

УДК 577.112.7

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

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *IGF1R*, *IGFBP4* ТА *IGFBP5* У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ГЛУТАМІНУ

Робота присвячена вивченню експресії генів рецептора подібного до інсуліну фактора росту (*IGF1R*) та протеїнів *IGFBP4* та *IGFBP5*, що зв'язуються з подібними до інсуліну факторами росту, у клітинах гліоми лінії U87 за умов дефіциту глутаміну у зв'язку з пригніченням сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулулу *ERN1* (ензим сигналювання від ендоплазматичного ретикулулу до ядра), який контролює проліферацію клітин. Встановлено, що за умов дефіциту глутаміну спостерігається посилення експресії гена *IGFBP4* та пригнічення експресії *IGF1R* на рівні мРНК у контрольних клітинах гліоми, але експресія *IGFBP5* у цих клітинах не залежить від наявності глутаміну в поживному середовищі. У той же час, пригнічення *ERN1* модифікує ефект дефіциту глутаміну на експресію гена *IGFBP5*, оскільки у клітинах гліоми, що не експресують функціонально активний ензим *ERN1*, дефіцит глутаміну призводить до пригнічення експресії гена цього *IGFBP*. Ми також показали, що експресія всіх досліджених генів у клітинах гліоми регулюється сигнальним ензимом *ERN1* за стандартних умов культивування, оскільки пригнічення *ERN1* істотно посилює експресію генів *IGFBP4* та *IGFBP5*, протеїнові продукти яких є основними інгібіторами про-проліферативної активності подібних до інсуліну факторів росту *IGF1* та *IGF2*. За умов пригнічення активності *ERN1* у клітинах гліоми спостерігається також зростання рівня експресії гена *IGF1R* у порівнянні з контрольними клітинами гліоми. Результати цієї роботи продемонстрували, що нестача глутаміну порушує експресію досліджених генів і що пригнічення *ERN1* переважно змінює експресію цих генів.

**Ключові слова:** *ERN1*, експресія генів, *IGF1R*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, лінія клітин гліоми U87, дефіцит глутаміну.

**Вступ.** Функціонування системи інсуліноподібного фактора росту (*IGF* – Insulin Like Growth Factor) є важливим механізмом регуляції клітинної проліферації і диференціації в нормі та за багатьох патологічних станів. Основними компонентами системи *IGF* є ліганди (*IGF1* та *IGF2*), рецептори (*IGF1R* та *IGF2R*), протеїни, що зв'язують *IGF* (*IGFBP1-6* – *IGF-Binding Proteins 1-6*) або містять *IGFBP*-домени (*IGFBP7-10*), відомі також як протеїни, пов'язані із *IGFBP* (*IGFBPpr* – *IGFBP-Related Proteins*) [11]. Взаємодія *IGF* з рецепторами призводить до активації проліферації, міграції, інвазії, метастазування та має антиапоптичні ефекти. *IGFBP* регулюють активність *IGF*, зв'язуючи їх у тимчасово неактивні комплекси, з одного боку, заважаючи взаємодії з рецепторами, а з іншого – захищаючи від деградації та створюючи пул розчинних *IGF* у плазмі крові і тканинах [15]. Таким є загальний принцип функціонування системи *IGF*, але кожен протеїн має також додаткові, незалежні від *IGF* функції. Протеїни *IGF* за структурою та амінокислотною послідовністю подібні до молекули проінсуліну, звідки і походить їх назва, тому неодноразово було показано перехресну активацію рецепторів інсуліну (*IR*) та *IGF* (*IGF1R*), а також можливість утворення так званих гібридних рецепторів [7]. Гени *IGF1R* та *IR* мають на 70% ідентичну нуклеотидну послідовність [9]. Обидва рецептори належать до трансмембранних рецепторів із тирозинкіназою активністю (EC 2.7.10.1) та являють собою гетеротетрамерні протеїни, що містять по дві позаклітинні  $\alpha$ -субодиниці та дві трансмембранні  $\beta$ -субодиниці, поєднані дисульфідними зв'язками [16]. Після зв'язування ліганду із Cys-збагаченим сайтом  $\alpha$ -субодиниці  $\beta$ -субодиниця набуває тирозинкіназою активності, автофосфорилується та фосфорилує внутрішньоклітинні субстрати [17].

