресії лише гена *IGF1*, а пригнічення ензиму ERN1 змінює чутливість клітин до цих умов, посилюючи ефект дефіциту глюкози на експресію гена *IGF1* та індукує зміни в експресії гена *IGF2*.

3. Результати цієї роботи свідчать про можливу участь генів інсуліноподібних факторів росту та їх рецептора у регуляції процесів проліферації клітин гліоми людини лінії U87 та про чутливість експресії цих генів до умов дефіциту глюкози в залежності від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

## Список використаної літератури.

- Aminzadeh S. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor / S. Aminzadeh, S. Vidali, W. Sperl [et al.] // Translation pediatrics. – 2015. – Vol. 4, N 1. – P. 20–32.
- Auf G. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 $\alpha$  and promotes autocrine growth through EGF receptor / G. Auf, A. Jabouille, M. Delugin [et al.] // BMC cancer. – 2013. – Vol. 13, N 597. – P. 59701–59712.
- Clarke H. Endoplasmic reticulum stress in malignancy / H. Clarke, J. Chambers, E. Liniker, S.J. Marciniak // Cancer cell. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.

4. Clemmons D.R. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer / D. Clemmons // Nature reviews. Drug discovery. – 2007. – Vol. 6, N 10. – P. 821–833.

5. Dmitrenko V.V. Expression of genes belonging to the IGF system in glial tumors / V.V. Dmitrenko, V.M. Kavsan, O.I. Boyko [et al.] // Tsitologiya i genetika. – 2011. – Vol. 45, N 5. – P. 41–57.

6. Girnita L. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation / L. Girnita, C. Worrall, S. Takahashi [et al.] // Cellular and molecular life science. – 2014. – Vol. 71, N 13. – P. 2403–2427.

7. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. Weinberg // Cell. – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674.

8. Harding H. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review / H. Harding, D. Ron // Diabetes. – 2002. – Vol. 51, N 3. – P. 455–461.

9. Hennige A. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes / A. Hennige, D. Burks, U. Ozcan [et al.] // The journal of clinical investigations – 2003. – Vol. 112, N 10. – P. 1521–1532.

10. Hoeben A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis / A. Hoeben, B. Landuyt, M. Highley [et al.] // Pharmacological reviews. – 2004. – Vol. 56, N 4. – P. 549–580.

11. Kauppinen-Makelin R. Increased cancer incidence in acromegaly – a nationwide survey / R. Kauppinen-Makelin, T. Sane, M. Valimaki [et al.] // Clinical endocrinology (Oxf.). – 2010. – Vol. 72, N 2. – P. 278–279.

12. Korennykh A.V. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 / A.V. Korennykh, P.F. Egea, A.A. Korostelev [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 687–693.

13. Maxfield F.R. Role of cholesterol and lipid organization in disease / F.R. Maxfield, I. Tabas // Nature. – 2005. – Vol. 438, N 7068. – P. 612–621.

14. Minchenko D.O. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown. / D.O. Minchenko, K.I. Kubajchuk, O.O. Ratushna [et al.] // Advances in biological chemistry. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.

15. Novosyadlyy R. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. Cell death and differentiation. – 2008. – Vol. 15, N 8. – P. 1304–1317.

16. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update / M. Pollak // Nature reviews. Cancer. – 2012. – Vol. 12, N 3. – P. 159–169.

17. Shevah O. Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report / O. Shevah, Z. Laron // Growth hormone and IGF research. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 54–57.

18. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players / K. Siddle // Journal of molecular endocrinology. – 2011. – Vol. 47, N 1. – P. 101–110.

19. Taouji S. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling / S. Taouji, S. Wolf, E. Chevet // Progress in molecular biology and translational science. – 2013. – Vol. 117. – P. 465–484.

20. Yoon J.H. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors / J.H. Yoon, J. Kim, K.L. Kim [et al.] // Proteomics. – 2014. – Vol. 14, N 12. – P. 1494–1502.

#### References

1. Aminzadeh S, Vidali S., Sperl W., Kofler B, Feichtinger RG. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor. Transl Pediatr. 2015;4(1):20–32.

2. Auf G, Jabouille A, Delugin M, Guérit S, Pineau R, North S, et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 $\alpha$  and promotes autocrine growth through EGF receptor. BMC Cancer. 2013 ;13(1):597.

