

УДК 577.112.7

Б. Терлецький, асп., Д. Мінченко, наук. співроб.,
О. Губеня, пров. інж., О. Мінченко, проф.

ВПЛИВ ГІПОКСІЇ, ДЕФІЦИТУ ГЛЮКОЗИ АБО ГЛЮТАМІНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ GAS1 ТА GAS6 У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ U87 ЗАЛЕЖИТЬ ВІД ФУНКЦІЇ ГЕНА ERN-1

Гіпоксія є однією із характерних рис ішемії, що індукує комплекс внутрішньоклітинних сигналів шляхом порушення фолдингу протеїнів, які сприймаються сенсорною сигнальною системою ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 (ERN-1). Ми досліджували вплив гіпоксії, а також дефіциту глюкози або глютаміну, на експресію генів, що специфічно пригнічують ріст клітин (GAS1 та GAS6), та її залежність від функції гена ERN-1 у клітинах гліоми лінії U87. Встановлено, що гіпоксія та дефіцит глюкози істотно знижують рівень експресії мРНК як GAS1, так і GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, а блокада функції гена ERN-1 в цих клітинах призводить до вираженого збільшення рівня експресії мРНК GAS1 і GAS6, а також змінює ефект гіпоксії та дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК обох генів. Крім того, було показано, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії генів GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, але в клітинах з пригніченою функцією гена ERN-1 спостерігається зниження рівня експресії гена GAS1 без істотних змін в експресії гена GAS6. Таким чином, результати даної роботи свідчать про істотні зміни в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин (GAS1 та GAS6), у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та дефіциту глюкози, багатократно посилюється за умов блокади функції гена ERN-1, причому величина ефекту гіпоксії, а також дефіциту глюкози або глютаміну, на рівень експресії досліджуваних генів залежить від функції гена ERN-1.

Hypoxia is an essential features of ischemia, have been shown to induce a set of complex intracellular signaling events known as the unfolded protein response which is mediated by endoplasmic reticulum – nuclei-1 signaling system (ERN-1). We studied effect of hypoxia as well as glucose or glutamine deprivation on the expression of growth arrest specific genes (GAS1 and GAS6) in U87 glioma cells and its dependence from ERN-1 signaling enzyme function. It was shown that hypoxia and glucose deprivation significantly decreased the expression of GAS1 and GAS6 mRNA levels in U87 glioma cells. Moreover, blockade of IRE-1 gene expression in this cell line is significantly increased the expression of GAS1 and GAS6 mRNA levels and change the effect of hypoxia and glucose deprivation on the expression of both genes. However, the level of GAS1 and GAS6 mRNA expression in glioma cell line U87 significantly did not change in glutamine deprivation conditions, but the suppression of GAS1 gene expression was observed in modified U87 cells without ERN-1 gene function. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that there are significant changes in the expression of growth arrest specific genes (GAS1 and GAS6) in U87 glioma cells in hypoxia and glucose deprivation, strongly increased under blockade of ERN-1 gene expression. Moreover, effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation on the level of investigated genes expression is depended from ERN-1 gene function.

Вступ. Гіпоксія є однією із характерних рис злоякісних пухлин, вона значною мірою визначає інтенсивність їх росту. І якщо роль транскрипційного фактора, що індукується за гіпоксії, (HIF) в рості злоякісних пухлин достатньо добре вивчена, то роль додаткових механізмів ще недостатньо з'ясована [1, 2]. Відомо, що умовах гіпоксії, коли має місце не лише дефіцит кисню, а і АТФ, у клітинах спостерігається індукція комплексу внутрішньоклітинних сигналів у відповідь на накопичення у ендоплазматичному ретикулумі неправильно згорнутих протеїнів (Unfolded Protein Response; UPR), які сприймаються трьома сенсорними сигнальними системами: активуючого транскрипційного фактора 6 (ATF6), протеїніназою ендоплазматичного ретикулуму (PERP) та залежного від сигнального фактора ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 (ERN-1), який має ще одну назву – залежний від інозитолу енім-1альфа (IRE-1альфа) [3, 4].

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 [5]. Вона має дві каталітичні ділянки, серин/треонін кіназу та ендорибонуклеазу, які є складовими ERN-1 сигналювання. ERN-1 є не лише сенсором стресу ендоплазматичного ретикулуму, а і медіатором порушення фолдингу протеїнів.

