

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

СЛОНЧАК Андрій Миколайович

УДК 577.152.28

**КЛІТИНОСПЕЦИФІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ ТРАНСКРИПЦІЇ
ГЕНА ГЛУТАТІОН S-ТРАНСФЕРАЗИ P1 ЛЮДИНИ**

03.00.03 – молекулярна біологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ-2009

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії системної біології відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Оболенська Марія Юріївна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач лабораторії системної біології
відділу механізмів трансляції генетичної інформації.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Мінченко Олександр Григорович,
Інститут біохімії імені О.В.Палладіна НАН України,
завідувач відділу молекулярної біології,
заступник директора з наукової роботи;

доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри загальної та молекулярної генетики.

Захист відбудеться 26 січня 2009 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано ____ грудня 2009 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

О.В. Підпала

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Глутатіон S-трансфераза P1 (*GSTP1*) є основним ферментом II фази детоксикації у більшості типів клітин. Інтерес до даного ферменту зумовлений, перш за все, його участю у процесах канцерогенезу та у формуванні стійкості пухлин до хіміотерапії. Зокрема, пригнічення експресії гена глутатіон S-трансферази P1 спостерігається майже у 90 % злоякісних новоутворень простати та молочної залози (Hayes, 1995). Це пояснюється тим, що зниження експресії гена *GSTP1* і відповідне зниження глутатіонтрансферазної активності зменшує ефективність детоксикації і робить клітини чутливішими до дії генотоксичних канцерогенних сполук. Часто у ракових клітинах, які мали знижений рівень експресії *GSTP1* на початкових етапах свого розвитку, після застосування хіміотерапії відбувається індукція даного гена, що є негативним прогностичним показником, оскільки глутатіон S-трансфераза P1 ефективно знешкоджує антинеопластичні ліки і при гіперекспресії зумовлює множинну стійкість ракових клітин до хіміотерапії. Зокрема, таке явище описано для раку молочної залози (Morrow et al., 1998).

З огляду на роль, яку відіграє глутатіонтрансфераза P у захисті організму від шкідливої дії ксенобіотиків, та зменшенні ефективності хіміотерапії, цей ензим активно досліджується. Ключовими питаннями цих досліджень є те, як запобігти зниженню експресії *GSTP1* у нормальних клітинах з метою попередження їхнього злоякісного переродження і як запобігти індукції цього гена при хіміотерапії. У зв'язку з цим, останніми роками набуває розвитку хемопревентивна стратегія боротьби зі злоякісними пухлинами, що базується на застосуванні препаратів, які перешкоджають утворенню злоякісної пухлини. Встановлено, що певні хемопревентивні препарати є активаторами транскрипції гена глутатіон S-трансферази P1-1 (Duvoix et al., 2003), проте молекулярні механізми їхньої дії, так само, як і механізми, що відповідають за зниження експресії гена *GSTP1*, яке є передумовою канцерогенезу, майже не досліджені. Дослідження регуляції транскрипції гена *GSTP1* в ракових клітинах сьогодні є актуальними з огляду на можливе застосування отриманих знань для розробки нових хемопревентивних препаратів. Саме розкриттю молекулярних механізмів, які відповідають за репресію гена *GSTP1* у малігнізованих клітинах, і присвячена дана робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводили в рамках бюджетного тематичного плану відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації 1 вищих еукаріот» (шифр теми – 2.2.4.9, № державної реєстрації 0105V005340, 2006-2010рр.), за підтримки грантів Президента України для обдарованої молоді "Біомаркери для попередження ускладнень вагітностей в Україні" (2006 р.), Українсько-словацького співробітництва (№ М/28-2008 від 27. 03. 2008), Міністерства науки і вищої освіти Польщі (N40115732/3043) та стипендії UNESCO.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було визначення ролі цис- та транс- діючих факторів у забезпеченні клітинспецифічного рівня транскрипційної активності гена глутатіон S-трансферази P1 людини.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання: визначити рівень мРНК *GSTP1* у різних типах клітинних ліній та обрати ті з них, які суттєво відрізняються за рівнем експресії *GSTP1*, для подальшого дослідження; клонувати промотор *GSTP1* та його фрагменти; встановити функціональну роль різних елементів промотору гена *GSTP1* в клітинах обраних ліній за допомогою люциферазного тесту; визначити транскрипційні фактори, що взаємодіють з сайтами впізнавання промотору *GSTP1* в обраних типах клітин; використовуючи систему плацента – клітини хоріокарциноми, дослідити зміни в механізмах регуляції транскрипції гена *GSTP1* при злоякісній трансформації; визначити метилування промотору гена *GSTP1* в клітинах зі зниженою його експресією.

Об'єктом дослідження була регуляція транскрипції, а предметом дослідження – ген *GSTP1*. У роботі використовували загальноприйняті методи молекулярної біології: кількісну ЗТ-ПЛР, напівкількісний імуноблотинг, бісульфітну модифікацію ДНК, полімеразну ланцюгову реакцію, молекулярне клонування ДНК, культивування клітин та їх трансфекцію, люциферазний тест, дослідження електрофоретичної рухливості ДНК-білкових комплексів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено якісні відмінності у спектрі транскрипційних факторів, що взаємодіють із промотором гена *GSTP1* в клітинах різного типу та з різним рівнем експресії гена; встановлено, що репресія транскрипції зумовлена дією транскрипційних факторів і може закріплюватись за рахунок метилування промотору. Вперше показано, що сайт CRE (елемент відповіді на цАМФ) промотору *GSTP1* може відігравати роль негативного регуляторного елемента. Вперше встановлено, що рецептор естрогенів β (ER β) регулює транскрипцію гена *GSTP1*, зв'язуючись через невстановлений білок із позитивним регуляторним елементом ARE (елемент відповіді на антиоксиданти) та через білки Fos або Jun/Fos з негативним регуляторним елементом CRE. У контексті сучасних уявлень про будову та функціонування енхансосоми запропоновано модель, що пояснює одночасну взаємодію одного транскрипційного фактора як з негативним, так і з позитивним регуляторним елементом промотору.

Практичне значення отриманих результатів. Одержані результати свідчать, що транскрипція гена глутатіон S-трансферази P1 клітинспецифічно регулюється ER β та транскрипційним фактором NF- κ B, що дає підстави розглядати ці транскрипційні фактори як потенційні мішені для розробки хемопревентивних препаратів. Розроблений у роботі метод ПЛР-ампліфікації промотору, що містить великі ділянки, сильно збагачені на АТ та GC, може бути використаний для ампліфікації інших фрагментів ДНК, які мають подібну первинну структуру.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу виконано під керівництвом д.б.н., с.н.с. М. Ю. Оболенської. Здобувачем особисто виконано культивування клітин, виділення ДНК та РНК, визначення рівня мРНК *GSTP1* та відповідного білка, визначення метилування ДНК, підбір праймерів та ампліфікація фрагментів промотору гена *GSTP1*, клонування фрагментів промотору та створення репортерних конструкцій, трансфекція клітин та визначення люциферазної активності, виділення ядерних екстрактів та дослідження електрофоретичної рухливості ДНК-білкових комплексів. Особисто проаналізовано літературні дані та

