

13. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David, J. Glosowski [et al.] // Anal. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131–138.
14. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction / Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.
15. Nie Shi-Nan, Sun Hai-Chen, Wu Xue-Hao et. al. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress. World Journal of Gastroenterology 2004; 10(23): 3537–3541.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edition). – "Cold Spring Harbor Laboratory Pr.". – 2001 – 2344 p.
17. Konturek P.C., Brzozowski T., Pierchalski P. et. al. Activation of genes for spasmolytic peptide, transforming growth factor alpha and for cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 during gastric adaptation to aspirin damage in rats. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12: 767–777.
18. Berthold F. Instrumentation for Chemiluminescence Immunoassays, in Luminescence Immunoassay and Molecular Applications. – Boca Raton: "CRC Press", 1990. – P. 11–25.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265 – 275.
20. Dytham C. Choosing and using statistics. Abiologist's guide. – Oxford: "Blackwell Science", 1999. – 316 p.
21. Abdulahad K., Falaleeva T., Kuharsky V., et al. The effect of long-term gastric hypoacidity on morpho-functional state of digestive tract and Multiprobiotic "Simbiter" correction // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. – 2012. – № 15. – P. 4–8.
22. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., Moilanen, E., Nitric oxide production and signaling in inflammation // Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy. – 2005. – №4. – P. 471–479.
23. Kleinert H., Wallerath T., Fritz G., Ihrig-Biedert I. et al. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways // Br J Pharmacol. – 1998. – № 125(1). – P. 193–201.
24. Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R., Roth, G.S.. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway // J. Biol. Chem. – 1998. – P. 3756–3764.
25. Korotkiy O. Pilipenko S. Kompanets I. Tsyryuk O. Ostapchenko L., Beregova T. Multiprobiotics effect of the content of interferon-gamma in the serum of rats under prolonged hypoacidity // Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. – 2009. – № 54. – P. 47–49.
26. Leyshner Yu. Autoimmune liver disease and cross syndrome. – JVL: "Anacharsis", 2005. – 174 p.
27. Ivashkin V.G. Cellular and molecular biology of liver inflammation // Rus. Journal. Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. – 1998. – Vol.8 (№ 5). – P. 13–17.
28. Lieber C. S. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments // J Hepatol. – 2000. – №32. – P. 113–128.
29. Kono H., Rusyn I., Yin M. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease // J Clin Invest. – 2000. – № 106 (7). – P. 867–872.
30. Ketlynsky C.A., Kalinina N.M. Cytokines of mononuclear phagocytes in the regulation of inflammation and immunity // Immunology. – 1995. – №3. – P. 30–44.
31. Freund M., Link H., Schmidt R.E., Welte K. et al. Cytokines in hemopoiesis, oncology and immunology. – Berlin: "Springer-Verlag", 1994. – 711 p.
32. Liu Q. Role of cytokines in the pathophysiology of acute-on-chronic liver failure // Blood Purif. – 2009. – № 28(4). – P. 331–341.
33. Greenberg L.M., Rudnov V.A. Sepsis and systemic inflammatory response theory: an attempt to clinical and morphological consensus // Arch. Pat. – 2007. – Vol. 4. – P. 56–59.

Надійшла до редколегії 25.12.13

О. Берник, асп., К. Дворченко, канд. биол. наук, А. Драницина, канд. биол. наук, Л. Остапченко, д-р биол. наук
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ИММУНОБИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ ГИПОХЛОРИДРИИ ЖЕЛУДКА

Работа посвящена исследованию взаимосвязи системы оксида азота и уровня цитокинов в клетках печени крыс в условиях длительной гипохлоридрии желудка. Показано накопление нитрит иона и повышение активности синтазы оксида азота в клетках печени при сниженной желудочной секреции. В настоящее время доказана ключевая роль оксида азота в регуляции иммунных реакций, так нами установлено, что длительная гипохлоридрия сопровождается выработкой провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α, интерлейкина-6).

Ключевые слова: печень, гипохлоридрия, система синтазы оксида азота, цитокины.

O. Bernuk, PhD stud., A. Dvorschenko, Phd., A. Dranicina, Phd., L. Ostapchenko, D.Sci.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

IMMUNOBIOCHEMICAL PARAMETERS OF RAT'S LIVER UNDER LONG-TERM GASTRIC HYPOCHLORHYDRIA

The present study aimed to correlation of nitric oxide system and cytokine levels in rat's liver cells under prolonged hypochlorhydria. Nitrite ions accumulation attached to increase nitric oxide synthase activity in the liver cells under reducing gastric acid secretion. Currently proved nitric oxide key role in the regulation of immune responses, so, prolonged hypochlorhydria accompanied by the synthesis of proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor α, interleukin-6).