Встановлено, що зв'язування неправильно згорнутих протеїнів з сенсорною ділянкою ERN-1 ініціює його димеризацію та активацію серин/треонін кінازی, причому саме серин/треонінова кінза відповідає за аутофосфорилування та димеризацію даного ензиму [5]. Димеризація ERN-1 є надзвичайно важливим етапом в активації сигнальної системи ERN-1, що приводить до змін в JNK-сигналюванні та індукує ендорибонуклеазний домен ERN-1, а це, в свою чергу, ініціює сплайсинг пре-мРНК транскрипційного фактора XBP1 (Х-бокс зв'язуючого протеїну1), а також деградацію ряду мРНК [6].

Сплайс-варіант мРНК транскрипційного фактора XBP1, що експресується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму, кодує синтез меншого за розміром фактора, який змінює експресію великої групи специфічних генів, що контролюють згортання протеїнів та посилюють виживання клітин в умовах гіпоксії або знищують їх, посилюючи апоптоз. Недавно було показано, що транскрипційний фактор XBP1 має сайти зв'язування в промоторних ділянках великої групи генів [7]. Разом з тим, є дані, що інгібітор кінازی сигнального ензиму ERN1 активує ендорибонуклеазну активність ERN1 для захисту клітин в умовах стресу ендоплазматичного ретикулуму. Встановлено, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для індукованої ішемією експресії ендотеліального фактора росту судин А (VEGFA) і вносить свій вклад в ангіогенез та ріст злоякісних пухлин in vivo [8].

Недавно були виявлені мутації гена ERN1 у злоякісних пухлинах людини, що вказує на його важливість у контролі росту пухлин, включаючи гліоми, серед багатьох інших протеїніназ. Дослідження на двох експериментальних моделях пухлин (імплантація пухлини в мозок мишей та в ембріони курчат) показали, що ERN1 сигнальний шлях пов'язаний з процесом неоваскуляризації і росту пухлин, а також тісно пов'язаний з процесом смерті клітин [8]. Недавно було встановлено, що блокада гена ERN1 у клітинах гліоми пригнічує ріст пухлинних клітин, експресію про-ангіогенних факторів (VEGF-A, IL-1beta, IL-6 і IL-8) та посилює експресію анти-ангіогенних факторів (SPARC, декорін і тромбоспондін-1) [9].

Всі три сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулуму представлені трансмембранними протеїнами, що здатні зв'язувати неправильно згорнуті протеїни та шаперон BiP (GRP78, HSPA5) своєю сенсорною частиною, що знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, 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 [4 – 6]. Було також показано, що експресія шаперону GRP78 посилюється у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулу. Всі три сигнальні системи, що реагують на різні види стресу ендоплазматичного ретикулу 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 знищення клітини. Разом з тим, стрес ендоплазматичного ретикулу є одним із факторів, що забезпечує виживання клітин злоякісних пухлин в умовах гіпоксії та активує ріст пухлин [3, 4, 8].

Група генів GAS, що специфічно пригнічують ріст клітин, є чисельною, але у даній роботі ми дослідили експресію двох із них, GAS1 та GAS6 [10 – 14]. Недавно було показано, що GAS1 відіграє важливу роль в пригніченні росту клітин, блокуючи вхід клітин в S-фазу і, відповідно, їх поділ, причому як трансформованих, так і нормальних клітин. Встановлено, що GAS1 пригнічує проліферацію гліомних клітин за відсутності Shh і індукує їх апоптоз, зменшує рівень фосфорилування протеїну Ret по тирозину 1062 і змінює опосередковане фактором GDNF внутрішньоклітинне сигналювання, а в експериментах на клітинах меланоми було встановлено, що продукт гена GAS1 пов'язаний з посиленням апоптозу і не лише пригнічує метастазування, а і посилює зворотний розвиток метастазів [11, 12]. Більше того, GAS1 може бути відповідальним за пригнічення резистентності злоякісних пухлин шлунку до антипухлинних препаратів, зокрема до епірубіцину [13].

Ген GAS6, продуктом якого є протеїн, що містить гама-карбоксиглутамінову кислоту, також відіграє важливу роль в регуляції виживання та міграцію клітин [14]. Встановлено, що він може впливати на сигнальні шляхи клітин, утворюючи комплекси з MER рецептором (в попередниках В-клітин за гострої форми лімфобластної лейкемії) або з фактором Axl (в дендритних клітинах та в клітинах карциноми нирки) [14 – 16].