оброблено первинні результати. Досліди з обробки клітин 5-аза-цитидином та культивування клітин MCF7, H358, K562, Hct116 частково виконано співробітницею відділу радіобіології Центру онкології інституту імені М. Склодовської-Кюрі у Глівіцах (Польща) А. Кведук. Обговорення отриманих результатів проводили спільно з науковим керівником та зі співробітниками дослідницької групи. Збір зразків плаценти для дослідження було виконано співробітниками пологового відділення лікарні №3 м. Києва. Автор щиро вдячний проф. Й. Жешовськи-Вольни за всебічну підтримку у виконанні роботи відділу експериментальної та клінічної радіобіології Центру онкології інституту імені М. Склодовської-Кюрі у Глівіцах, др. Войташу Пігловському за надання зразків РНК з клітин A549, HepG2, H296, Beas2B і к.б.н. Панасюк Г. Г. за надання антитіл для перевірки якості ядерних екстрактів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідалися на Міжнародній конференції молодих вчених, аспірантів та студентів, присвяченій 30-тиріччю відкриття структури ДНК та 30-тиріччю Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 2003), Конференціях «Gliwice Scientific Meeting» (Глівіци, Польща) у 2006 та 2008 рр., Конференції молодих вчених, аспірантів та студентів з молекулярної біології, присвяченій 120-му ювілею М. І. Вавилова (Київ, 2007), Конференції «41st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation» (Упсала, Швеція), 2007 р., Конференції молодих вчених до 35-ї річниці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, 2008), Конференції «Congress of Biochemistry and Cell Biology 43rd Meeting of the Polish Biochemical Society and 10th Conference of Polish Cell Biology Society» (Ольштин, Польща), 2008 р., Третій конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвяченій 200-літтю від дня народження Чарльза Роберта Дарвіна та 150-літтю праці «Походження видів...» (Київ, 2009), Конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2009» (Київ, 2009), VII Парнасівській конференції з біохімії та молекулярної біології (Ялта, 2009).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у провідних фахових виданнях, з яких чотири експериментальні та одна оглядова, і тези 10-ти доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, літературного огляду, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження, обговорення результатів дослідження, висновків та переліку літературних джерел. Текст дисертації проілюстрований 1 таблицею і 39 рисунками. Перелік використаних літературних джерел складається зі 130 найменувань. Дисертаційна робота викладена на 125 сторінках машинописного тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження. У роботі були використані клітини ліній хоріокарциноми BeWo, молочної залози Hbl-100, меланоми Me45 та тканина плаценти. Клітини культивували в умовах, рекомендованих Американською колекцією культур клітин. Зразки зрілої плаценти було відібрано одразу після пологів або кесаревого розтину.

Для визначення вмісту мРНК *GSTP1* тотальну РНК виділяли за допомогою реагенту TRIzol[®] (Invitrogen Inc., США), синтез кДНК проводили за допомогою набору реактивів iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США). Отриману кДНК використовували як матрицю для ПЛР у реальному часі з барвником SYBR Green I. Вміст білка *GSTP1* визначали за допомогою напівкількісного імуноблотингу та нормалізували до загальної кількості перенесеного на мембрану білка, забарвленого амідом чорним.

Фрагменти промотору гена *GSTP1* для створення репортерних конструкцій отримували за допомогою ПЛР та клонували у векторі pCR2.1-TOPO. Після визначення первинної послідовності отриманих конструкцій з них вирізали вставки, що мали вірну орієнтацію, та переклоновували у вектор pGL3-basic таким чином, щоб під контролем вставки знаходився репортерний ген люциферази світлячка. Отриманими конструкціями трансфекували клітини Hbl-100, Me45 та BeWo за допомогою реагенту Lipofectamine[™] LTX (Invitrogen Inc., США). Як внутрішній позитивний контроль використовували вектор pRL-TK, яким котрансфекували досліджувані клітини. Люциферазну активність визначали в лізатах клітин через 20 годин після трансфекції за допомогою набору реактивів Dual Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, США).

Для визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють із сайтами зв'язування у промоторі *GSTP1*, у дволанцюгові олігонуклеотиди, що відповідали сайтам промотору *GSTP1*, вводили кінцеву мітку шляхом фосфорилювання полінуклеотидкіназою (Roche, Швейцарія) за участі [γ -³²P]-дАТФ. Ядерні екстракти з клітин та тканини плаценти отримували за модифікованим методом Дігнама (Dignam et al., 1983). Реакцію зв'язування ДНК з ядерними білками проводили у суміші, що містила 1 пмоль міченої ДНК, 5 мкг білка ядерного екстракту та 500 нг фрагментованої геномної ДНК *E. coli*. За умови використання конкурентних олігонуклеотидів або антитіл реакційну суміш преінкубували з надлишком неміченого олігонуклеотиду або з 2 мкг антитіл. Комплекси розділяли у 6 % поліакриламідному гелі та візуалізували радіоавтографічно. Консенсусні олігонуклеотиди та антитіла були від Santa Cruz Inc., США.

Метилування ДНК визначали методом ПЛР після модифікації ДНК метабісульфітом натрію. ДНК виділяли з культури клітин і тканини плаценти та обробляли метабісульфітом за допомогою набору реактивів CpGemone[™] Fast DNA Modification Kit (Millipore, США). Для ПЛР-детекції було використано праймери й умови реакції, описані Гонзалго та співавторами (Gonzalvo et al., 2004). Обробку 5-аза-цитидином проводили як описано Джевері та співавторами (Jhavery et al. 1998).

Результати досліджень та обговорення

Клітинспецифічні механізми регуляції транскрипції гена глутатіон S-трансферази P1 вивчали в двох аспектах, а саме: досліджували власне клітинну специфічність регуляції в трьох малігнізованих клітинних культурах, які відрізняються за рівнем експресії гена *GSTP1*, а також досліджували зміну регуляції транскрипції гена *GSTP1* при злоякісній трансформації клітин трофобласту плаценти людини в клітини хоріокарциноми.

Визначення показників експресії гена *GSTP1* у клітинах різних типів. Для того, щоб обрати клітини для дослідження клітинспецифічної регуляції транскрипції гена *GSTP1*, було проведено скринінг ряду клітинних ліній на вміст мРНК *GSTP1* (рис. 1).

