

Мінченко Д.О.^{1,2},
Губеня О.В.^{2,3},
Харькова А.П.²,
Мурашко Н.К.³,
Мінченко О.Г.²

ВПЛИВ ІШЕМІЇ ТА ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ НЕЙРОТРОПНИХ ФАКТОРІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ U87 ЗАЛЕЖИТЬ ВІД ФУНКЦІЇ ГЕНА ЕНДОПЛАЗМАТИЧНИЙ РЕТИКУЛУМ-ЯДРО-1

¹ Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (м. Київ)

² Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України (м. Київ)

³ Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (м. Київ)

Резюме. Досліджували вплив ішемії (середовище без глюкози або глутаміну) та гіпоксії на експресію генів важливих регуляторів проліферації, регенерації та функціональної активності клітин головного мозку (NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 і SLC1A1) в клітинах гліоми лінії U87 та її залежність від функції гена ендоплазматичний ретикулум — ядро (ERN1). Встановлено, що блокада функції гена ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до суттєвого зниження експресії мРНК NPDC1, PSEN1 і SLC1A1 та до посилення експресії мРНК PRNP і BDNF. Крім того, було показано, що гіпоксія значно посилює експресію мРНК більшості досліджуваних генів за винятком PSEN1 та PRNP у контрольних клітинах гліоми лінії U87, а у клітинах з пригніченою функцією гена ERN1 — лише двох генів: NPDC1 і PSEN1. За умов відсутності у середовищі глюкози або глутаміну спостерігається збільшення рівня експресії мРНК PRNP і зниження — PNPLA6, BDNF та SLC1A1 у клітинах з пригніченою функцією гена ERN1, а у контрольних клітинах гліоми рівень експресії мРНК PRNP та PNPLA6 збільшується і знижується рівень експресії лише мРНК BDNF. Таким чином, результати даної роботи свідчать про суттєві зміни в експресії ряду нейротропних генів у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та ішемії, а також за умов блокади функції гена ERN1, причому величина ефекту гіпоксії та ішемії на експресію більшості досліджуваних генів залежить від функції гена ERN1.

Ключові слова: клітини гліоми U87, гіпоксія, ішемія, експресія генів, ERN1, NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6, SLC1A1

Гіпоксія є однією із характерних рис злоякісних пухлин і значною мірою визначає інтенсивність їх росту. І якщо роль індукованого гіпоксією транскрипційного фактора HIF в рості злоякісних пухлин достатньо добре вивчена, то роль додаткових механізмів ще недостатньо з'ясована [1–5]. Відомо, що за умов гіпоксії та ішемії, коли має місце не лише дефіцит кисню, а і АТФ, глюкози та амінокислот, в ендоплазматичному ретикулумі клітин спостерігається накопичення неправильно згорнутих протеїнів та індукція комплексу внутрішньоклітинних сигнальних подій (Unfolded Protein Response), які сприймаються трьома сенсорними сигнальними системами: активуючого транскрипційного фактора 6 (ATF6), протеїнкіназою ендоплазматичного ретикулуму (PERP) та сигнальним фактором-ензимом ендоплазматичний ретикулум — ядро (ERN1), що має ще одну назву — залежного від інозитулу ензиму-1 альфа (IRE-1 альфа) [6–8]. Таке порушення процесу згортання протеїнів в

ендоплазматичному ретикулумі отримало назву "стресу ендоплазматичного ретикулуму" і спостерігається також за дії ряду інших чинників, зокрема ряду хімічних сполук. Індукція комплексу внутрішньоклітинних сигнальних шляхів у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму направлена перш за все на протидію різноманітним впливам на клітину або на адаптацію до них.

Найбільш важливою, ключовою сигнальною системою є ERN1, трансмембранний протеїн, N-кінцева сенсорна частина якого знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, а C-кінцева частина — у цитоплазмі [9, 10]. Він має дві каталітичні ділянки, серин/треонін-кіназу та ендорибонуклеазу, які є складовими ERN1 сигналювання, причому цей біфункціональний ензим є не лише сенсором стресу ендоплазматичного ретикулуму, а і медіатором порушення згортання протеїнів.