Keywords: liver, hypochlorhydria, nitric oxide system, cytokines.

УДК 577.112.7

І. Кривдюк, асп., Т. Бакалець, асп., О. Рябовол, студ., Д. Мінченко, канд. мед. наук
Інститут біохімії НАН України, Київ

ЕКСПРЕСІЯ МРНК GADD34 ТА GADD45 У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87: ВПЛИВ БЛОКАДИ СИГНАЛЬНОГО ЕНЗИМУ ERN1 ТА ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ

Фактори GADD34 та GADD45 відіграють важливу роль у пригніченні росту злоякісних пухлин. Встановлено, що блокада обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (від ендоплазматичного ретикулу до ядра-1), що є основним компонентом сигналізу за умов стресу ендоплазматичного ретикулу, суттєво знижує рівень експресії генів GADD34 і GADD45A та посилює експресію гена GADD45B у клітинах гліоми лінії U87. Збільшення рівня експресії гена GADD45B та зниження експресії генів GADD34 і GADD45A у клітинах гліоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 може приймати участь у пригніченні проліферації цих клітин. Встановлено, що дефіцит глюкози посилює експресію генів GADD34, GADD45A та GADD45B в обох типах клітин гліоми, але пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 модифікує ефект дефіциту глюкози на рівень експресії як GADD34, так і GADD45A та GADD45B. Таким чином, результати даної роботи продемонстрували, що експресія генів GADD34, GADD45A та GADD45B у клітинах гліоми лінії U87 є залежною від сигнального ензиму ERN1 і змінюється за умов дефіциту глюкози, причому вираженість ефекту дефіциту глюкози істотно залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

Ключові слова: GADD34, GADD45, глюкоза, клітки гліоми.

Вступ. Ішемія, як і гіпоксія, є важливим фактором росту різних злоякісних пухлин, в тому числі гліом, причому вони, як і багато інших факторів, є індукторами стресу ендоплазматичного ретикулу і експресії вели-

кої групи генів, зокрема тих, що контролюють процеси проліферації [1, 2]. Стрес ендоплазматичного ретикулу є відповіддю на накопичення не згорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ендоплазматичному

ретикулумі і опосередковується трьома сенсорно-сигнальними системами, локалізованими в ендоплазматичному ретикулумі: ERN1/IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nuclei-1/Inositol Requiring Enzyme-1), PERK (PRK-like Endoplasmic Reticulum Kinase) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6), але саме ERN1 (від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1) є головною сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулуму [3 – 7]. За умов активації стресу ендоплазматичного ретикулуму блокується синтез протеїнів і припиняється вхід нових протеїнів, що синтезуються, в ендоплазматичний ретикулум, що сприяє не лише фолдингу протеїнів, які уже є в ендоплазматичному ретикулумі, а і їх деградації, а це необхідно для виживання клітин або їх смерті через механізми, асоційовані зі стресом ендоплазматичного ретикулуму [8 – 11].

Сенсорно-сигнальний ензим ERN1 є біфункціональним, оскільки має два різних каталітичних домени (серин/треонінової кінази та ендорибонуклеази), які опосередковують залежний від ERN1 сигналінг. Відомо, що асоційована з ERN1 кіназна активність аутофосфорилує цей ензим і що це фосфорилування є необхідним моментом його димеризації та активації ендорибонуклеази ERN1. Ця ендорибонуклеаза є відповідальною за деградацію певних мРНК та ініціацію альтернативного сплайсингу пре-XBP1 (X-box binding protein 1) мРНК [9, 10]. Зрілий сплайс-варіант мРНК XBP1 (XBP1s) є матрицею для синтезу транскрипційного фактора, що контролює експресію сотень генів, які мають відношення до стресу ендоплазматичного ретикулуму [10, 11], зокрема до регуляції процесів проліферації та смерті клітин [12, 13]. Також відомо, що фосфорилування XBP1s протеїнкіназою р38 MAP та його взаємодія з регуляторною субодиною фосфатидилінозитол 3-кінази збільшують ядерну транслокацію XBP1s, а взаємодія з транскрипційним фактором FOXO1 (Forkhead box O1) сприяє опосередкованій протеосою деградації цього фактора [13, 14].