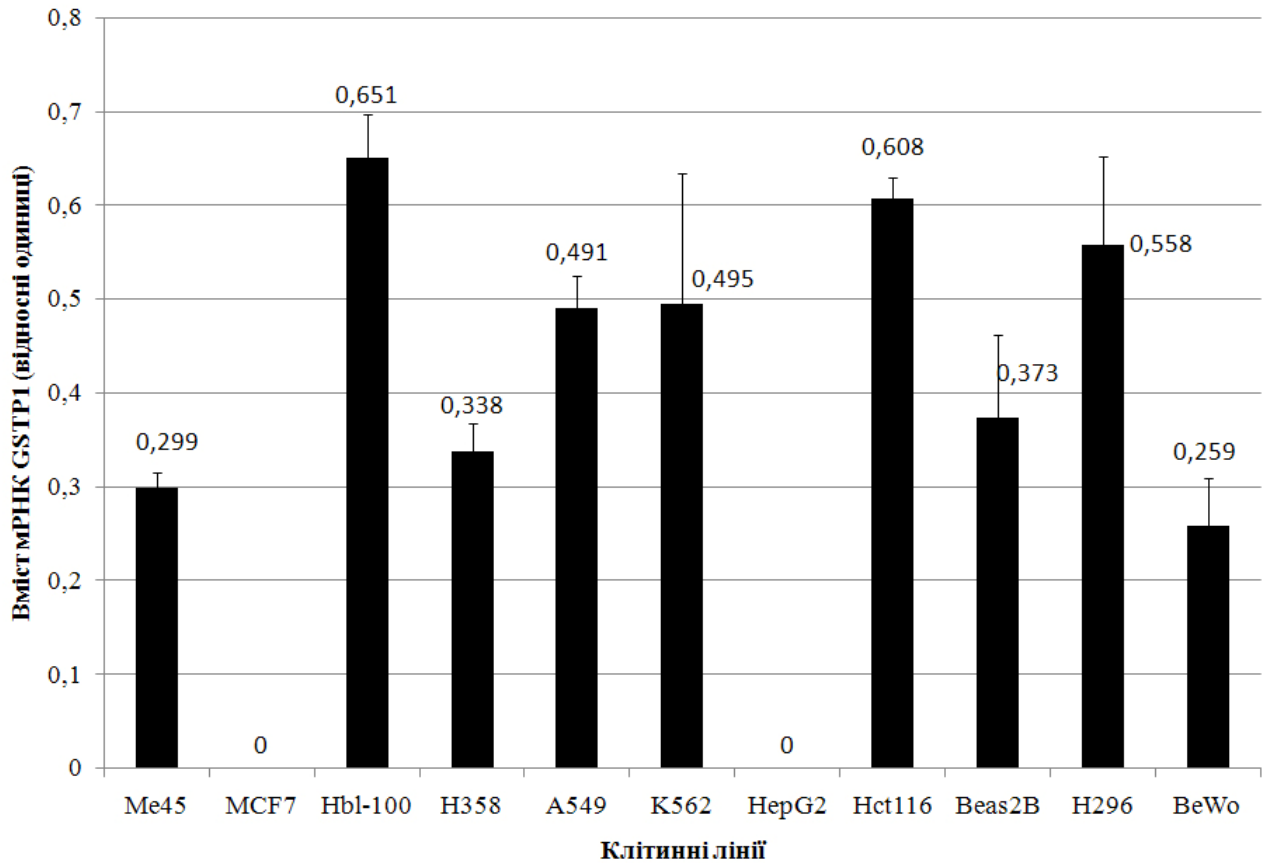


Рис. 1. Діаграма вмісту мРНК *GSTP1* в різних типах клітин за даними кЗТ-ПЛР

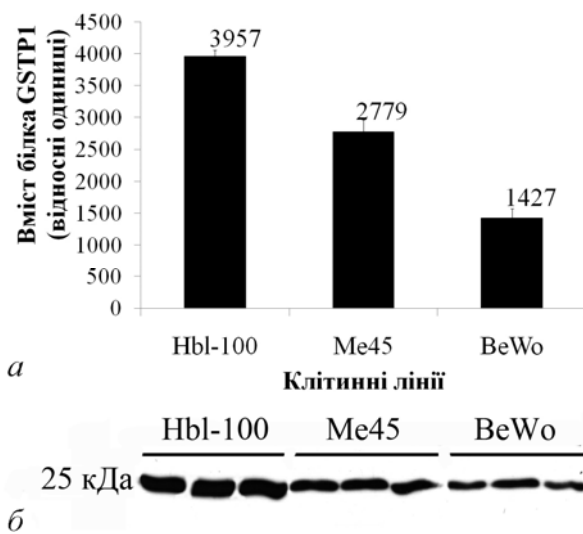


Рис. 2. Діаграма вмісту білка *GSTP1* у клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo (а) та репрезентативна імуноблотограма (б) лізатів даних клітин

Дані кількісної ЗТ-ПЛР нормалізували до рівня мРНК RPL-41. На основі отриманих результатів для подальшого дослідження було обрано клітинні лінії молочної залози Hbl-100, які мали найвищий вміст даної мРНК, меланоми Me45 і хоріокарциноми BeWo, які містили практично вдвічі менше мРНК *GSTP1*.

Результати імуноблотингу показали, що вміст білка *GSTP1* співвідноситься з вмістом відповідної мРНК (рис. 2). Відповідно, клітини молочної залози Hbl-100, меланоми Me45 та хоріокарциноми BeWo можуть бути використані для дослідження молекулярних механізмів клітинспецифічної регуляції транскрипції гена *GSTP1* людини.

ПЛР-ампліфікація промотору гена *GSTP1* людини. Для проведення функціонального аналізу сайтів зв'язування транскрипційних факторів промотору *GSTP1* необхідно було клонувати даний промотор та його вкорочені фрагменти. Промотор гена *GSTP1* є складною матрицею для ПЛР-ампліфікації, оскільки у ділянці від -400 до +35 він одночасно містить понад 72 % GC-пар, що важко денатурують, та повторювану послідовність (ATAAA)₁₉₋₂₄, яка, навпаки, має дуже низьку температуру денатурації. Промотор гена *GSTP1* не вдавалось ампліфікувати за стандартних умов реакції. Також не допомагало ні додавання класичних енхансерів ПЛР – формаміду або ДМСО, ні застосування полімерази Pfu (рис. 3).

Для подолання згаданих вище проблем було застосовано два підходи – повільна елонгація при температурі 60 °C та додавання Q-Solution – ПЛР-енхансеру від фірми Qiagen. При повільній елонгації полімераза рухається по матриці повільніше і зв'язана з нею міцніше, що дозволяє їй розплитати короткі дволанцюгові структури, також це перешкоджає дисоціації ферменту від АТ-багатих ділянок і «проскакуванню» шпилькових структур. Q-Solution вирівнює температури плавлення фрагментів ДНК з нерівномірним розподілом GC і АТ та зі вторинними структурами. Застосування даного підходу дозволило отримати необхідний ПЛР-продукт (рис. 3), який потім було клоновано, секвеновано та ідентифіковано як промотор *GSTP1* людини.

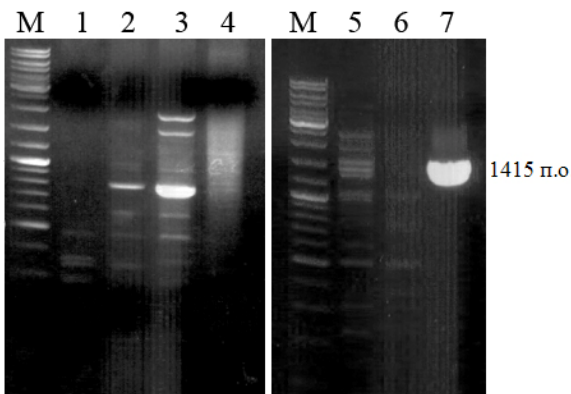


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації повного промотору гена *GSTP1* за різних умов ПЛР: 1 – Таq-полімераза, формамід; 2 – Таq-полімераза, ДМСО; 3 – Таq-полімераза, без енхансерів ПЛР; 4 – Pfu-полімераза; 5 – Таq-полімераза, повільна елонгація; 6 – Pfu-полімераза, повільна елонгація; 7 – Таq-полімераза, повільна елонгація, Q-Solution; М – маркер молекулярних мас GeneRuller Ladder Mix

Функціональний аналіз елементів промотору гена *GSTP1* у клітинах Нb1-100, Me45 та BeWo. За регуляцію транскрипції гена *GSTP1* відповідає 5'-регуляторна ділянка, в якій виявлено 9 сайтів впізнавання для транскрипційних факторів: ТАТА-бокс, два G/C-бокси, елемент відповіді на антиоксиданти (ARE), два потенційні сайти зв'язування NF-κB, елемент відповіді на цАМФ (CRE), віддалений елемент GATA та ARE-подібний сайт першого екзону (рис. 4).