*IGFBP4* – секреторний протеїн, що зв'язує як *IGF1*, так і *IGF2*, на високому рівні експресується фібробlastами, остеокцитами та клітинами простати, має здебільшого анти-проліферативні ефекти: надекспресія *IGFBP4* в пухлинах простати та прямої кишки призводить до пригнічення росту цих пухлин *in vivo* [6], тоді як в пухлинах легень, молочної залози, прямої кишки, щитоподібної залози та нейробластоми рівень експресії *IGFBP4* є нижчим у порівнянні з відповідними нормальними тканинами [10]. Виключенням є пухлини нирок, які

*in vivo* та *in vitro* синтезують більше протеїну *IGFBP4*, ніж нормальні клітини нирки [18].

*IGFBP5* – також секреторний протеїн, який є другим (після *IGFBP3*) за концентрацією в плазмі крові та кількістю *IGF*, який з ним зв'язується. Лише у складі молекул *IGFBP5* та *IGFBP3* було показано наявність сигналу ядерної локалізації, що забезпечує транспортування цих протеїнів до ядра за участю імпорту  $\beta$ . Унікальною властивістю *IGFBP5* у порівнянні з іншими *IGFBP* є його здатність конкурувати із *TNF- $\alpha$*  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) за зв'язування з *TNFR1* (*TNF Receptor 1*), пригнічуючи ефекти *TNF- $\alpha$ /TNFR1* [8].

Ріст злоякісних пухлин, в тому числі гліом, асоціюється з гіпоксією та дефіцитом поживних речовин, а також стресом ендоплазматичного ретикулулу (ЕР), обумовленим накопиченням у люмені ЕР не згорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів, на поверхні молекул яких експонуються залишки гідрофобних амінокислот [2]. ЕР – надзвичайно чутливий до змін гомеостазу клітинний компартмент, в якому відбувається фолдинг та посттрансляційні модифікації протеїнів, їх дозрівання перед транспортуванням до апарату Гольджі, а також точний контроль їх структури. Сигнальний шлях, опосередкований ензимом *ERN1* (*Endoplasmic Reticulum to Nuclei 1 Signaling*) є основною та найбільш еволюційно консервативною сенсорно-сигнальною системою стресу ЕР [2, 12]. За умов його активації спостерігається не лише пригнічення синтезу протеїнів на рибосомах, а і припиняється транспорт новосинтезованих протеїнів до ЕР, активується фолдинг протеїнів, що вже є в ЕР, та деградація не згорнутих протеїнів [12]. *ERN1* має два каталітичних домени: серин/треонінкіназний, що здійснює автофосфорилування та димеризацію *ERN1*, та ендорибонуклеазний, який відповідає за ініціацію альтернативного сплайсингу пре-мРНК транскрипційного фактора *XBP1* (*X-box Binding Protein 1*) та деградацію цілого ряду мРНК, контролюючи таким чином рівень їх експресії [13]. Сплайс-варіант мРНК *XBP1* транскрибується з утворенням транскрипційного фактора *XBP1*, який надалі контролює експресію сотень генів, продукти яких беруть участь у виході клітини зі стану стресу, регуляції процесів проліферації та клітинної загибелі [2].

**Мета роботи:** вивчення експресії генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням функціональної активності ензиму *ERN1* за

умов дефіциту глутаміну для визначення ролі ензиму ERN1 у регуляції експресії цих генів та їх можливу роль в інгібуванні проліферації клітин гліоми, що не експресують функціонально активний 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 протеїнкіназного 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 [14]. При дослідженні впливу дефіциту глутаміну 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 глутаміну і витримували протягом 16 годин в інкубаторі.