Сигнальний шлях ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулуму тісно пов'язаний з ефектами ішемії і гіпоксії, а також процесами проліферації і росту злоякісних пухлин, оскільки було показано, що повна блокада функції цього сигнального шляху у клітинах гліоми та аденокарциноми легень призводить до пригнічення росту пухлин із цих клітин [9, 15, 16]. Відомо, що гліоми є надзвичайно агресивними пухлинами з вираженням ангиогенезу та посиленою інвазією клітин в нормальну паренхіму головного мозку і що як гіпоксія, так і чинники, що імітують ефекти ішемії, є асоційованими з ростом гліом, сприяють виживанню пухлинних клітин і посилюють їх агресивність [8]. Детальне вивчення механізмів залежності клітин від гіпоксії є необхідною умовою для розробки терапевтичних стратегій сенсibiлізації клітин та пригнічення ангиогенезу у клітинах пухлин шляхом блокади механізмів їх виживання.

Фактори GADD34, GADD45A та GADD45B, що кодують синтез високоактивних регуляторів смерті клітин відіграють важливу роль в рості злоякісних пухлин, але молекулярні механізми їх регуляції вивчені ще недостатньо. Фактор GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) являє собою регуляторну субодиною 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A; protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A) і є поліфункціональним протеїном, що відіграє важливу роль в регуляції низки процесів, зокрема в синтезі протеїнів шляхом дефосфорилування фактора ініціації трансляції EIF2S1, фосфорилування якого виключає трансляцію за умов стресу ендоплазматичного ретикулуму [17]. Фактори GADD45A та GADD45B задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу

як пухлинні супресори, але рівень їх експресії, як і механізм дії, може бути різним у злоякісних пухлинах, що вимагає подальшого вивчення ролі цих факторів у їх виникненні та рості [18, 19].

Метою даної роботи було вивчення експресії генів, що кодують синтез факторів GADD34, GADD45A та GADD45B, які задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу, у клітинах гліоми лінії U87 з повним (як кінази, так і ендорибонуклеази) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії.

Матеріали та методи. Клітини гліоми лінії U87 були отримані із Американського банку клітинних культур ATCC (American Type Culture Collection; США) і росли у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. У цій роботі були використані три сублінії цих клітин гліоми: 1) контрольні клітини гліоми, що були стабільно трансфектовані вектором pcDNA3.1, та 2) клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 домінантною негативною конструкцією dnERN1, що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1. Пригнічення функції ензиму ERN1 було оцінено раніше по рівню фосфорилування ERN1 та утворенню альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікамідом (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулуму [20]. При дослідженні впливу дефіциту глюкози клітини промивали, додавали середовище DMEM (Gibco) без глюкози і витримували протягом 16 годин.

РНК із клітин гліоми виділяли як описано раніше [20]. Осад РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Рівень експресії різних генів GADD34, GADD45A та GADD45B у клітинах гліоми визначали методом кількісної полімеразної реакції використовуючи "Mx 3000P QPCR" (Stratagene, США) та SYBRGreen Mix (AB gene, Велика Британія). Для ампліфікації кДНК GADD34 (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) also known as PPP1R15A (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A) були використані такі праймери: прямий (5'-GAATCAAGCCACGGAGGATA -3') та зворотний (5'-CAGGGAGGACACTCAGCTTC -3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 953 – 972 та 1261 – 1242 кДНК PPP1R15A людини (GenBank номер NM_014330). Розмір ампліфікованого фрагмента 309 п.н.з. Ампліфікацію кДНК GADD45A (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) also known as DDIT1 (DNA damage-inducible transcript 1 protein) проводили за допомогою прямого (5'-ACGAGGACGACGACAGAGAT -3') та зворотного (5'-TCCCGGCAAAACAAATAAG -3') праймерів, які відповідають послідовності 503 – 522 та 764 – 745 кДНК GADD45A людини (GenBank номер NM_001924). Розмір ампліфікованого фрагмента 262 п.н.з. Для ампліфікації кДНК GADD45B (growth arrest and DNA-damage-inducible, beta) also known as MyD118 (negative growth regulatory protein or myeloid differentiation primary response protein) були використані такі праймери: прямий – 5'-TCGGATTTTGAATTTCTCC-3' та зворотний

– 5'– TGTCACAGCAGAAGGACTGG –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 168-187 та 487 – 468 кДНК GADD45B людини (GenBank номер NM_015675). Розмір ампліфікованого фрагмента 320 п.н.з. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили за допомогою прямого – 5'– GGACTTCGAGCAAGAGATGG –3' та зворотного – 5'– AGCACTGTGTTGGCGTACAG –3' праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank номер NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу. Праймери були отримані з компанії "Sigma-Aldrich" (США).