Недавно було встановлено, що зв'язування неправильно згорнутих протеїнів з сенсорною

дільником ERN1 ініціює активацію серин/треонін-кінази та його димеризацію, причому саме серин/треонін-кіназна активність ERN1 відповідає за аутофосфорилування та димеризацію даного ензиму [10, 11]. Димеризація ERN1 є надзвичайно важливим етапом в активній сигнальній системі ERN1, що призводить до індукції ендорибонуклеазного домену ERN1, а це, в свою чергу, ініціює сплайсинг мРНК ХВР1 (зв'язаний з Х-боксом промотора 1) та зміни в JNK-сигналюванні, а також ініціює деградацію ряду мРНК [11, 12].

Ізоформа мРНК ХВР1, що експресується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму, є вкороченою на 23 нуклеотидних записки, але кодує синтез більшого за розміром транскрипційного фактора зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця. Цей транскрипційний фактор контролює експресію великої групи генів сигнальної системи ERN1, що контролюють згортання протеїнів та забезпечують виживання клітин за умов гіпоксії, нестачі чи дії інших чинників, або знищують їх, посилюючи апоптоз [13, 14]. Недавно було показано, що транскрипційний фактор ХВР1 має сайти зв'язування в промоторних ділянках великої групи генів [15]. Разом з тим, є дані, що в умовах стресу ендоплазматичного ретикулуму навіть пригнічення кіназної активності ERN1 призводить до активації його ендорибонуклеазної активності для захисту клітин від дії стресових чинників [16].

Встановлено, що ERN1 сигнальний каскад є важливим також для індукованої ішемією експресії ендотеліального фактора росту судин А (VEGFA) і вносить свій вклад в ангиогенез та ріст злоякісних пухлин *in vivo* [17]. Це було показано в дослідженнях, які були проведені на двох експериментальних моделях пухлин (імплантація пухлини в мозок мишей та в ембріони курчат) і які також продемонстрували, що сигнальний шлях ERN1 тісно пов'язаний не лише з процесом неоваскуляризації і росту пухлин, а і з процесом апоптозу клітин [17, 18]. Більше того, численні дослідження показали, що стрес ендоплазматичного ретикулуму є одним із факторів, який забезпечує виживання клітин злоякісних пухлин в умовах гіпоксії та активує ріст пухлин [5, 8, 9, 11, 17].

Незважаючи на те, що у контролі росту злоякісних пухлин, в тому числі і гліом, задіяно багато різних протеїніназ, сигнальний ензим ERN1 також відіграє важливу роль у контролі

росту пухлин, на що вказують недавно виявлені мутації гена ERN1 у різних злоякісних пухлинах людини [19].

Всі три сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулуму представлені трансмембранними протеїнами, що здатні зв'язувати неправильно згорнуті протеїни та шаперон ВіР (GRP78, HSPA5) своєю сенсорною частиною, що знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму. Встановлено, що експресія шаперона ВіР також посилюється у відповідь на стрес, а в цитозольній частині цих сенсорів генеруються сигнали, що передаються до ядра і опосередковують відповідь клітини на стрес, яка може бути направлена як на виживання клітин, так і на їх загибель шляхом апоптозу в залежності від характеру чинника, що індуктує стрес, та інтенсивності його дії [8, 10, 12, 14, 20]. Всі три сигнальні системи не є ізольованими, вони тісно взаємодіють між собою, оскільки їх функціональна роль є спільною і полягає у зміні метаболізму клітини з метою її адаптації до умов стресу або протидії йому, хоча реагують вони переважно на різні види стресу ендоплазматичного ретикулуму.

На даний час залишається майже не дослідженим питання про роль нейротропних факторів, що є важливими регуляторами проліферації, регенерації та функціональної активності клітин головного мозку, в системі стресу ендоплазматичного ретикулуму. Найбільш вивченими нейротропними факторами є фактор контролю проліферації та диференціації нервової системи (NPDC1), презенлін 1 (PSEN1), нейротропний фактор мозку (BDNF), пріон-протеїн (PRNP), подібна до пататіну з доменом 6 фосфоліпаза (PNPLA6) та специфічний для мозку високоафінний переносник глутаміну (SLC1A1) [21 – 28]. Фактор NPDC1 є негативним регулятором проліферації клітин нервової системи і пригнічує їх трансформацію, а презенлін 1 приймає участь у багатьох процесах: він є важливим компонентом системи аутофагії клітин, задіяний у розщепленні рецептора Notch, регулює процесінг попередника амілоїдного протеїну, впливаючи на активність гама-секретази, ензиму, що розщеплює цього попередника, хоча також не виключена можливість наявності в молекулі презенліну 1 специфічної протезної активності. Недавно були виявлені мутації в гені презенліну 1 у пацієнтів із спадковою формою хвороби Альцгеймера.