РНК із клітин гліоми виділяли як було описано раніше [1, 14]. Осади РНК промивали 75 % етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували 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 безкуветному 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 *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* 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 *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5*, послідовності генів, що їм відповідають, а також довжина продуктів ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції наведені у 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 *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* 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 *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* представляли у відсотках від контролю (100 %), ефект дефіциту глутаміну в клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ензиму ERN1 (dnERN1) порівнювали з цими ж клітинами, що культивували у повноцінному поживному середовищі із концентрацією глутаміну 2 ммоль/л. Представлені середні значення  $\pm m$  чотирьох експериментів.

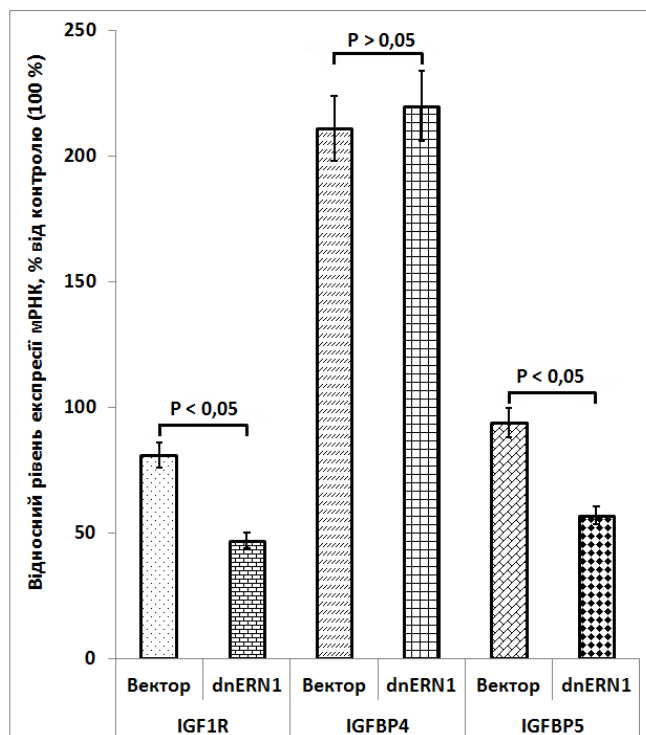
**Результати дослідження та їх обговорення.** Як видно із даних, наведених у табл. 2, рівень експресії гена *IGF1R* за умов дефіциту глутаміну в поживному середовищі знижується у контрольних клітинах гліоми (вектор), що мають функціонально активний сенсорно-сигнальний ензим ERN1, на 19 % ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з цими ж клітинами гліоми, що росли у середовищі з глутаміном. Водночас, у клітинах з пригніченою активністю кінази та ендорибонуклеази ERN1 (dnERN1) рівень експресії гена *IGF1R* також знижується за умов дефіциту глутаміну, але значно більшою мірою: -41 % ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і -53 % ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з відповідним контролем – клітинами гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1 (dnERN1), які були вирощені у середовищі із глутаміном (табл. 2 та рис. 1). Це свідчить про значно більшу чутливість експресії гена *IGF1R* до дефіциту глутаміну за умов пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1. Також було показано, що пригнічення ензиму ERN1 призводить до підвищення відносного рівня експресії гена рецептора *IGF1R* у клітинах гліоми лінії U87 (+26 %;  $p < 0,05$ ) 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<br>(п – прямий, з – зворотний)         | Відповідні<br>послідовності генів | Довжина ампліфікованого<br>фрагмента (п.н.з.) | Номер гена<br>в базі GenBank |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|
| <i>β-актин</i><br>( <i>ACTB</i> ) | п: 5'-cgaccactggcatcgatg-3'<br>з: 5'-gtgtggcggtacaggtctt-3'    | п: 704-723<br>з: 937-918          | 233                                           | X00351                       |
| <i>IGF-1R</i>                     | п: 5'-gccactactactatgccggg-3'<br>з: 5'-gtgcatccttgagcatctg-3'  | п: 875-856<br>з: 1111-1092        | 255                                           | NM_000875                    |
| <i>IGFBP-4</i>                    | п: 5'-caccacaacaacagcttcag-3'<br>з: 5'-agttggggatggggatgatg-3' | п: 679-698<br>з: 922-903          | 243                                           | NM_001552                    |
| <i>IGFBP-5</i>                    | п: 5'-agtgaagaaggaccgcagaa-3'<br>з: 5'-gcagcttaccctgacttg-3'   | п: 1227-1246<br>з: 1528-1509      | 301                                           | NM_000599                    |