Аналіз результатів дослідження експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential

expression calculator" а статистичний аналіз – в Excel програмі. Значення експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* нормалізували по рівню експресії бета-актину і представляли у відсотках від контролю (100 %). Представлені $M \pm m$; $n = 4$.

Результати дослідження та їх обговорення. Як видно із даних, приведених на рис. 1, пригнічення кінзної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму, призводить до зниження рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з контрольними клітинами, трансфеккованими вектором pcDNA3.1. В той же час, блокада обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми призводить до посилення експресії гена *GADD45B* (рис. 1).

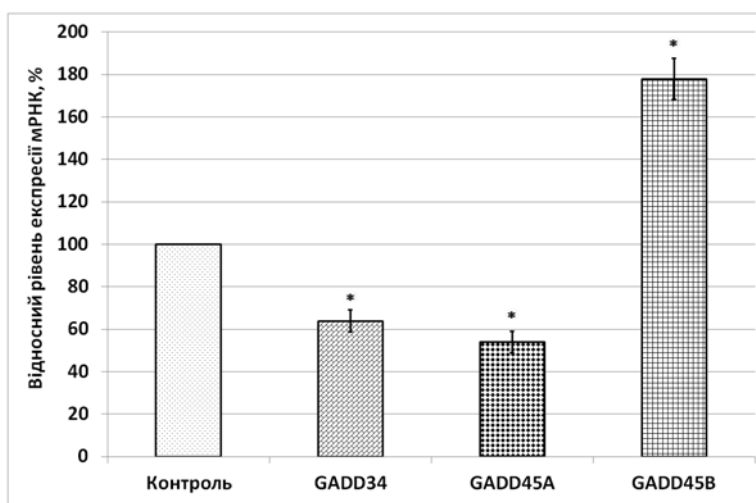


Рис. 1. Зміни рівня експресії генів *GADD34* (growth arrest and DNA-damage-inducible 34) відомого також як *PPP1R15A* (protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A), *GADD45A* (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha) відомого ще як *DDIT1* (DNA damage-inducible transcript 1 protein) та *GADD45B* (growth arrest and DNA-damage-inducible, beta) відомого також як *MyD118* (negative growth regulatory protein or myeloid differentiation primary response protein) у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та клітин, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії цих мРНК нормалізували по експресії бета-актину і представляли як відхилення від контролю, прийнятого за 0; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем

Відомо, що фактори *GADD34* та *GADD45A* є поліфункціональними протеїнами, що відіграють важливу роль у регуляції багатьох процесів, в тому числі в регуляції росту злоякісних пухлин як високоактивні регулятори смерті клітин [17]. Варто відмітити, що фактори *GADD45A* та *GADD45B* є спорідненими і задіяні в регуляції процесів росту та апоптозу як пухлинні супресори, але не зважаючи на це рівень їх експресії може бути різним у злоякісних пухлинах [18, 19], і це в деякій мірі співпадає з отриманими нами даними про різнонаправленість змін в експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* за умов пригнічення ERN1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму. Таким чином, можна припустити, що зменшення рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87 за умов блокади обох ензиматичних активностей сигнального ензиму ERN1 призводить до пригнічення проліферації клітин та росту пухлин із цих клітин, що було встановлено раніше в дослідженнях проф. М. Moenner [15,

16]. В той же час, для виявлення функціонального значення посилення експресії гена *GADD45B* у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 потрібні подальші поглиблені дослідження.

Як видно із даних, приведених на рис. 2, за умов дефіциту глюкози у середовищі експресія гена *GADD34* у контрольних клітинах гліоми посилюється майже втричі, а у клітинах з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 – більше ніж у десять разів.