Оскільки роль генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у функціонуванні сигнального шляху ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 детально не досліджувалась, то **метою даної роботи** було вивчити вплив гіпоксії та дефіциту глюкози або глютаміну на експресію генів GAS1 та GAS6, а також їх роль у функціонуванні ERN-1-сигнального шляху в клітинах гліом, найбільш злоякісних 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 ERN-1, яку було отримано в результаті селекції клонів, стабільно трансфєкованих домінант-негативною конструкцією ERN-1 у векторі pcDNA3.1+. У якості контролю були використані клітини, стабільно трансфєковані експресійним еукаріотичним вектором pcDNA3.1+. Клітини були отримані від проф. М. Moenpfer (Франція) [8]. Росли клітини у середовищі DMEM, як описано [8]. При дослідженні впливу гіпоксії, клітини гліоми витримували протягом 16-ти годин в інкубаторі, у якому підтримували концентрацію кисню та диоксиду вуглецю на рівні 3 та 5 %, відповідно. В експериментах по вивченню впливу дефіциту глюкози або глютаміну U87 клітини гліоми росли протягом 16-ти годин в середовищі без глюкози або без глютаміну для моделювання ефектів ішемії.

РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу ви-

робника, як описано раніше [17]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Експресію генів GAS1 і GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, а також бета-актину, як контрольного гена, досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cyclex" (США), використовуючи ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Об'єднане Королівство) та специфічні для цих генів щупа пари праймерів (Sigma, США). Для цього тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з допомогою набору "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короточасно (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.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції були використані такі пари праймерів: для GAS1: 5'-CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і 5'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 287-306 та 508-489 кДНК GAS1 людини (GenBank номер NM_002048); для GAS6: 5'-CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і 5'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 287-306 та 508-489 кДНК GAS6 людини (GenBank номер NM_000820);

Відносну кількість транскриптів GAS1 та GAS6 розраховували по кількості транскриптів бета-актину. Для ампліфікації бета-актину використовували наступні праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3'. Прямий праймер починається із 704-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – з 937-го нуклеотидного залишку (3'-позиція; GenBank номер X00351).

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 рис. 1, рівень експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у клітинах гліоми лінії U87 за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції знижується в умовах гіпоксії більше ніж вдвічі (на 51 та 55 %, відповідно), порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані еукаріотичним вектором експресії pcDNA3.1+ без вставки. За умов блокади функції гена ERN1 (сублінія клітин гліоми лінії U87 з надекспресією мутантного ERN1 [8]) спостерігається багатократне збільшення рівня експресії як гена GAS1, так і гена GAS6: в 7,3 та 6,7 рази, відповідно, також порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані вектором pcDNA3.1+ без вставки (рис. 1).

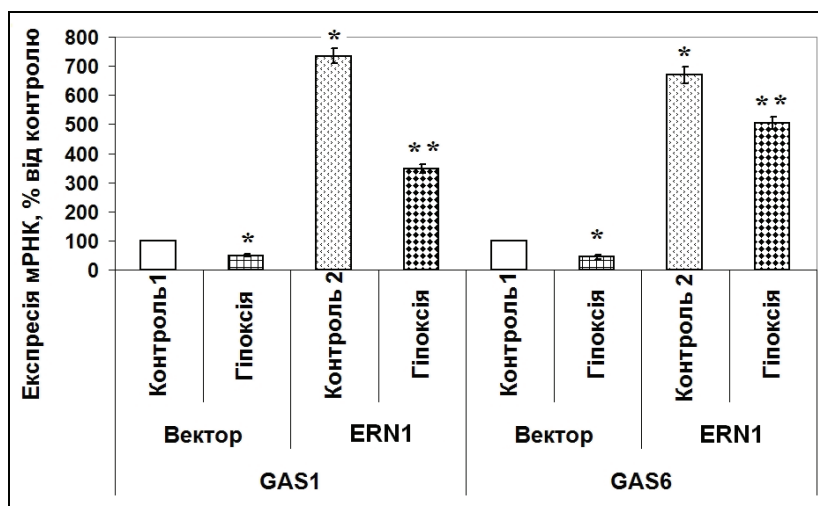


Рис. 1. Вплив гіпоксії на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфєкованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 за гіпоксії (3 % кисню протягом 16-ти годин) в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$. Контроль 1 – клітини, трансфєковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфєковані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Встановлено також, що в клітинах гліоми з пригніченою функцією гена ERN1 гіпоксія також знижує рівень експресії гена GAS1 майже в такій же мірі, як і у контрольних U87 клітинах гліоми (- 53 %), а рівень експресії гена GAS6 в цих клітинах зменшується лише на 25 %, порівняно з клітинами, які були трансфєковані конструкцією мутантного ERN1 в експресійному векторі рсDNA3.1+.