Нейротропний фактор мозку BDNF є представником родини факторів росту нервів. Встановлено, що він є важливим для життєдіяльності певних нейронів головного мозку, але його функціональне значення досліджено ще недостатньо. Виявлено зниження рівня експресії гена цього нейротропного фактора за хвороби Альцгеймера. Припускається, що нейротропний фактор BDNF може відігравати важливу роль в реакції клітин головного мозку на стрес.

Ген PNPLA6 кодує синтез фосфоліпази, подібної до пататіну, яка містить домен 6. Цей ген має ще одну назву — естераза, що є мішенню за нейропатії (neuropathy target esterase — NTE), оскільки він є мішенню ряду отруйних хімічних сполук, що індукують розвиток нейродегенеративних процесів, нейропатій. Білковий продукт гена PNPLA6 приймає участь в процесах розвитку головного мозку, диференціації клітин, а також у нейродегенеративних процесах. Встановлено, що цей ензим локалізується в мембранах ендоплазматичного ретикулуму, але його каталітична частина направлена в цитоплазму як у нейронах, так і в гліальних клітинах, причому активність фосфоліпази PNPLA6 регулюється cAMP-залежною протеїнкіназою A.

Ген SLC1A1 кодує синтез високо афінного переносника глутамату, який забезпечує транспорт глутамату через плазматичну мембрану клітин головного мозку, а крім того він є вирішальним в зупинці пост-синаптичної дії нейротрансмітера глутамату та в збереженні позаклітинної концентрації глутамату на рівнях, що не є нейротоксичними. Встановлено, що цей переносник забезпечує транспорт не лише глутамату, а і аспартату.

Метою даної роботи було вивчити вплив ішемії та гіпоксії на експресію генів нейротропних факторів NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 та SLC1A1, а також її залежність від функції сигнального шляху ERN1 у клітинах гліом, найбільш злоскісних пухлин мозку, що дуже важко піддаються лікуванню і є найбільшою проблемою антипухлинної терапії.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проведені на клітинах гліоми лінії U87 та сублінії цих клітин з пригніченою експресією гена, яку було отримано в результаті селекції клонів, стабільно трансфекованих доміант-негативною конструкцією ERN1 у векторі pcDNA3.1 [17]. Як контроль були вико-

ристані клітини, стабільно трансфековані експресійним еукаріотичним вектором pcDNA3.1. Ростили клітини у середовищі DMEM, як описано раніше [17]. При дослідженні впливу гіпоксії, клітини гліоми витримували протягом 16 годин в інкубаторі, у якому підтримували концентрацію кисню та диоксиду вуглецю на рівні 3 та 5 %, відповідно. Ефекти ішемії моделювали шляхом заміни середовища вирощування клітин на середовище без глюкози або без глутаміну і витримували клітини в інкубаторі протягом 16 годин.

Виділення РНК. РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Trizol (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу виробника, як описано раніше [29]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Аналіз експресії мРНК NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 та SLC1A1. Експресію мРНК NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 та SLC1A1 досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycler" (США), використовуючи SYBRGreen Mix (AB gene, Epson, Великобританія). Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) як матрицю використовували тотальну РНК із різних органів щурів. Синтез кДНК проводили за допомогою набору "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короткочасно (протягом 2 хвилин) інкубували з буфером gDNA Wipeout, а потім з Quantiscript зворотною транскриптазою в присутності суміші праймерів (Primers mix) та буферу, що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів при 42°C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хвилин і отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

При проведенні полімеразної ланцюгової реакції були використані такі пари праймерів:

для NPDC1 5'-GACTCAGAAGGCCGACTACG -3' і 5'-TCCTTGGGTGGCTCTT-TATG -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 880 - 899 та 1044 - 1025 кДНК NPDC1 людини (GenBank номер NM_015392);

для PSEN1 5'- GTTAAAGC-CTCAGCAACAGC -3' і 3'- AAACAAGC-CCAAAGGTGATG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1260 - 1279 та 1413 - 1384 кДНК PSEN1 людини (GenBank номер NM_007319);

для BDNF 5'- GCCCTGTATCAACCCAGAAA -3' і 3'- CTTTCAGAGGC-CTTCGTTTTG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2234 - 2253 та 2436 - 2417 кДНК BDNF людини (GenBank номер NM_001709);

для PRNP 5'- AAACCCGACAACATTTCTGC -3' і 3'- CAGCTGCTGTGTAGCC-CATA -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 1576 - 1585 та 1751 - 1732 кДНК PRNP людини (GenBank номер NM_000311);

для PNPLA6 5'- CATCGACTGCTTCAAGACCA -3' і 3'- GCGGCTCTCATTAAGGTCTG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 3820 - 3839 та 3976 - 3957 опублікованої кДНК PNPLA6 людини (GenBank номер NM_006702) і для SLC1A1 5'- CCTGGTGTACCCAGAAAGT -3' і 3'- GGAG-GCTTCACTTCTTCACG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 605 - 624 та 768 - 749 опублікованої кДНК SLC1A1 людини (GenBank номер NM_004170).