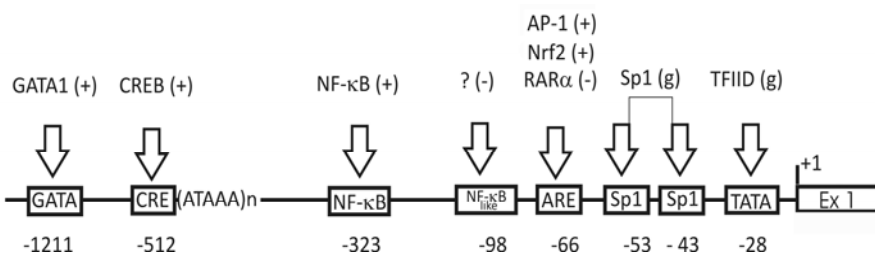


Рис.4. Схема будови промотору гена *GSTP1* людини та транскрипційні фактори, що здатні з ним взаємодіяти: (+) – позитивний регуляторний ефект; (-) – негативний ефект; (g) – загальний фактор

Результати люциферазного тесту (рис. 5) свідчать про те, що в усіх проаналізованих трьох типах клітин промоторна активність визначається дією сайтів ARE, NF-κB-подібного, NF-κB та CRE, оскільки делеція цих сайтів призводила до змін експресії репортерного гена люциферази. Характер цих змін вказує на те, що у клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo сайти ARE та NF-κB є позитивними регуляторними елементами, а сайти CRE та NF-κB-подібний - негативними.

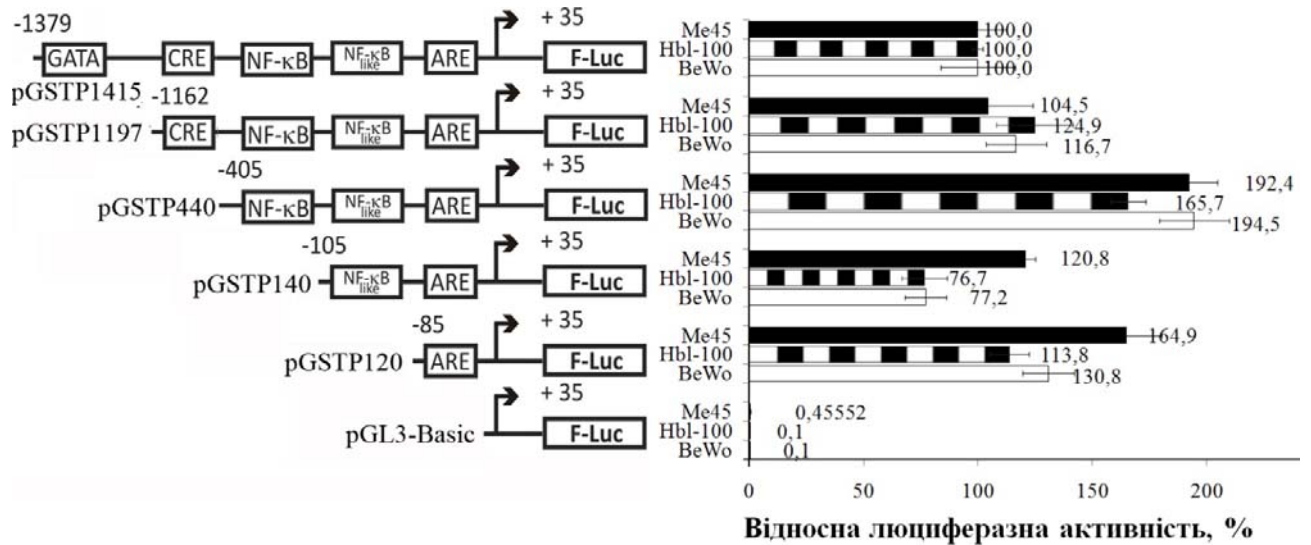


Рис. 5. Діаграма експресії репортерного гена люциферази світлячка у клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo, трансфорованих репортерними конструкціями

Ідентифікація транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором *GSTP1*. Наступним етапом роботи було дослідження взаємодії транскрипційних факторів з сайтами промотору *GSTP1* в клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo. Для цього було досліджено електрофоретичну рухливість ДНК-білкових комплексів, що утворюються при інкубації препаратів ядерних білків даних клітин з міченими олігонуклеотидами, послідовність яких відповідає послідовності сайтів ARE, NF-κB-подібного, NF-κB, CRE та GATA промотору *GSTP1* (рис. 6).

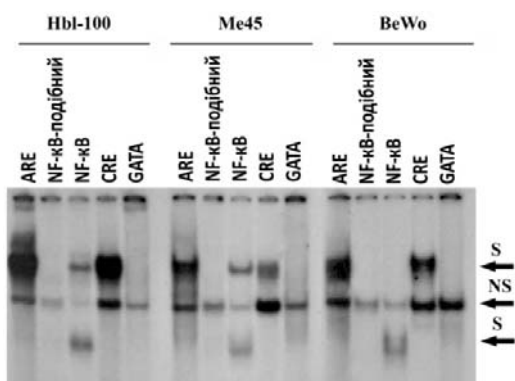


Рис. 6. Електрофореграма комплексів, які утворюються між олігонуклеотидами, що відповідають сайтам зв'язування транскрипційних факторів промотору *GSTP1* та ядерними білками клітин Hbl-100, Me45 та BeWo: S – специфічні комплекси; NS – неспецифічні комплекси; ARE, NF-κB, NF-κB-подібний, CRE, GATA – сайти промотору *GSTP1*

Специфічність взаємодії білків з елементами промотору було перевірено шляхом інкубації з надлишком неміченого олігонуклеотиду (Рис. 7 – 9). Було

встановлено, що в усіх типах клітин сайти ARE, NF- κ B та CRE специфічно взаємодіють з ядерними білками. При цьому з сайтом NF- κ B можливе утворення двох різних комплексів у клітинах Hbl-100 та Me45 і тільки одного комплексу у клітинах BeWo. З сайтами GATA та NF- κ B-подібним, ядерні білки специфічно не зв'язуються.