Оскільки *GADD34* представляє собою регуляторну субодиницю протеїнфосфатази 1 (*PPP1R15A*), то дефосфорилюючи фактор ініціації трансляції EIF2S1 впливає на синтез протеїнів [17]. Встановлено, що дефіцит глюкози у середовищі посилює також рівень експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1, але в останньому випадку в значно більшій мірі (Рис. 3).

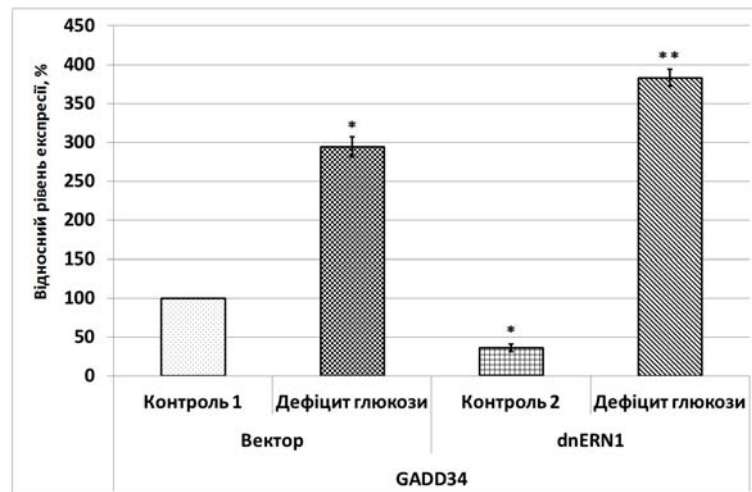


Рис. 2. Вплив дефіциту глюкози у середовищі на рівень експресії гена *GADD34* (*PPP1R15A*) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Рівень експресії мРНК *GADD34* нормалізували по експресії бета-актину. Значення експресії цього гена у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих dnERN1, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами, трансфорованими dnERN1 (контроль 2)