Відносну кількість транскриптів NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 та SLC1A1 розраховували по кількості транскриптів бета-актину. Для ампліфікації бета-актину використовували наступні праймери: прямий — 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний - 5'- AGCACTGTGTTGGCCGTACAG -3'.

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три незалежно виділених препарати РНК. Аналіз результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз — в Excel програмі.

Результати дослідження та їх обговорення

Як видно із даних, приведених на рисунку 1, рівень експресії гена контролю проліферації та диференціації нервової системи NPDC1 за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції знижується на 28 % у субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, порівняно з контрольними клітинами лінії U87, які були трансфеговані еукаріотичним експресійним вектором pcDNA3.1 без вставки. У клітинах, що знаходилися протягом 16 годин в умовах гіпоксії, рівень експресії гена NPDC1 збільшувався, причому ефект гіпоксії проявлявся як у контрольних клітинах (+ 37 %), так і в клітинах з пригніченою функцією гена ERN1 (+ 29 %). Для моделювання умов ішемії клітини витримували протягом 16 годин в середо-

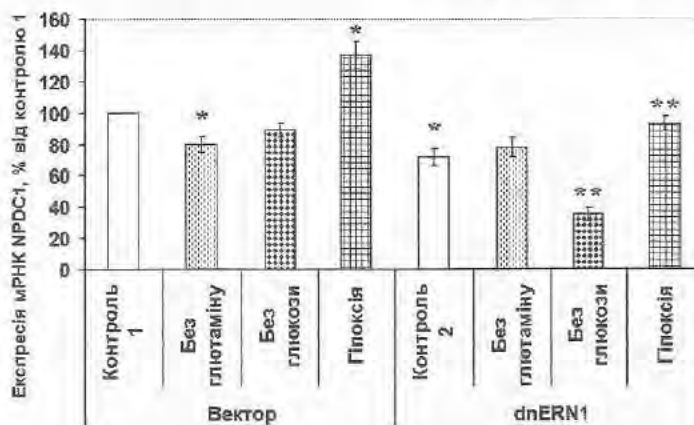


Рис. 1. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК фактор контролю проліферації та диференціації нервової системи (NPDC1) у клітинах гліоми лінії U87, трансфегованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та субліній цих клітин, трансфегованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум – ядро 1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК NPDC1 нормалізували по експресії бета-актину; n = 3. У цьому та наступних рисунках: Контроль 1 – клітини, трансфеговані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфеговані dnERN1; * – P < 0,05 у порівнянні з контролем 1, а ** – P < 0,05 у порівнянні з контролем 2

вищі без глюкози або без глютаміну. Із приведених на рисунку 1 даних видно, що рівень експресії мРНК гена NPDC1 істотно не змінювався у субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 за умов відсутності глютаміну у середовищі, але в контрольних клітинах лінії U87, які були трансфеговані еукаріотичним експресійним вектором рсDNA3.1 без вставки, спостерігалось зниження рівня експресії цього гена на 20 %. В той же час, за умов відсутності глюкози у середовищі рівень експресії мРНК гена NPDC1 істотно не змінювався в контрольних клітинах лінії U87 і вдвічі знижувався у клітинах з пригніченою функцією гена ERN1.

На рисунку 2 приведені результати дослідження рівня експресії гена презеніліну 1 (PSEN1) за умов гіпоксії та ішемії у клітинах гліоми лінії U87 та в субліній клітин з пригніченою функцією гена ERN1. Встановлено, що рівень експресії мРНК презеніліну 1 за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції знижується на 24 % у субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 порівняно з контрольними клітинами лінії U87. За умов гіпоксії рівень експресії гена PSEN1 на 38 % збільшувався, але лише в клітинах з пригніченою функцією гена ERN1. В той же час, за відсутності у середовищі глюкози рівень експресії мРНК гена PSEN1 істотно не змінювався як у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, так і в контрольних клітинах лінії U87, а за відсутності у середо-

вищі глютаміну спостерігалось значне збільшення рівня експресії мРНК презеніліну в клітинах з пригніченою функцією гена ERN1 і в контрольних клітинах (+ 80 та + 64 %, відповідно).