**Таблиця 2.** Рівень експресії генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Вектор) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції: вплив дефіциту глутаміну. 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 глутаміну у клітинах з вектором | Пригнічення ERN1 (dnERN1) | Дефіцит глутаміну у клітинах з dnERN1 |
|-------|---------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 1     | <i>IGF1R</i>  | $81 \pm 4,9$ *                          | $126 \pm 6,3$ *           | $59 \pm 3,8$ *                        |
| 2     | <i>IGFBP4</i> | $211 \pm 13$ *                          | $538 \pm 22$ *            | $1184 \pm 54$ *                       |
| 3     | <i>IGFBP5</i> | $94 \pm 5,8$                            | $575 \pm 33$ *            | $327 \pm 21$ *                        |



**Рис. 1.** Рівень експресії генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором, та клітинах із домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за дефіциту глутаміну 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 %;  $n = 4$

Із даних, приведених у табл. 2 та на рис. 1 видно, що рівень експресії гена *IGFBP4* за умов дефіциту глутаміну зростає як у контрольних клітинах гліоми (вектор) (+111%;  $p < 0,05$ ), так і у клітинах гліоми з пригніченою активністю кіназного та ендорибонуклеазного доменів ERN1 dnERN1 (+1084%;  $p < 0,05$ ) при порівнянні з цими ж клітинами, що росли за присутності глюкози, але при порівнянні з клітинами гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1 (dnERN1), що росли за присутності глюкози, це збільшення буде набагато меншим (+120%;  $p < 0,05$ ) і істотно не відрізняється від того, що було виявлено у контрольних клітинах гліоми за умов нестачі глутаміну (рис. 1). У той же час, рівень експресії гена *IGFBP4* за умов пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми (dnERN1) за умов присутності глюкози значно зростає (+438%;  $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (вектор), що культивували на повноцінному поживному середовищі (табл. 2). Таким чином, пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 різко збільшує рівень експресії гена *IGFBP4*, але не впливає на чутливість експресії цього гена до дефіциту глутаміну.

Встановлено також, що у контрольних клітинах гліоми, що експресують функціонально активний ензим ERN1 (вектор) експресія гена *IGFBP5* не є чутливою до

дефіциту глутаміну, а у клітинах з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 експресія гена цього фактора за умов дефіциту глутаміну суттєво збільшується (+227 %;  $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором і знижується (-43 %;  $p < 0,05$ ) при порівнянні з клітинами гліоми, що експресують функціонально неактивний ензим ERN1 (dnERN1), які були вирощені у середовищі із глутаміном, оскільки пригнічення активності ензиму ERN1 різко посилює експресію гена *IGFBP5* (+475%;  $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольними клітинами з вектором за умов присутності глутаміну у середовищі (табл. 2 та рис. 1). Таким чином, пригнічення функціональної активності ензиму ERN1 різко збільшує рівень експресії гена *IGFBP5* та змінює чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Підвищення відносного рівня експресії генів *IGFBP4* (більш, ніж у 5 разів) та *IGFBP5* (майже у 6 разів), яке було виявлено нами у клітинах гліоми людини лінії U87 за умов пригнічення активності ензиму ERN1, підтверджує їх спільну анти-проліферативну роль. Раніше було показано, що надекспресія *IGFBP5* у культурі клітин меланоми людини ліній A375 та A2058 призводить до пригнічення проліферації та міграції цих клітин [19]. Анти-проліферативні ефекти *IGFBP5* пояснюють зокрема здатність внутрішньоклітинного *IGFBP5* впливати на активацію mTORC (Mammalian Target of Rapamycin