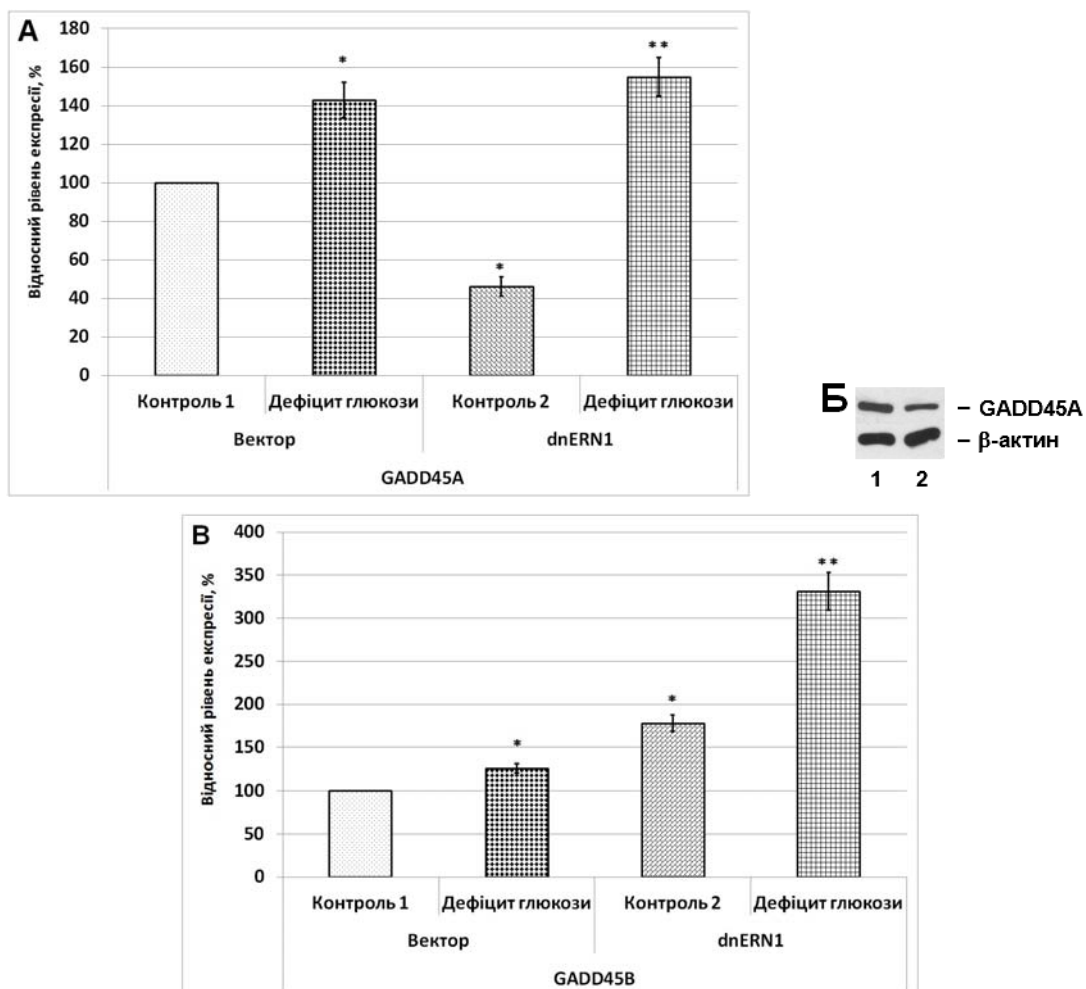


Рис. 3. Ефект дефіциту глюкози у середовищі на рівень експресії мРНК *GADD45A* (А) та *GADD45B* (Б), а також протеїну *GADD45A* (Б) у клітинах гліоми лінії U87, трансфорованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та клітин, стабільно трансфорованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) на основі вектору рсDNA3.1, за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції (мРНК) і Вестерн-блот аналізу (протеїн). У Вестерн-блот аналізі 1 – контрольні клітини гліоми, а 2 – з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Рівень експресії мРНК *GADD45A* та *GADD45B* нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії цих генів *GADD45B* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози у середовищі у контрольних клітинах гліоми (Вектор) порівнювали з контролем 1 (100 %), а у клітинах, трансфорованих dnERN1, – з контролем 2; $n = 4$; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем 2

Так, у контрольних клітинах гліоми рівень експресії генів *GADD45A* та *GADD45B* збільшується за умов дефіциту глюкози у середовищі на 43 % та 26 %, відповідно, тоді як у клітинах з виключеною функцією ензиму ERN1 рівень індукції експресії цих генів є значно більшим: експресія гена *GADD45A* посилюється більше ніж у три рази (рис. 3A), а гена *GADD45B* – майже вдвічі (рис. 3B).

Крім того, нами показано, що рівень протеїну *GADD45B* збільшується у клітинах з повним пригніченням функції сигнального ензиму ERN1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (рис. 3B).

Таким чином, результати проведених досліджень продемонстрували залежність експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* від функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87, а також чутливість їх експресії до дефіциту глюкози у середовищі і виражене посилення ефекту дефіциту глюкози за умов блокади ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу. Більше того, значне зниження рівня експресії генів *GADD34* та *GADD45A*, як і підвищення рівня експресії гена *GADD45B* у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 корелює з пригніченням росту пухлин з цих клітин *in vivo* [15, 16] і можливо вносить свій вклад у цей процес, оскільки ці фактори є ключовими у регуляції процесів проліферації та апоптозу [17, 18].

Висновки: 1. Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних функцій біфункціонального сенсорно-сигнального ензиму ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, знижує рівень експресії генів *GADD34* та *GADD45A* у клітинах гліоми лінії U87, а експресію гена *GADD45B* – посилює.

2. Показано, що рівень експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* за умов відсутності глюкози у середовищі збільшується у контрольних клітинах гліоми і що виключення сигнального ензиму ERN1 значно посилює ефект дефіциту глюкози на експресію всіх цих генів.

3. Результати досліджень свідчать про залежність експресії генів *GADD34*, *GADD45A* та *GADD45B* у кліти-

нах гліоми лінії U87 від функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулу, а також про чутливість їх експресії до дефіциту глюкози, причому ця чутливість значно посилюється у клітинах з пригніченим ERN1.