На рис. 2 представлені дані про вплив одного із факторів ішемії, дефіциту глюкози, на рівень експресії генів

GAS1 та GAS6. Інкубація клітин гліоми лінії U87 в середовищі без глюкози також приводить до зниження рівня експресії мРНК GAS1 та GAS6 подібно до дії гіпоксії (- 56 та - 63 %, відповідно), порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані вектором рсDNA3.1+ без вставки, але за умов блокади функції гена ERN1 ефект дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК був більш вираженим для гена GAS1 (- 70 %) і значно меншим для гена GAS6 (- 32 %) у порівнянні з клітинами, які були трансфєковані конструкцією мутантного ERN1.

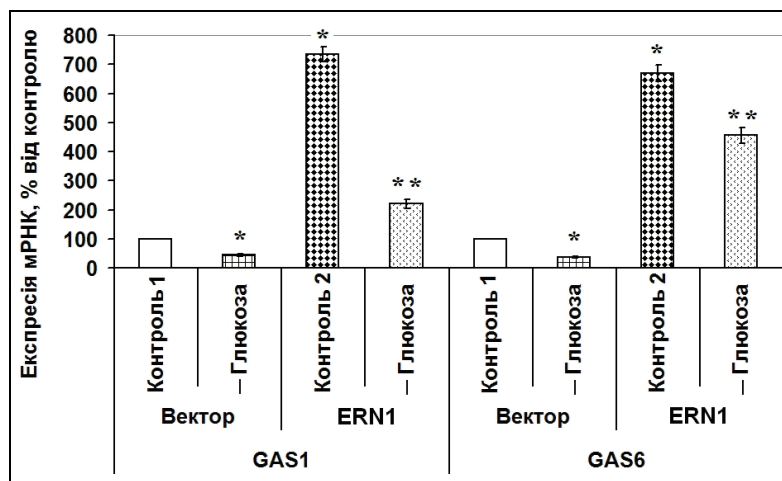


Рис. 2. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфєкованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$. Контроль 1 – клітини, трансфєковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфєковані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Крім того, були проведені дослідження експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87 та в сублінії клітин гліоми з пригніченою функцією гена

ERN1 за умов інкубації їх в середовищі без глютаміну, іншої моделі ішемії [8]. Результати цих досліджень представлені на рис. 3.

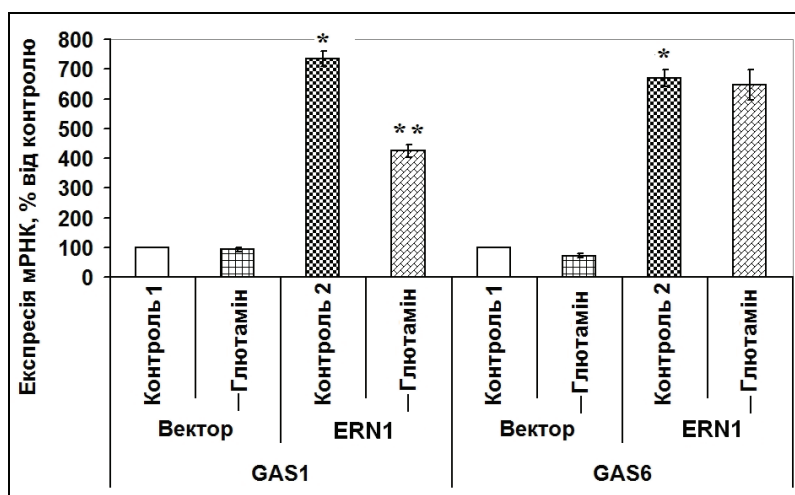


Рис. 3. Вплив дефіциту глютаміну на експресію мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфєкованих домінант/негативною конструкцією сигнального ензиму ендоплазматичний ретикулум – ядро (dnERN1) у векторі рсDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК GAS1 та GAS6 нормалізували по експресії бета-актину. Зміни в експресії мРНК GAS1 та GAS6 в цих клітинах порівнювали з контролем 1, прийнятим за 100 %; $n = 3$. Контроль 1 – клітини, трансфєковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфєковані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, а ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2