3. Clarke H, Chambers J, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. Cancer Cell. 2014;25(5):563–73.

4. Clemmons DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. Nat Rev Drug Discovery. 2007;6(10):821–33.

5. Dmitrenko VV, Kavsan VM, Boyko OI, Rymar VI, Stepanenko AA, Balynska OV, et al. Expression of genes belonging to the IGF system in glial tumors. Tsitol Genet. 2011;45(5):41–57.

6. Girnita L, Worrall C, Takahashi S, Seregard S, Girnita A. Something old, something new and something borrowed: emerging paradigm of insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) signaling regulation. Cell. Mol. Life Sci. 2014;71(13):2403–27.

7. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646–74.

8. Harding H, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. Diabetes. 2002;51(3):455–61.

9. Hennige A, Burks D, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, et al. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. J. Clin. Invest. 2003;112(10):1521–32.

10. Hoeben A, Landuyt B, Highley M, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol. Rev. 2004;56(4):549–80.

11. Kauppinen-Makelin R, Sane T, Valimaki MJ, Markkanen H, Niskanen L, Ebeling T, et al. Increased cancer incidence in acromegaly – a nationwide survey. Clin. Endocrinol. (Oxf.) 2010;72(2):278–9.

12. Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. Nature. 2009;457(7230):687–93.

13. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature. 2005;438(7068):612–21.

14. Minchenko DO, Kubajchuk KI, Ratushna OO, Komisarenko SV, Minchenko OH. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown. Adv Biol Chem. 2012;2(2):198–206.

15. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. Cell Death Differ. 2008;15(8):1304–17.

16. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. Nat Rev Cancer. 2012;12(3):159–69.

17. Shevah O, Laron Z. Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: a preliminary report. Growth Horm. IGF Res. 2007;17(1):54–7.

18. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. J. Mol. Endocrinol. 2011;47(1):101–10.

19. Taouji S, Wolf S, Chevet E. Oligomerization in endoplasmic reticulum stress signaling. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2013;117:465–84.

20. Yoon JH, Kim J, Kim KL, Kim DH, Jung SJ, Lee H, et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. Proteomics. 2014;14(12):1494–502.

Надійшла до редколегії 16.05.16

A. Харькова, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,

A. Minchenko, проф.

Інститут біохімії імені А.В. Палладина, Київ, Україна

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИНСУЛИНОПОДОБНЫХ ФАКТОРОВ РОСТА И ИХ РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ С УГНЕТЕННОЙ ФУНКЦИЕЙ ЭНЗИМА ERN1 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛЮКОЗЫ

Установлено, что при ингибировании сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума ERN1 в клетках глиомы линии U87 наблюдается снижение уровня экспрессии генов инсулиноподобных факторов роста (IGF1 и IGF2), а также увеличения уровня экспрессии гена, который кодирует рецептор IGF (IGF1R). В условиях отсутствия в питательной среде глюкозы уровень экспрессии гена IGF1 уменьшается, а IGF2 и IGF1R – существенно не изменяются. Ингибирование функциональной активности энзима ERN1 не влияет на чувствительность экспрессии генов IGF1 и IGF1R к условиям дефицита глюкозы в питательной среде, но ингибирование ERN1 снимает эффект дефицита глюкозы на экспрессию гена IGF2. Таким образом, экспрессия генов IGF1, IGF2 и IGF1R, которые принимают участие в регуляции процессов пролиферации клеток глиомы, чувствительна к дефициту глюкозы и зависит от функциональной активности энзима ERN1.

Ключевые слова: экспрессия генов, IGF1, IGF2, IGF1R, клетки глиомы, дефицит глюкозы, ERN1.

A. Kharkova, PhD stud.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,

O. Minchenko, prof.

Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

### EXPRESSION OF INSULIN LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR RECEPTOR GENES IN GLIOMA CELLS WITH SUPPRESSED FUNCTION OF ERN1 ENZYME UPON GLUCOSE DEPRIVATION

It was shown that the expression level of insulin like growth factors (IGF1 and IGF2) genes is decreased, but IGF receptor (IRF1R) gene is significantly increased in U87 glioma cells with suppressed activity of the sensor and signaling enzyme ERN1. In U87 glioma cells the expression level of IGF1 gene is decreased but IGF2 and IGF1R do not change significantly upon glucose deprivation condition. The inhibition of ERN1 functional activity does not affect the sensitivity of IGF1 and IGF1R gene expressions to glucose deprivation but the inhibition of ERN1 eliminates