Рівень експресії гена пріон-протеїну (PRNP) також суттєво змінювався як у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, так і в контрольних клітинах лінії U87 за дії гіпоксії та ішемії (рисунком 3). Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії мРНК гена пріон-протеїну в клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 є на 17 % більшим у порівнянні з контрольними клітинами лінії U87, а за умов гіпоксії він знижується на 21 %, але лише в субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1. За відсутності у середовищі глюкози або глютаміну рівень експресії мРНК PRNP збільшується як у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, так і в контрольних клітинах лінії U87, але за відсутності у середовищі глютаміну спостерігалось більш виражене (більше ніж вдвічі) збільшення рівня експресії мРНК PRNP як у клітинах з пригніченою функцією гена ERN1, так і в контрольних клітинах (+ 65 та + 46 % за відсутності у середовищі глютаміну і + 29 та + 14 % за відсутності у середовищі глюкози, відповідно).

Як видно із даних, приведених на рисунку 4, рівень експресії гена нейротропного фактора мозку (BDNF) збільшувався в клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 на

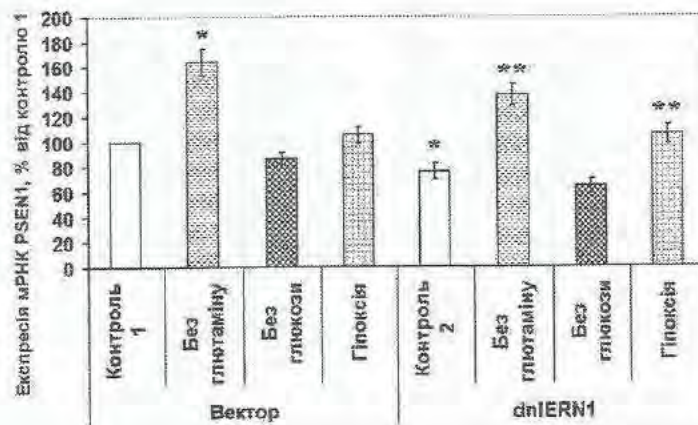


Рис. 2. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК презеніліну 1 (PSEN1) у клітинах гліоми лінії U87, трансфегованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та субліній цих клітин, трансфегованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум — ядро 1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК PSEN1 нормалізували по експресії бета-актину; n = 3.

69 %, порівняно з контрольними клітинами лінії U87, але істотно не змінювався за умов гіпоксії у субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, в той час як у контрольних клітинах лінії U87 збільшувався лише на 15 %. В той же час, за відсутності у середовищі глютаміну або глюкози рівень експресії мРНК BDNF зменшувався як у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, так і у контрольних клітинах лінії U87.

Проведеними дослідженнями також було встановлено, що рівень експресії гена подібної до пататіну фосфоліпази з доменом 6 (PNPLA6) істотно змінювався як у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, так і в контрольних клітинах лінії U87 за відсутності у середовищі глюкози або глютаміну, але різнонаправлено (рисунок 5). Так, за відсутності у середовищі глюкози або глютаміну рівень експресії мРНК PNPLA6 зменшувався вдвічі у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, тоді як у контрольних клітинах лінії U87, навпаки, спостерігалось збільшення рівня експресії мРНК PNPLA6. При дослідженні рівня експресії мРНК PNPLA6 за умов гіпоксії не було виявлено змін у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, тоді як у контрольних клітинах лінії U87 рівень експресії мРНК PNPLA6 був на 33 % більшим у порівнянні з контролем. Разом з тим, рівень експресії мРНК PNPLA6 у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 контрольних клітинах суттєво не відрізнявся.