Було встановлено, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії мРНК GAS1 у клітинах гліоми лінії U87, але знижує на 28 % рівень експресії мРНК GAS6, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані вектором рсDNA3.1+ без вставки. В той же час, у сублінії U87 клітин гліоми за умов блокади функції гена ERN1 дефіцит глютаміну призводить до зменшення рівня експресії мРНК GAS1 на 38 %, але не змінює істотним чином експресію гена GAS6. Таким чином, за умов блокади функції гена ERN1 у клітинах гліоми дефіцит глютаміну призводить до протилежно направлених змін у порівнянні з клітинами, які були трансфєковані вектором.

Багатократне збільшення рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у сублінії клітин гліоми з заблокованою функцією гена ERN1, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфєковані експресійним вектором рсDNA3.1+ без вставки, узгоджується з даними інших авторів [8]. Цими дослідниками було показано, що ERN1 сигнальний каскад є важливим для експресії А-форми ендотеліального фактора росту судин, що індукується ішемією, і вносить свій вклад в ангіогенез та ріст злоякісних пухлин *in vivo* і що пригнічення функції ERN1 істотно сповільнює їх ріст, зменшує рівень ендотеліального фактора росту судин та сповільнює ангіогенез. І підвищення рівня експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, в клітинах з пригніченою функцією ERN1, безперечно вносить свій вагомий внесок в пригнічення росту злоякісних пухлин та посилення апоптозу пухлинних клітин, оскільки саме така дія описана для опосередкованих GAS1 та GAS6 сигнальних шляхів [10 – 15].

Відомо, що гіпоксія та ішемія є вагомими чинниками стимуляції пухлинного росту і їх вплив на ріст злоякісних пухлин опосередковується адаптивною реакцією для виживання клітин, що представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання протеїнів і їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, головним чином через сенсорну сигнальну систему фактора ендоплазматичний ретикулум – ядро-1 [2, 18, 19]. У зв'язку з цим, отримані нами результати по зниженню рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин, у клітинах гліоми лінії U87 за гіпоксії та дефіциту глюкози роз-

криває деякі сторони механізму стимуляції росту пухлинних клітин за цих умов. Більше того, сповільнення росту злоякісних пухлин за умов пригнічення функції гена ERN1 можна пояснити також і послабленням ефекту гіпоксії та дефіциту глюкози на рівень експресії генів GAS1 та GAS6.

Результати даної роботи переконливо свідчать про істотні зміни в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, у клітинах гліоми в умовах гіпоксії, за дефіциту глюкози та пригнічення функції гена ERN1, причому величина ефекту гіпоксії та дефіциту глюкози на експресію цих специфічно пригнічуючих ріст клітин генів залежить від функції гена ERN1.

Таким чином, експресія генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, GAS1 та GAS6, є важливим фактором контролю проліферації злоякісних пухлин, а сповільнення їх росту при блокаді експресії гена ERN1 асоціюється з багатократним підвищенням рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що вказує на залежність експресії цих генів від функціонування ERN1 сигнальної системи. Можна припустити, що посилена проліферація злоякісних пухлин, в яких присутні ефекти гіпоксії та ішемії, обумовлена також зниженням рівня експресії генів GAS1 та GAS6 в результаті дії цих чинників. Ці принципово нові дані щодо залежності змін в експресії генів, що специфічно пригнічують ріст клітин, від функції гена ERN1 заслуговують на подальше поглиблене дослідження з метою пошуку можливих терапевтичних мішеней для селективного блокування про-пухлинної активності IRE1 шляхом дизайну специфічних інгібіторів росту злоякісних пухлин.

Висновки.

1. Встановлено, що блокада гена ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до багатократного збільшення рівня експресії генів GAS1 та GAS6, що специфічно пригнічують ріст клітин.

2. Показано, що гіпоксія або дефіцит глюкози знижують рівень експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, а за умов блокади функції гена ERN1 ефект цих чинників на рівень експресії мРНК GAS6 зменшується.