Complex), пригнічуючи у такий спосіб сигнальний шлях IGF1, що було показано в культурі ембріональних фібробластів мишей та пухлинних клітинах молочної залози людини лінії MCF7 [5].

Протеїн IGFBP4 є інгібітором росту багатьох типів пухлин, але при дослідженні пацієнтів із гліомами на різних стадіях розвитку та в культурі клітин гліоми ліній U251 та U343 було показано, що надекспресія IGFBP4, як і підвищення кількості цього протеїну, призводить до активації проліферативних процесів, а рівень експресії IGFBP4 у клітинах гліом на стадії астроцитом є вищим за такий у відповідних нормальних тканинах головного мозку [10]. Взагалі, роль IGFBP4 у проліферації гліом є мало дослідженою, а результати різних досліджень часто є суперечливими. Так, результати наших експериментів свідчать про значну активацію експресії IGFBP4 за умов інгібування активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1, що загалом має анти-проліферативний ефект на клітини гліоми людини лінії U87. Раніше на клітинах гліоми лінії U87MG було показано, що IGFBP4 проявляє незалежні від IGF анти-ангіогенні та анти-пухлинні ефекти переважно за рахунок свого C-кінцевого домену, що містить тироглобуліновий домен типу 1. Ефект пригнічення ангіогенезу за участю IGFBP4 також було показано на моделі хоріоантлантоїсної мембрани курячого ембріону [7], що також узгоджується із даними про те, що повне інгібування активності ензиму ERN1 призводить до зниження здатності клітин гліоми лінії U87 (в яких при цьому спостерігається підвищення відносно рівня експресії IGFBP4) до утворення пухлин та росту кровоносних судин на моделі ембріонів курчат [1].

Серед 20 основних протеїногенних амінокислот глутамін є найбільш поширеним в організмі людини і тварин та метаболізується практично в усіх тканинах. У міжклітинній речовині глутамін складає до 25%, а в м'язовій тканині – до 60% від усього пулу вільних амінокислот. При різних критичних станах, а також під час активної проліферації клітин, пул вільного глутаміну виснажується дуже швидко, що компенсується за рахунок протеасомної деградації протеїнів та активації біосинтезу глутаміну. Важлива біологічна роль глутаміну полягає також в тому, що в культурі клітин, як і у плазмі крові *in vivo*, глутамін виступає основним транспортером та донором "нетоксичного" азоту, необхідного для біосинтезу інших (замінних) амінокислот та загалом процесу біосинтезу протеїнів у клітинах, що активно проліферують [4]. Нестача поживних речовин, зокрема глутаміну, є важливим фактором впливу на ріст пухлин *in vivo*, тому відсутність залежності змін у регуляції експресії більшості досліджених генів від функціонування ензиму ERN1 за даних експериментальних умов є свідченням нездатності клітин гліоми у повній мірі перебудувати свій метаболізм для адаптації до пригнічення ензиму ERN1, що у свою чергу свідчить на користь можливості вважати ензим ERN1 перспективною мішенню для протипухлинної терапії.