Відомо, що з ARE-послідовностями різних генів залежно від типу клітин можуть взаємодіяти транскрипційні фактори AP-1 (Moffat et al., 1994), Nrf2 (Dhakshinamoorthy et al., 2000), ER β (Zhao et al., 2008) та RAR α (Xia et al., 1996). Тому нами було проведено скринінг ARE-білкових комплексів, що утворюються в досліджуваних клітинах, на наявність цих транскрипційних факторів. Результати проведеного дослідження взаємодії ARE-білкового комплексу з антитілами (рис. 7) переконливо засвідчують, що в клітинах Hbl-100, Me45 і BeWo з сайтом ARE взаємодіє ER β .

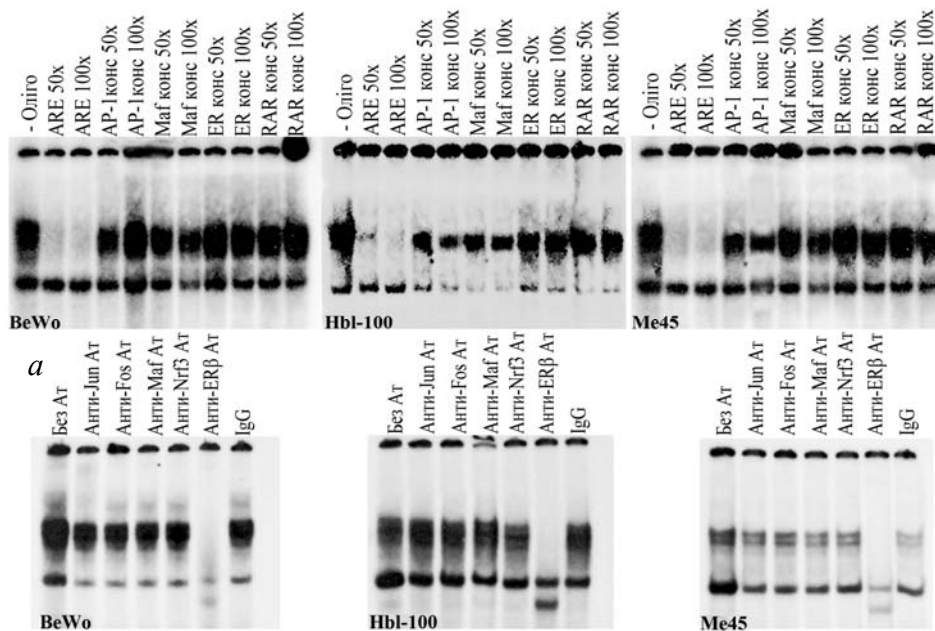


Рис. 7. Електрофореграма ARE-білкових комплексів у присутності конкурентних олігонуклеотидів (а) та антитіл (б): конс – консенсусний олігонуклеотид; -Оліго – дослід без конкурентного олігонуклеотиду; НС оліго – неспецифічний олігонуклеотид; Ат – антитіло

б

Преінкубація реакційної суміші з антитілами до ER β завадила формуванню вихідного комплексу і призвела до утворення комплексу з більшою електрофоретичною рухливістю (тобто меншою молекулярною масою). Дані результати чітко вказують на те, що в усіх досліджуваних типах клітин ER β взаємодіє з сайтом ARE, але не вступає в прямий контакт з ДНК, а зв'язується через інший білок (назвемо його «білок Х»). Антитіла до ER β перешкоджають приєднанню даного транскрипційного фактора до його партнера, який залишається в даному випадку самостійно зв'язаний з ДНК, формуючи комплекс з меншою електрофоретичною рухливістю, ніж потрібний комплекс ДНК-білок Х-ER β . Він зв'язується з сайтом не своїм ДНК-зв'язувальним доменом, а через поки не ідентифікований білок. Якщо припустити, що невідомий білок є однаковим у клітинах усіх трьох типів, то скоріше за все сайт ARE та транскрипційні фактори, що з ним взаємодіють, не можна розглядати як чинники, що визначають клітинспецифічний рівень транскрипції гена *GSTP1* в клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo.

Дослідження складу NF-κB-комплексу (рис. 8) показало, що в клітинах BeWo з NF-κB-сайтом промотору *GSTP1* зв'язується транскрипційний фактор NF-κB у вигляді гомодимеру p50/p50, а в клітинах Hbl-100 та Me45 – у вигляді гетеродимеру p50/p65.

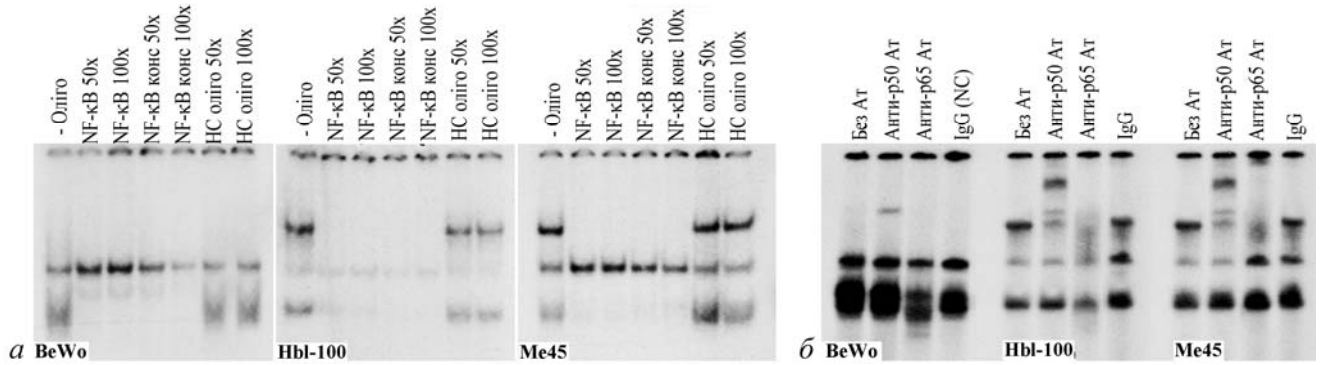


Рис. 8. Електрофореграма комплексів сайту NF-κB промотору *GSTP1* у присутності конкурентних олігонуклеотидів (а) та антитіл (б): конс – консенсусний олігонуклеотид; -Оліго – дослід без конкурентного олігонуклеотиду; HC оліго – неспецифічний олігонуклеотид; Ат – антитіло

NF-κB – це димерний транскрипційний фактор, до складу якого можуть в певних комбінаціях входити білки p65/RelA, c-Rel, RelB, NF-κB1/p50 та NF-κB2/p52 (Gilmore et al., 1999). Серед цих білків RelA, c-Rel та RelB мають потужний С-кінцевий трансактиваторний домен і є сильними активаторами транскрипції (Schmid et al., 1994). У даному дослідженні активну форму NF-κB (p50/p65) в комплексі з відповідним сайтом промотору *GSTP1* було виявлено тільки в клітинах Hbl-100 та Me45, в той час, як в клітинах BeWo з промотором зв'язувався p50/p50-гомомер, що не має трансактивуючої здатності. З огляду на це, ми вважаємо, що пригнічення транскрипції гена *GSTP1* в клітинах BeWo пов'язане з відсутністю на промоторі активної форми NF-κB.

Також нами було показано, що в клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo з сайтом CRE взаємодіє ERβ, який зв'язується з ДНК через білок Fos (рис. 9).