3. Встановлено, що дефіцит глютаміну істотно не змінює рівень експресії мРНК GAS1 та GAS6 у клітинах гліоми лінії U87, але за умов блокади функції гена

ERN1 дефіцит глутаміну призводить до зменшення рівня експресії мРНК GAS1.

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. Aragón T., van Anken E., Pincus D. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 736 – 740. 4. Fels D.R., Koumenis C. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – 5, N 7. – P. 723 – 728. 5. Korenykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. // *Nature.* – 2009. – 457, N 7230. – P. 687 – 693. 6. Hollien J., Lin J.H., Li H. et al. // *J. Cell. Biol.* – 2009. – 186, N 3. – P. 323 – 331. 7. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // *Molecular Cell.* – 2007. – 27. – P. 53 – 66. 8. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – 67. – P. 6700 – 6707. 9. Auf G., Jabouille A., Guérit S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. – 107, N 35. – P. 15553 – 15558. 10. Dominguez-Monzon G., Benítez J.A., Vergara P. et al. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2009. – Vol. 27, N 4. – P. 305-

313. 11. Gobeil S., Zhu X., Doillon C.J., Green M.R. // *Genes Dev.* – 2008. – Vol. 22, N 21. – P. 2932-2940. 12. Lopez-Ramirez M.A., Dominguez-Monzon G., Vergara P., Segovia J. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2008. – Vol. 26, N 5. – P. 497-503. 13. Zhao L., Pan Y., Gang Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 39. – P. 26273-26285. 14. Shiozawa Y., Pedersen E.A., Taichman R.S. // *Exp. Hematol.* – 2010. – Vol. 38, N 2. – P. 132-140. 15. Scutera S., Fraone T., Musso T. et al. // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 5. – P. 3004-3013. 16. Gustafsson A., Martuszewska D., Johansson M. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, N 14. – P. 4742-4749. 17. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Ochiai A. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2005. – 280, N 1-2. – P. 227 – 234. 18. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssegur J. // *J. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 85, N 12. – P. 1301 – 1307. 19. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* 2007. – 67, N 22. – P. 10631 – 10634.

Надійшла до редколегії 17.12.10

УДК 581.331.2

Т. Карпюк, асп., О. Футорна, канд. біол. наук

ПАЛІНОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОДІВ *AECHMEA* RUIZ. & PAV., *BILLBERGIA* THUNB., *NEOREGELIA* L.B.SMITH, *NIDULARIUM* LEM. РОДИНИ *BROMELIACEAE* JUSS

За допомогою світлової і сканувальної електронної мікроскопії досліджено пилкові зерна 10 видів підродини *Bromelioideae* Burnett. Пилкові зерна досліджених видів сулькатні або порові, еліпсоїдальні або сфероїдальні, переважно середнього розміру, з сітчастою, ямчастою, зморшкувато-ямчастою скульптурою. Встановлено, що аперттури, форма пилкових зерен і деталі будови скульптури є важливими таксономічними ознаками на родовому та видовому рівнях.

Pollen morphology of 10 species of the subfamily Bromelioideae (Bromeliaceae) was examined using the light and scanning electron microscopy. Pollen grains are monads, elliptical or spheroidal, 1-sulcate or porate, mainly medium-size with reticulate, perforate and rugulate ornamentation. Characters of the apertures sculpture's surface are diagnostic of the genus and species level.

Вступ. У світовій флорі родина *Bromeliaceae* налічує близько 2500 видів, поширених переважно в тропічних і субтропічних зонах Нового світу [6]. Згідно останніх даних Smith & Till [14] підродина *Bromelioideae* Burnett включає 31 рід, 724 види. Найбільшими є роди: *Aechmea* Ruiz. & Pav. (185 видів), *Neoregelia* L.B.Smith (100 видів), *Billbergia* Thunb. (65 видів), *Nidularium* Lem. (50 видів), *Bromelia* L. (50 видів). Вчені не мають спільної думки щодо систем підродини та окремих її родів. Наприклад, класично рід *Aechmea* за життєвою формою, морфологією і розмірами поділявся на 8 підродів: 1. *Podaeachmea*, 2. *Lamprococcus*, 3. *Aechmea*, 4. *Orgiesia*, 5. *Platyachmea*, 6. *Pothuava*, 7. *Macrochordion*, 8. *Chevaliera* [5]. В той же час молекулярні дані Horres & Schulte [9] не змогли остаточно підтвердити ці спростувані класичну систему роду *Aechmea*.