Отже, результати проведених досліджень свідчать про те, що експресія генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ER, за умов культивування клітин у повноцінному поживному середовищі. Відсутність функціонально активного ензиму ERN1 у клітинах гліоми змінює вплив дефіциту глутаміну на експресію всіх досліджених генів. Отримані дані розкривають нові аспекти молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов інгібування сигнального ензиму ERN1, що може здійснюватися за рахунок активації експресії генів, які кодують анти-

проліферативні фактори IGFBP4 та IGFBP5 і ефекти яких реалізуються через зв'язування та інактивацію інсуліноподібних факторів росту.

## Висновки

1. Встановлено, що повне пригнічення активності ензиму ERN1 призводить до посилення експресії генів *IGF1R*, *IGFBP4* та *IGFBP5* у клітинах гліоми за стандартних умов їх вирощування.

2. Показано, що у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну збільшується рівень експресії гена *IGFBP4* та знижується – гена *IGF1R*, а пригнічення ензиму ERN1 посилює ефект дефіциту глюкози на експресію гена *IGF1R* та індукує зміни в експресії гена *IGFBP5*.

3. Результати цієї роботи свідчать про можливу участь генів рецептора подібних до інсуліну факторів росту та генів *IGFBP4* і *IGFBP5* у регуляції процесів проліферації клітин гліоми людини лінії U87 та про чутливість експресії цих генів до умов дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

## Список використаної літератури

1. Auf G. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1α 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.
2. Clarke H.G. Endoplasmic reticulum stress in malignancy / H.G. Clarke, J.E. Chambers, E. Liniker [et al.] // Cancer cell. – 2014. – Vol. 25, N 5. – P. 563–573.
3. Contois L.W. Insulin-like growth factor binding protein-4 differentially inhibits growth factor-induced angiogenesis / L.W. Contois, D.P. Nugent, J.M. Caron [et al.] // The journal of biological chemistry. – 2012. – Vol. 287, N 3. – P. 1779–1789.
4. Cooper A. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain / A. Cooper, T. Jeitner // Biomolecules. – 2016. – Vol. 6, N 2. – P. 1601–1633.
5. Ding M. Secreted IGFBP5 mediates mTORC1-dependent feedback inhibition of IGF-1 signalling / M. Ding, R. Bruck, Y. Yu // Nature cell biology. – 2016. – Vol. 18, N 3. – P. 319–327.
6. Durai R. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene therapy increases apoptosis by altering Bcl-2 and Bax proteins and decreases angiogenesis in colorectal cancer / R. Durai, S.Y. Yang, K.M. Sales [et al.] // International journal of oncology. – 2007. – Vol. 30, N 4. – P. 883–888.
7. Guvakova M. Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease / M. Guvakova // The international journal biochemistry and cell biology. – 2007. – Vol. 39, N 5. – P. 890–909.
8. Hwang J.R. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) inhibits TNF-α-induced NF-κB activity by binding to TNFR1 / J.R. Hwang, J.H. Huh, Y. Lee [et al.] // Biochemistry and Biophysical Research Communications. – 2011. – Vol. 405, N 4. – P. 545–551.
9. Kuemmerle J. Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver / J. Kuemmerle // Endocrinology and metabolism clinics of North America. – 2012. – Vol. 41, N 2. – P. 409–423.
10. Praveen Kumar V.R. Insulin like growth factor binding protein 4 promotes GBM progression and regulates key factors involved in EMT and invasion / V.R. Praveen Kumar, P. Sehgal, B. Thota [et al.] // Journal of neuro-oncology. – 2014. – Vol. 116, N 3. – P. 455–464.
11. Lee H. Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways. A novel therapeutic approach for asthma / H. Lee, S.R. Kim, Y. Oh [et al.] // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 2014. – Vol. 50, N 4. – P. 667–677.
12. Lee J. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases / J. Lee, U. Ozcan // The journal of biological chemistry. – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1203–1211.
13. Manie S.N. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update / S.N. Manie, J. Lebeau, E. Chevet // American journal of physiology. Cell physiology. – 2014. – Vol. 307, N 10. – P. C901–C907.
14. Minchenko D. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown / D. Minchenko, K. Kubajchuk, O.O. Ratushna [et al.] // Advances in biological chemistry. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 198–206.
15. Nguyen D.V. An ocular view of the IGF-IGFBP system / D.V. Nguyen, S. Li Calzi, L.S. Shaw [et al.] // Growth hormone and IGF research. – 2013. – Vol. 23, N 3. – P. 45–52.
16. Pollak M. The 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. Singh P. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer / P. Singh, J.M. Alex, F. Bast // Medical oncology. – 2014. – Vol. 31, N 1. – P. 805–819.
18. Ueno K. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma / K. Ueno, H. Hirata, S. Majid [et al.] // International journal of cancer. – 2011. – Vol. 129, N 10. – P. 2360–2369.
19. Wang J. Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells / J. Wang, N. Ding, Y. Li [et al.] // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, N 24. – P. 20636–20649.