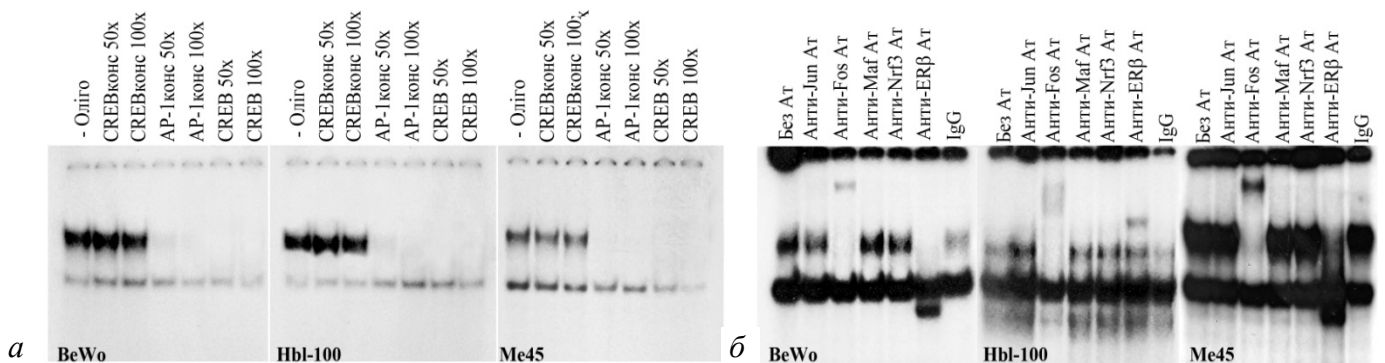


Рис. 9. Електрофореграма комплексів сайту CRE промотору *GSTP1* у присутності конкурентних олігонуклеотидів (а) та антитіл (б): конс – консенсусний олігонуклеотид; -Оліго – дослід без конкурентного олігонуклеотиду; HC оліго – неспецифічний олігонуклеотид; Ат – антитіло

При цьому структура CRE-білкового комплексу відрізняється в клітинах Hbl-100 від тієї, що має місце в клітинах Me45 та BeWo, про що свідчить різна зміна електрофоретичної рухливості комплексів у даних клітинах після застосування антитіл. Оскільки це єдина відмінність у спектрі транскрипційних факторів, які взаємодіють з промотором *GSTP1* в клітинах Hbl-100, від такого спектра у клітинах Me45, слід вважати, що саме вона відповідає за вищий рівень експресії даного гена у клітинах Hbl-100.

Привертає увагу те, що ER β був виявлений у комплексі як з позитивним, так і з негативним регуляторним елементом промотору *GSTP1*. При цьому з обома сайтами, які не містять сайт зв'язування ER, даний транскрипційний фактор взаємодіє через інший білок. Даний феномен пояснюється нещодавно відкритими механізмами естрогенової регуляції генів, що не містять ERE (estrogen response element). Рецептори естрогенів здатні регулювати транскрипцію генів, зв'язуючись у вигляді димерів (ER α /ER α , ER β /ER β та ER α /ER β) з канонічним консенсусним сайтом (Kumar et al., 1988) або з неканонічним напівпаліндромним сайтом (Mueler et al., 2000), а також у вигляді гетеродимерів ER/Maf, ER/Jun, ER/Fos з сайтами ARE (Kushner et al., 2000) та CRE (Aronica et al., 1994). Останній спосіб зв'язування, названий перехресною взаємодією транскрипційних факторів, розширює спектр генів, що є мішенями естрогенів. У випадку гена *GSTP1* людини має місце два типи перехресних взаємодій – неканонічне зв'язування Fos/ER β -комплексу з сайтом CRE та взаємодія ER β в комплексі з іншим білком з сайтом ARE. Перший з яких є негативним, а другий – позитивним регуляторним елементом. Раніше було показано, що експресія гена *GSTP1* у клітинах раку молочної залози активується естрадіолом E2 (Montano et al., 2004), хоча в промоторі гена відсутні потенційні ERE. Одержані нами дані дозволяють тепер пояснити це явище.

Враховуючи, що ні цис-діючі регуляторні елементи, ні транскрипційні фактори не діють на промоторі самі по собі, а взаємодіють один з одним та з низкою коактиваторів/корепресорів, ми вважаємо, що дане явище варто пояснити у

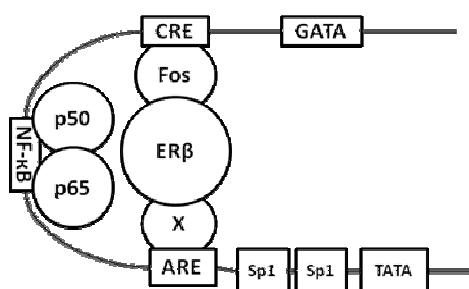


Рис. 10. Гіпотетична модель будови енхансосоми, що утворюється на промоторі гена *GSTP1*

контексті формування енхансосоми. Відомо, що зв'язування NF-кВ призводить до згинання ДНК в місці його приєднання (Schmid et al., 1994). У випадку промотору *GSTP1* таке згинання повинно призводити до просторового зближення сайтів CRE та ARE, які є приблизно рівновіддаленими від NF-кВ-сайту. При цьому ми припускаємо, що білок Fos у сайті CRE та невстановлений білок у сайті ARE взаємодіють з однією молекулою ER β , яка є ніби ядром енхансосоми (рис. 10). Оскільки ER β має багато потенційних сайтів для білок-білкових взаємодій (Zhao et al., 2008), одночасна взаємодія його з декількома транскрипційними факторами виглядає досить імовірною. При цьому, ймовірно, склад білкового комплексу в сайті CRE визначає ступінь інгібування трансактивууючої дії комплексу ER β -білок X у сайті ARE, який, згідно з даними люциферазного тесту, є позитивним регулятором.

Таким чином, в результаті виконання роботи було встановлено, що клітинспецифічна регуляція транскрипції гена *GSTP1* у клітинах Hbl-100, Me45 і BeWo забезпечується транскрипційними факторами, які взаємодіють з сайтами CRE та NF-κB. Також вперше було показано, що ERβ бере участь у регуляції транскрипції гена *GSTP1* людини, і при цьому відбувається його зв'язування з сайтами CRE та ARE як гетеродимера з іншими білками. На підставі отриманих даних запропоновано модель енхансоми, збирання якої на промоторі *GSTP1* забезпечує регуляцію транскрипції даного гена.