Список використаних джерел

1. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. // *Mutat. Res.* – 2008. – Vol. 640. – P. 174 – 179.
2. Denko N. C. // *Nature Reviews Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – P. 705 – 713.
3. Zhang K., Kaufman R.J. *J. Biol. Chem.* – 2004. 279, N 25. – P. 25935 – 25938.
4. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. *EMBO J.* – 2005. – 24, N 19. – P. 3470 – 34815.
5. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740.
6. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728.
7. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693.
8. Moenner M., Pluquet O., Boucheccareilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.
9. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. *Cancer Res.* – 2004. – 64, N 17. – P. 5943 – 5947.
10. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // *Molecular Cell.* – 2007. – 27. – P. 53 – 66.
11. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331.
12. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 10. – P. 1251 – 1260.
13. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. *Nature Medicine.* – 2011. – 17, N 3. – P. 356 – 365.
14. Park S.W., Zhou Y., Lee J. et al. *Nature Medicine.* – 2010. – 16, N 4. – P. 429 – 437.
15. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707.
16. Auf G., Jabouille A., Guérin S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – 107, N 35. – P. 1555 – 15558.
17. Garrido J.L., Maruo S., Takada K., Rosendorff A. *Virology.* – 2009. – 6. – P. 231.
18. Wang L., Xiao X., Li D. et al. *O. Nransl. Med.* – 2012 – 10. – P. 215.
19. Michaelis K.A., Knox A.J., Xu M. et al. *Endocrinology.* – 2011. – 152, N 10. – P. 3603-3613.
20. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Hubenia O.V. et al. *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – 2, N 2. – P. 198 – 206.

Надійшла до редколегії 09.12.13

И. Кривдюк, асп., Т. Бакалец, асп., О. Рябовол, студ., Д. Минченко, канд. мед. наук
Институт биохимии НАН Украины, Киев

ЕКСПРЕССИЯ мРНК GADD34 И GADD45 В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87: ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ СИГНАЛЬНОГО ЭНЗИМА ERN1 И ДЕФИЦИТА ГЛЮКОЗЫ

Факторы *GADD34* и *GADD45* играют важную роль в подавлении роста злокачественных опухолей. Установлено, что блокада обеих ферментативных функций сенсора – сигнального энзима ERN1 (от эндоплазматического ретикулула к ядру -1), является основным компонентом сигналинга в условиях стресса эндоплазматического ретикулула, существенно снижает уровень экспрессии генов *GADD34* и *GADD45A* и усиливает экспрессию гена *GADD45B* в клетках глиомы линии U87. Увеличение уровня экспрессии гена *GADD45B* и снижение экспрессии генов *GADD34* и *GADD45A* в клетках глиомы в условиях подавления обеих ферментативных активностей ERN1 может принимать участие в подавлении пролиферации этих клеток. Установлено, что дефицит глюкозы усиливает экспрессию генов *GADD34*, *GADD45A* и *GADD45B* в обоих типах клеток глиомы, но угнетение сигнального энзима ERN1 модифицирует эффект дефицита глюкозы на уровень экспрессии как *GADD34*, так и *GADD45A* и *GADD45B*. Таким образом, результаты данной работы продемонстрировали, что экспрессия генов *GADD34*, *GADD45A* и *GADD45B* в клетках глиомы линии U87 является зависимой от сигнального энзима ERN1 и меняется в условиях дефицита глюкозы, причем выраженность эффекта дефицита глюкозы существенно зависит от функции сигнального энзима ERN1.

Ключевые слова: *GADD34*, *GADD45*, глюкоза, клетки глиомы.

I. Kryvdiuk, PhD stud., T. Bakalets, PhD stud., O. Riabovol, stud., D. Minchenko, PhD.
Palladin institute of biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine NASU, Kyiv

EXPRESSION OF GADD34 AND GADD45 MRNA IN U87 GLIOMA CELLS: EFFECT OF ERN1 SIGNALING ENZYME AND GLUCOSE DEPRIVATION

GADD34 and *GADD45* factors play an important role in suppression of malignant tumor growth. It was shown that blockade of both enzymatic functions of sensor and signaling enzyme ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1), the major component of endoplasmic reticulum stress signaling, decreases the expression level of genes *GADD34* and *GADD45A* and increases the *GADD45B* gene expression in U87 glioma cell. The increase of *GADD45B* and decrease of *GADD34* and *GADD45A* gene expressions in glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function is possibly participated in suppression of these cells proliferation. It was shown that, that glucose deprivation condition leads to enhance the expression of *GADD34*, *GADD45A* and *GADD45B* genes in both types of glioma cells, but complete blockade of ERN1 enzyme function modifies the effect of glucose deprivation condition on the expression level all of these genes. Thus, results of this investigation demonstrated that the expression of *GADD34*, *GADD45A* and *GADD45B* genes in U87 glioma cells is dependent from signaling enzyme ERN1 and is changed by glucose deprivation condition, but its effect depends from ERN1 signaling enzyme function.

Key words: *GADD34*, *GADD45*, glucose, glioma cells.