#### References

1. Auf G, Jabouille A, Delugin M, Guerit S, Pineau R, North S [et al.]. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*. 2013;13(597):59701-12.
2. Clarke HJ, Chambers JE, Liniker E, Marciniak SJ. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*. 2014;25(5):563-73.
3. Contois LW, Nugent DP, Caron JM, Cretu A, Tweedie E, Akalu A [et al.]. Insulin-like growth factor binding protein-4 differentially inhibits growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem*. 2012;287(3):1779-89.
4. Cooper A, Jeitner T. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules*. 2016;6(2):1601-33.
5. Ding M, Bruick R, Yu Y. Secreted IGFBP5 mediates mTORC1-dependent feedback inhibition of IGF-1 signalling. *Nat Cell Biol*. 2016;18(3):319-27.
6. Durai R, Yang SY, Sales KM, Seifalian AM, Goldspink G, Winslet MC. Insulin-like growth factor binding protein-4 gene therapy increases apoptosis by altering Bcl-2 and Bax proteins and decreases angiogenesis in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2007;30(4):883-8.
7. Guvakova M. Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(5):890-909.
8. Hwang JR, Huh JH, Lee Y, Lee SI, Rho SB, Lee JH. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) inhibits TNF-α-induced NF-κB activity by binding to TNFR1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405(4):545-51.

9. Kuemmerle J. Insulin-like growth factors in the gastrointestinal tract and liver. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(2):409-23.
10. Praveen Kumar VR, Sehgal P, Thota B, Patil S, Santosh V, Kondaiah P. Insulin like growth factor binding protein 4 promotes GBM progression and regulates key factors involved in EMT and invasion. *J Neurooncol*. 2014;116(3):455-64.
11. Lee H, Kim SR, Oh Y, Cho SH, Schleimer RP, Lee YC. Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways. A novel therapeutic approach for asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;50(4):667-77.
12. Lee J, Ozcan U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* – 2014;289(3):1203-11.
13. Manie SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2014;307(10):C901-7.
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. *Advances in Biological Chemistry*. 2012;2(2):198-206.
15. Nguyen DV, Li Calzi S, Shaw LC, Kielczewski JL, Korah HE, Grant MB. An ocular view of the IGF-IGFBP system. *Growth Horm IGF Res*. 2013;23(3):45-52.
16. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(3):159-69.
17. Singh P, Alex JM, Bast F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer // *Med Oncol*. 2014;31(1):805-19.
18. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2360-9.
19. Wang J, Ding N, Li Y, Cheng H, Wang D, Yang Q [et al.]. Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) functions as a tumor suppressor in human melanoma cells. *Oncotarget*. 2015;6(24):20636-49.