На рисунку 6 приведені результати дослідження рівня експресії гена, що кодує синтез специфічного для мозку високоафінного переносника глютаміну (SLC1A1) за умов гіпоксії та ішемії у клітинах гліоми лінії U87 та в субліній клітин з пригніченою функцією гена ERN1. Встановлено, що рівень експресії мРНК цього переносника глютаміну за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції знижується в три рази у субліній клітин гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 порівняно з контрольними клітинами лінії U87, а за умов гіпоксії рівень експресії мРНК SLC1A1 різко збільшувався (в 2,5 рази), але лише в контрольних клітинах гліоми лінії U87. В той же час, у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 рівень експресії мРНК SLC1A1 за умов гіпоксії істотно не змінювався. Встановлено, що за відсутності у середовищі глюкози або глютаміну рівень експресії мРНК високоафінного переносника глютаміну різко знижувався у клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1, тоді як у контрольних клітинах лінії U87 за відсутності у середовищі глютаміну рівень експресії мРНК істотно не змінювався, а за відсутності у середовищі глюкози спостерігалось збільшення рівня експресії мРНК SLC1A1 на 26 %.

Таким чином, дослідження експресії мРНК нейротропних факторів NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 та SLC1A1, що були проведені на клітинах гліоми за умов гіпоксії та ішемії показали, що рівень їх експресії за дії

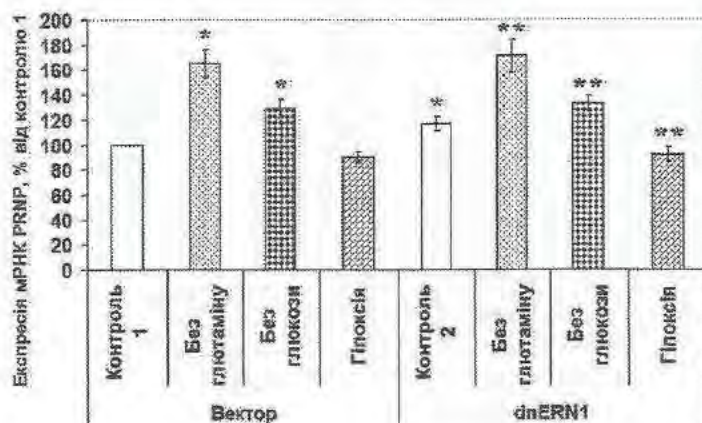


Рис. 3. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК нейротропного фактора мозку (BDNF) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та субліній цих клітин, трансфекованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум — ядро 1 (dnERIN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК BDNF нормалізували по експресії бета-актину; n = 3

цих чинників змінюється, але по-різному як за величиною, так і за направленістю змін, і здебільшого залежить від функції сигнального шляху ERN1. Більше того, характер змін експресії різних генів досліджених нейротропних факторів і їх вираженість не завжди співпадали за різних моделей ішемії (за відсутності у середовищі глютаміну або глюкози), причому і в даному випадку для деяких генів виявлялась залежність рівня їх експресії від функції сигнального шляху ERN1.

Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулу є одним із факторів, що забезпечує виживання клітин злоякісних пухлин в умовах гіпоксії та ішемії і активує ріст пухлин шляхом індукції змін в експресії великої кількості генів, а ERN1 сигнальний каскад є найбільш важливим, то його виключення приводить до пригнічення росту пухлин, в тому числі гліом, що, як відомо, є найбільш злоякісними пухлинами головного мозку і дуже тяжко піддаються лікуванню [5, 8, 9, 11, 17]. Раніше на двох експериментальних моделях пухлин (імплантація пухлини в мозок мишей та в ембріони курчат) було показано, що пригнічення функції гена ERN1 приводить до суттєвого зниження експресії ендотеліального фактора росту судин А та посилення процесів апоптозу і блокує ангиогенез та ріст злоякісних пухлин *in vivo* [17, 18].

Отримані в даній роботі результати свідчать про суттєві зміни в експресії ряду генів нейротропних факторів за гіпоксії та моделей ішемії у

клітинах гліоми лінії U87 та їх залежність від функції гена ERN1, а також про зміни в рівнях експресії майже всіх досліджених генів у клітинах з пригніченою функцією сигнального гена ERN1, тобто про можливий взаємозв'язок цих генів з сигнальним каскадом ERN1. Можна припустити, що виявлені зміни в експресії досліджених генів нейротропних факторів у клітинах з пригніченою функцією сигнального гена ERN1, вносять певний вклад у пригнічення росту злоякісних пухлин, що було показано раніше [17, 18]. В першу чергу це відноситься до специфічного для мозку високоафінного переносника глютаміну (SLC1A1), що є надзвичайно важливим для функціонування клітин мозку і рівень експресії якого знижується втрічі у клітинах з пригніченою функцією гена ERN1.