За результатами молекулярно-філогенетичних досліджень рід *Aechmea* є сестринським до інших родів підродини *Bromelioideae*, які формують кладу *eubromelioids* (еубромеліоїдів) [12]. За даними Sass et al [12, 13] рід *Aechmea* є поліфілетичним та формує з родами *Neoregelia* і *Nidularium* невелику групу.

Відомості про будову пилкових зерен (п.з.) представників підродини *Bromelioideae* вкрай незначні.

Перші дослідження пилку бромелієвих належать Мецу [10], які він здійснив на початку минулого століття. Автор виділив три типи пилкових зерен: безапертурний, поровий і сулькатний (з однією дистальною борозною). Згідно паліноморфологічних даних він розділив родину на три підродини *Integrae*, *Poratae*, *Sulcatae*. Згодом Ердтман уточнив дані Меца, і встановив, що пилкові зерна *Bromeliaceae* завжди є дистально-однорозними [4].

На сьогодні досліджені пилкові зерна окремих родів і видів родини *Bromeliaceae*. А саме – з підродини *Tillandsioideae* Burnett під світловим (СМ) і сканувальним електронним мікроскопом (СЕМ) вивчалися п.з. представників родів *Tillandsia* L. [4, 7, 8, 10, 11], *Vriesea* Lindl., *Guzmania* Ruiz. & Pav. [7, 8, 10]. З підродини *Pitcairnioideae* Harms — п.з. видів роду *Pitcairnia* L'Her досліджувалися за допомогою СМ і СЕМ [4, 7], а п.з. видів роду *Dyckia* Schult. — лише під СМ [4, 10]. Пил-

кові зерна роду *Hechtia* Klotzsch з підродини *Hechtioideae* Givnish вивчалися під СМ [4, 10]. За допомогою світлової та сканувальної електронної мікроскопії досліджувались п.з. представників найбільшої підродини *Bromelioideae*, а саме види родів *Aechmea*, *Ananas* Mill., *Bromelia* L. – СМ і СЕМ [4, 7, 10]; п.з. родів *Neoregelia*, *Nidularium*, *Billbergia* – СМ [4, 10]. Завдяки цим дослідженням, встановлено, що сулькатний тип апертур пилкових зерен є переважним у родині, поровий тип п.з. властивий представникам підродини *Bromelioideae*, безапертурний трапляється у деяких представників підродин *Tillandsioideae* і *Bromelioideae*. У межах сулькатного палінотипу, ряд авторів виділяють 6 підтипів, а в межах порового типу підтипів не виділяли [7, 11].

Актуальним є більш детальне вивчення паліноморфологічних даних, для подальшого порівняння їх з результатами молекулярно-філогенетичних досліджень.

Матеріали і методи. Зразки пилку були відібрані в тропічній оранжереї однодольних рослин Ботанічного саду ім. акад. О.В.Фоміна ННЦ "Інститут біології". Досліджено морфологію пилкових зерен 10 видів з 4 родів підродини *Bromelioideae* світової флори. Для вивчення під світловим мікроскопом (СМ, Carl Zeiss) готували гліцерин-желатинові препарати з використанням рідини Келберла [2]. Вимірювали 20 пилкових зерен кожного зразка при збільшенні $\times 1000$. Для дослідження пилку під сканувальним електронним мікроскопом (СЕМ, JSM-35C) матеріал фіксували на латунних столиках у 96%-му етанолі та напилковали сумішшю золота і платини. При опису пилкових зерен ми використовували термінологію П. І. Токарева [3] і Купріянової та Альошиної [1].

Результати та обговорення

Рід *Billbergia*

B. brasiliensis L.B.Smith (рис. 1, 1; рис. 2, 1,2)

СМ. Пилкові зерна білатерально-симетричні, дистально-однорозні, еліпсоїдальні за формою, в обрисі з полюса округлі, з екватора – плоско-випуклі. Полярна вісь – 77,1 – 88,6 мкм, екваторіальний діаметр – 36,4 – 41,6 мкм. Борозни довгі (62,6 – 65,3 мкм), з чіткими краями, звужені до загострених кінців. Екзина 1,9 – 2,7 мкм