Порівняльний аналіз механізмів регуляції транскрипції *GSTP1* у плаценті та клітинах хоріокарциноми. У другій частині роботи вперше було досліджено регуляцію транскрипції гена *GSTP1* у нетрансформованих клітинах та зміну регуляції за умов злоякісної трансформації цих клітин. Для дослідження обрали плаценту людини та клітини хоріокарциноми, яка походить із клітин трофобласта. Було встановлено, що у клітинах хоріокарциноми відбувається зниження експресії

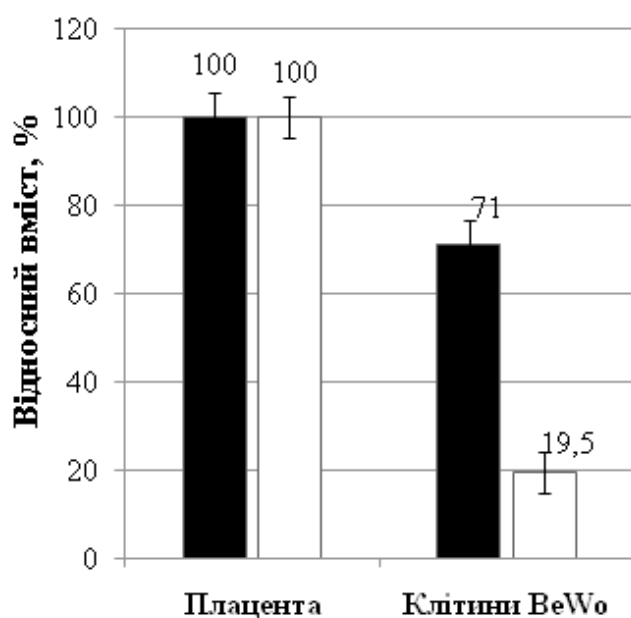


Рис. 11. Відносний вміст мРНК (білі стовпчики) та білка (чорні стовпчики) у плаценті та клітинах BeWo

даного гена на рівні мРНК і білка (рис. 11). Щоб з'ясувати молекулярні механізми, які лежать в основі цих змін, було порівняно спектри транскрипційних факторів, що діють на промоторі гена *GSTP1* у тканині плаценти та у клітинах хоріокарциноми.

Дослідження ДНК-білкових комплексів, що утворюються на сайтах ARE та NF-κB промотору *GSTP1* (рис. 12) у плаценті, показало, що їх склад є ідентичним складу комплексів у клітинах хоріокарциноми: з ARE-сайтом у плаценті взаємодіє комплекс ERβ із невстановленим білком, а з NF-κB-сайтом – p50/p50-гомодимер транскрипційного фактору NF-κB. Натомість, склад комплексу з сайтом CRE у плаценті є іншим, ніж у клітинах хоріокарциноми

BeWo. За допомогою специфічних до транскрипційних факторів антитіл встановлено, що у плаценті людини з даним сайтом взаємодіють Fos, ERβ та Jun. Останній не було до цього виявлено у жодному з CRE-білкових комплексів у проаналізованих клітинах. Транскрипційні фактори Jun та Fos зв'язуються з сайтами ARE та CRE багатьох генів, діючи, як правило, у гетеродимері, хоча відомо й існування гомодимерів Jun/Jun (Allegreto et al., 1990). Гетеродимер (відомий також як AP-1) є потужним активатором транскрипції. Натомість, Fos у «чистому» вигляді є скоріше репресором (Abate et al., 1991). Тому, хоча провести функціональний аналіз сайту CRE у тканині плаценти з використанням репортерних конструкцій технічно неможливо, наведені дані щодо молекулярних механізмів дій білків Fos та Jun дають підстави вважати, що саме наявність останнього в складі CRE-білкового

комплексу у тканині плаценти відповідає за активнішу транскрипцію гена *GSTP1* у плаценті порівняно з клітинами BeWo. Відповідно, зниження експресії даного гена при утворенні хоріокарциноми слід пов'язувати зі зникненням транскрипційного фактора Jun.

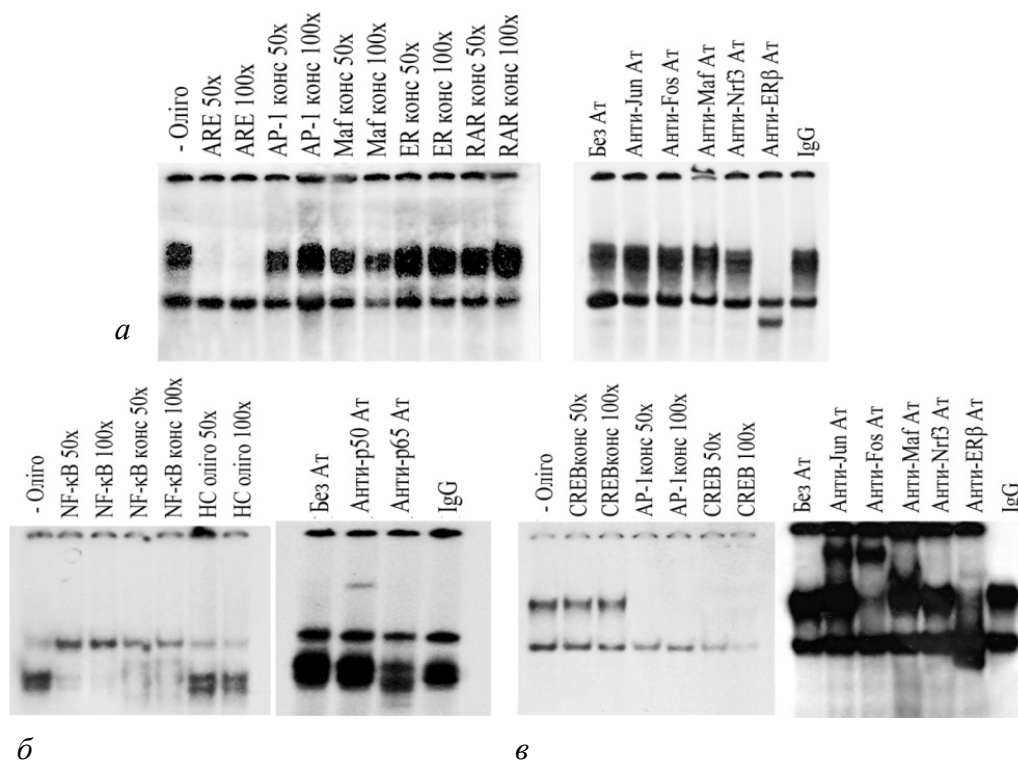


Рис. 12. Електрофореграми комплексів олігонуклеотидів, що містять сайти ARE (а), NF-κB (б) та CRE (в) промотору *GSTP1* з ядерними білками плаценти: конс – кон-сенсусний олігонуклеотид; -Оліго – дослід без конкурентного олігонуклеотиду; HC оліго – неспецифічний олігонуклеотид; Ат – антитіло

Дослідження метилування промотору гена *GSTP1*. Завершальним етапом даної роботи було дослідження метилування промотору *GSTP1* у клітинах з різним рівнем експресії гена. Відомо, що в багатьох пухлинах ген *GSTP1* є повністю виключеним внаслідок метилування промотору. Механізми виникнення такого метилування досі дискутуються, але в усіх сучасних гіпотезах передбачається, що метилуванню повинна передувати репресія гена завдяки дії транскрипційних факторів (Millar et al. 2000). В даній роботі нами перевірено це припущення. Для визначення метилування ДНК використано метод ПЛР з модифікованою бісульфітом ДНК, який ґрунтується на тому, що під час послідовної обробки ДНК метабісульфітом натрію та лугом відбувається перетворення неметильованих цитозинів на урацили, у той час як метильовані цитозини в реакцію не вступають, будучи захищеними метильними групами. Проведення ПЛР з праймерами, підібраними до незміненої послідовності ДНК або до ДНК, в якій цитозини замінені на урацили, дозволяє визначити, чи є метильованою та ділянка, з якою вони взаємодіють. У реакції застосовували одну пару праймерів до неметильованої ДНК (U) і дві пари праймерів до метильованої (M1 та M2), що дозволило перевірити наявність метилування у трьох CpG-збагачених сайтах (рис. 13). Як видно на електрофореграмі (рис. 13), застосування праймерів до неметильованої ДНК дозволило отримати продукти ампліфікації очікуваної довжини зі зразками модифікованої ДНК з усіх типів клітин. Це свідчить про наявність у клітинах Hbl-100, Me45 та BeWo неметильованого кор-промотору гена *GSTP1*.