Ці принципово нові дані щодо залежності змін в експресії ряду генів нейротропних факторів за умов гіпоксії та ішемії від функції гена ERN1 заслуговують на подальше поглиблене дослідження значно більшої кількості генів з метою пошуку можливих терапевтичних мішеней для селективного блокування пропухлинної активності ERN1 або стимуляції процесів регенерації ішемічних тканин.

Висновки

1. Встановлено, що блокада функції гена ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до зниження рівня експресії мРНК NPDC1, PSEN1 і SLC1A1 та по-

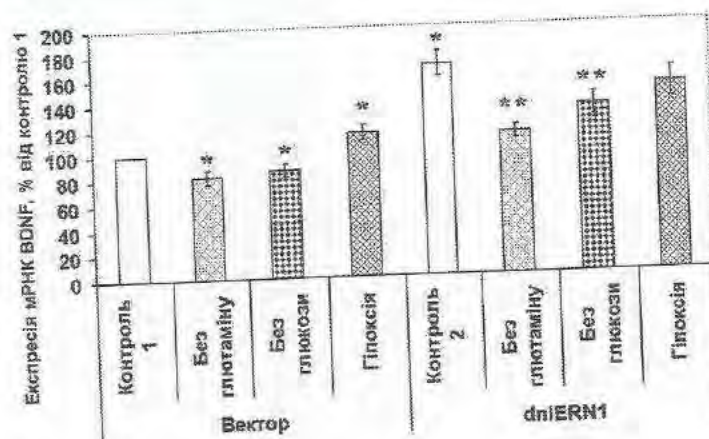


Рис. 4. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК пріон-протеїну (PRNP) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфорованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум — ядро 1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК PRNP нормалізували по експресії бета-актину; n = 3

силення рівня експресії генів BDNF і PRNP.

- Показано, що за умов гіпоксії посилюється рівень експресії мРНК NPDC1, BDNF, PNPLA6 і SLC1A1 у клітинах гліоми лінії U87, а у клітинах з пригніченою функцією ERN1 — мРНК NPDC1 і PSEN1.
- Встановлено, що у клітинах з пригніче-

ною функцією ERN1 за умов ішемії посилюється рівень експресії мРНК PRNP і знижується — BDNF, PNPLA6 та SLC1A1, а у контрольних клітинах гліоми лінії U87 посилюється рівень експресії мРНК PRNP та PNPLA6 і знижується рівень експресії лише мРНК BDNF.

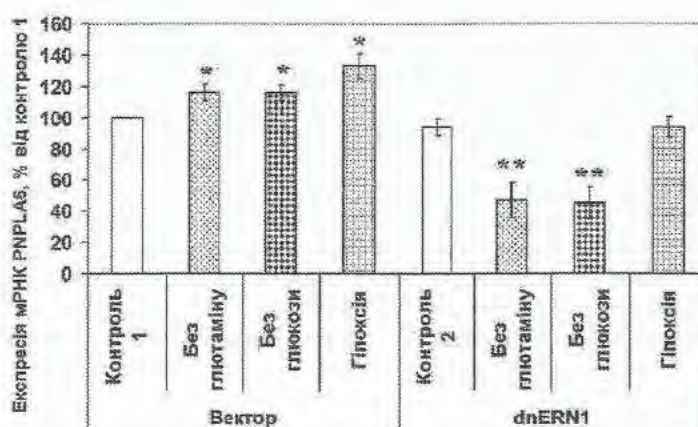


Рис. 5. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК подібної до пататину з доменом 6 фосфоліпази (PNPLA6) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфорованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум — ядро 1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК PNPLA6 нормалізували по експресії бета-актину; n = 3.

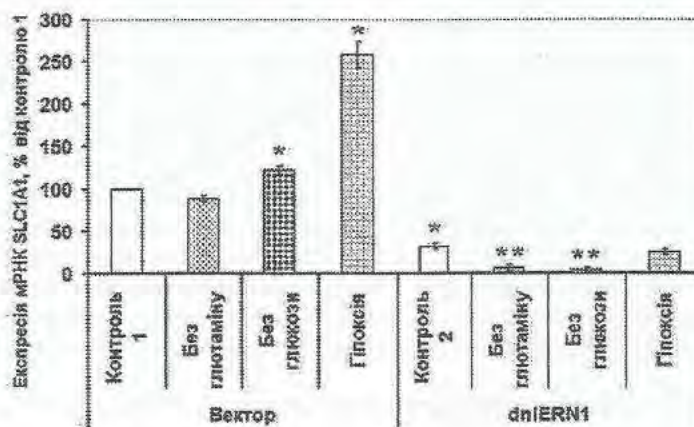


Рис. 6. Вплив гіпоксії та умов ішемії на експресію мРНК специфічного для мозку високоафінного переносника глутаміну (SLC1A1) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфорованих домінант/негативною конструкцією ендоплазматичний ретикулум — ядро 1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК SLC1A1 нормалізували по експресії бета-актину; n = 3.