Надійшла до редколегії 02.06.16

A. Харьков, асп.  
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,  
O. Минченко, проф.  
Институт биохимии имени А.В. Палладина, Киев, Украина

### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *IGF1R*, *IGFBP4* И *IGFBP5* В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ ЛИНИИ U87 ПРИ ДЕФИЦИТЕ ГЛУТАМИНА

Работа посвящена изучению экспрессии генов рецептора инсулиноподобного фактора роста (*IGF1R*) и протеинов *IGFBP4* и *IGFBP5*, которые связываются с инсулиноподобными факторами роста, в клетках глиомы линии U87 в условиях дефицита глутамина в связи с ингибированием сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума *ERN1* (энзим сигнализации от эндоплазматического ретикулума до ядра), который контролирует пролиферацию клеток. Установлено, что в условиях дефицита глутамина наблюдается повышение уровня экспрессии гена *IGFBP4* и угнетение экспрессии *IGF1R* на уровне мРНК в контрольных клетках глиомы, но экспрессия *IGFBP5* в этих клетках не зависит от наличия глутамина в питательной среде. В то же время, ингибирование *ERN1* модифицирует эффект дефицита глутамина на экспрессию гена *IGFBP5*, поскольку в клетках глиомы, которые не экспрессируют функционально активный энзим *ERN1*, при дефиците глутамина наблюдается снижение уровня экспрессии гена этого *IGFBP*. Мы также показали, что экспрессия всех исследованных генов в клетках глиомы регулируется сигнальным энзимом *ERN1* при стандартных условиях культивирования, поскольку ингибирование *ERN1* существенно усиливает экспрессию генов *IGFBP4* и *IGFBP5*, протеиновые продукты которых являются основными ингибиторами про-пролиферативной активности инсулиноподобных факторов роста *IGF1* и *IGF2*. В условиях ингибирования активности *ERN1* в клетках глиомы также наблюдается увеличение уровня экспрессии гена *IGF1R* в сравнении с контрольными клетками глиомы. Результаты данной работы продемонстрировали, что недостаток глутамина нарушает экспрессию исследуемых генов и что подавление *ERN1* преимущественно изменяет экспрессию этих генов.

Ключевые слова: *ERN1*, экспрессия генов, *IGF1R*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, линия клеток глиомы U87, дефицит глутамина.

A. Kharkova, PhD stud.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,  
O. Minchenko, prof.  
Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine

### EXPRESSION OF *IGF1R*, *IGFBP4* AND *IGFBP5* GENES IN U87 GLIOMA CELLS UPON GLUTAMINE DEPRIVATION

We have studied the expression of insulin-like growth factor receptor (*IGF1R*) and insulin-like growth factor binding protein (*IGFBP4* and *IGFBP5*) genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation condition in relation to inhibition of *ERN1* (endoplasmic reticulum to nuclei signaling 1), a sensor and signaling enzyme of endoplasmic reticulum stress, which control cell proliferation. It was shown that exposure control glioma cells upon glutamine deprivation condition leads to up-regulation of *IGFBP4* and down-regulation of *IGF1R* expression at the mRNA level in control glioma cells, but *IGFBP5* gene expression in these cells does not depend upon glutamine deprivation. At the same time, inhibition of *IRE1* modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of *IGFBP5* gene because in glioma cells without functional activity of *ERN1* glutamine deprivation leads to suppression of this *IGFBP*. We have also shown that the expression of all studied genes in glioma cells is regulated by *ERN1* signaling enzyme at standard condition because *ERN1* inhibition significantly enhances the expression of *IGFBP4* and *IGFBP5* genes. Proteins encoded by these genes are major inhibitors of pro-proliferative activity of insulin-like growth factors *IGF1* and *IGF2*. We have also shown upregulation of the expression level of *IGF1R* gene in glioma cells with *ERN1* knockdown as compared to control glioma cells. Results of this study shown that glutamine deprivation affects the expression of studied genes and that *ERN1* inhibition preferentially changes these genes expression.

Key words: *ERN1*, gene expressions, *IGF1R*, *IGFBP4*, *IGFBP5*, glioma U87 cells, glutamine deprivation.