ВЛИЯНИЕ ИШЕМИИ И ГИПОКСИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ НЕЙРОТРОПНЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87 ЗАВИСИТ ОТ ФУНКЦИИ ГЕНА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ-ЯДРО-1

Минченко Д.А., Губеня О.В., Харьковская А.П., Мурашко Н.К., Минченко А.Г.

Резюме. Изучали влияние ишемии (среда без глюкозы или глутамина) и гипоксии на экспрессию генов важных регуляторов пролиферации, регенерации и функциональной активности клеток головного мозга (NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 и SLC1A1) в клетках глиомы линии U87 и ее зависимость от функции гена эндоплазматический ретикулум - ядро (ERN1). Установлено, что блокада функции гена ERN1 в клетках глиомы линии U87 приводит к существенному снижению экспрессии мРНК NPDC1, PSEN1 и SLC1A1 и к усилению экспрессии мРНК PRNP и BDNF. Кроме того, было показано, что гипоксия значительно усиливает экспрессию мРНК большинства исследованных генов у контрольных клеток глиомы линии U87, за исключением PSEN1 и PRNP, а в клетках с подавленной функцией гена ERN1 - только двух генов: NPDC1 и PSEN1. При отсутствии в среде глюкозы или глутамина наблюдается увеличение уровня экспрессии мРНК PRNP и снижение PNPLA6, BDNF и SLC1A1 в клетках с подавленной функцией гена ERN1, а в контрольных клетках глиомы уровень экспрессии мРНК BDNF увеличивается, но при этом снижается уровень экспрессии только мРНК BDNF. Таким образом, результаты этой работы свидетельствуют о существенных изменениях в экспрессии ряда нейротропных генов в клетках глиомы линии U87 при гипоксии и ишемии, а также при блокаде функции гена ERN1, причем величина эффекта гипоксии и ишемии на экспрессию большинства исследованных генов зависит от функции гена ERN1.

Ключевые слова: клетки глиомы U87, гипоксия, ишемия, экспрессия генов, ERN1, NPDC1, PSEN1, BDNF, SLC1A1.

EFFECT OF ISCHEMIA AND HYPOXIA ON NEUROTROPHIC GENE EXPRESSION IN GLIOMA CELL LINE U87 DEPENDS ON ENDOPLASMIC RETICULUM - NUCLEI-1 FUNCTION

Minchenko D.O., Hubenya O.V., Kharkovska A.P., Murashko N.K., Minchenko O.H.

Summary. We studied effect of ischemia (glucose or glutamine deprivation conditions) and hypoxia on the expression of NPDC1, PSEN1, BDNF, PRNP, PNPLA6 and SLC1A1 genes which encode synthesis of important regulators of brain cells proliferation, regeneration and functional activity in U87 glioma cells and its dependence from endoplasmic reticulum - nuclei-1 (ERN1) function. It was shown that blockade of ERN1 gene expression in glioma cell line U87 is significantly decreased the expression of NPDC1, PSEN1 and SLC1A1 mRNA but increased the PRNP and BDNF mRNA expression. Moreover, hypoxia significantly induces the expression most of tested genes, except PSEN1 and PRNP, in control glioma cell line U87 but only two genes (NPDC1 and PSEN1) expression in glioma cells with suppressed function of ERN1. There was observed the increase of PRNP mRNA expression and decrease of PNPLA6, BDNF and SLC1A1 mRNA expression in cells with suppressed function of ERN1 under glucose or glutamine deprivation conditions, however in control glioma cells is increased the level of PRNP and PNPLA6 mRNA expression and decreased only BDNF mRNA expression. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that expression of several neurotrophic genes is changed under hypoxic and ischemic conditions as well as under suppression of ERN1 gene function and effect of hypoxia and ischemia on the expression of most tested genes depends from ERN1 gene function.

Key words: glioma cells U87, hypoxia, ischemia, gene expression, ERN1, NPDC1, PSEN1, BDNF, SLC1A1.

Список литературы в редакції. E-mail: visnyk_nmy@mail.ru