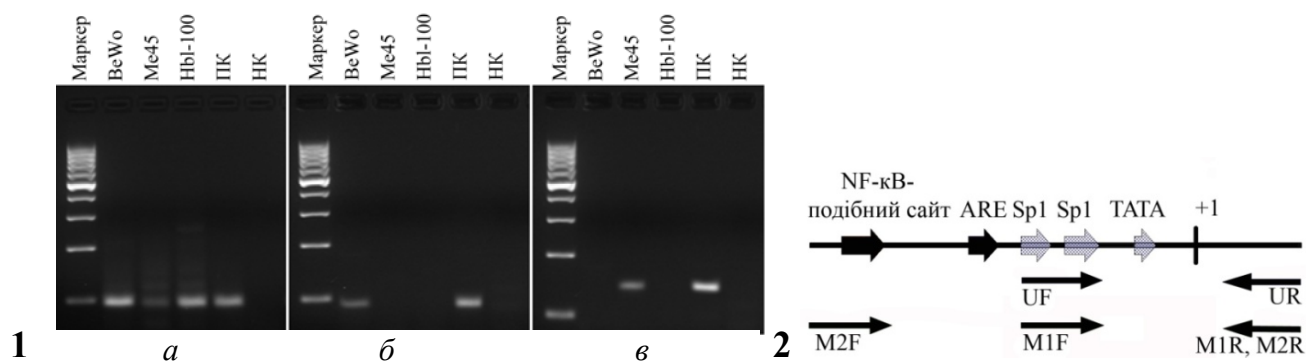


Рис. 13. Електрофореграма продуктів MSP (1), та схема розташування праймерів на промоторі (2): *a* – продукти ампліфікації з праймерами до неметильованої ДНК; *б* – продукти ампліфікації з праймерами до метильованого кор-промотору; *в* – продукти ампліфікації з праймерами до метильованого регуляторного промотору; Маркер – маркер; ПК – позитивний контроль; НК – негативний контроль; UF, UR – праймери до неметильованого промотору; M1F, M1R – праймери до етильованого кор-промотору; M2F, M2R – праймери до метильованого регуляторного промотору

У реакції ПЛР з праймерами до метильованого кор-промотору *GSTP1* було отримано продукт ампліфікації довжиною 91 п.о. тільки з ДНК, виділеної з клітин хоріокарциноми BeWo. Наявність в одному типі клітин як метильованого, так і неметильованого промотору *GSTP1* свідчить про те, що в даних клітинах (які є тетраплоїдними) метилування відбувається тільки в деяких алелях, в той час як інші алелі залишаються неметильованими. В результаті ампліфікації з праймерами до метильованого регуляторного промотору гена продукт утворювався тільки при використанні як матриці модифікованої ДНК із клітин Me45. Це свідчить про наявність у даних клітинах метильованих CpG-динуклеотидів у регуляторному промоторі, в той час як кор-промотор залишається неметильованим. Таким чином, дослідження метилування показало, що в клітинах Hbl-100 промотор гена *GSTP1* є повністю деметильованим, в той час як в клітинах BeWo та Me45 відбувається його часткове метилування.

У нормальній тканині плаценти (рис. 14) так само не було виявлено метилування промотору *GSTP1*, в той час як у клітинах хоріокарциноми пригнічення транскрипції супроводжується частковим метилуванням в одному або декількох алелях гена (рис. 13).

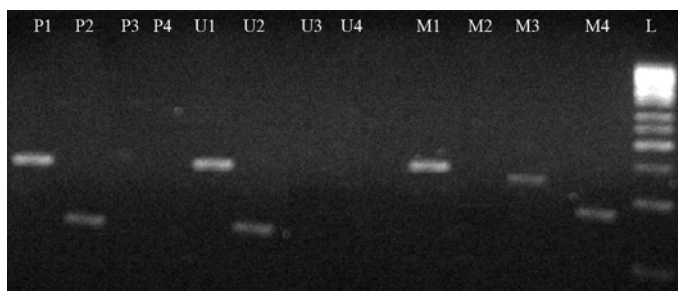


Рис. 14. Електрофореграма продуктів ампліфікації модифікованої бісульфітом плацентарної ДНК з різними праймерами: 1 - праймери до гена *MYOD1*; 2 - праймери U; 3 - праймери M1; 4 - праймери M2; P - плацентарна ДНК; U - контрольна неметильована ДНК; M - контрольна метильована ДНК

Для того, щоб встановити функціональну роль метилування у репресії транскрипції гена *GSTP1* клітини було оброблено деметилуючим агентом 5-аза-

дезоксцитидином. Вміст мРНК *GSTP1* у клітинах Me45 після обробки не збільшувався (рис. 15), що вказує на те, що метилування промотору у клітинах Me45 не є причиною репресії гена *GSTP1*.

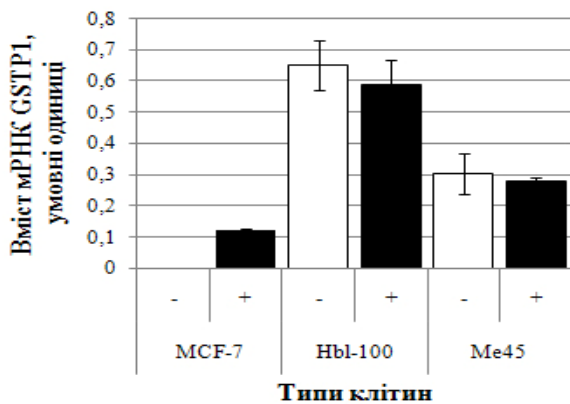


Рис. 15. Вміст мРНК *GSTP1* у клітинах Me45, MCF7 та Hbl-100, оброблених (+) та необроблених (-) 5-аза-цитидином. Клітини MCF7, що мають повністю метильований промотор гена *GSTP1* використовували як позитивний контроль ефективності де метилування, клітини Hbl-100, які мають неметильований промотор гена *GSTP1* використовували як негативний контроль

Таким чином, слід вважати, що під час канцерогенезу відбувається зумовлена транскрипційними факторами репресія транскрипції гена *GSTP1* та виникає метилуванням. Проте, в досліджених клітинах (Me45) метилування не є причиною репресії гена.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено роль цис- та транс- діючих факторів у забезпеченні клітинспецифічного рівня транскрипційної активності гена глутатіон S-трансферази P1 людини у клітинах молочної залози Hbl-100, меланоми Me45, хоріокарциноми BeWo та у тканині плаценти.

1. У клітинах молочної залози Hbl-100, меланоми Me45 та хоріокарциноми BeWo експресія гена *GSTP1* клітинспецифічно регулюється на транскрипційному рівні транс-діючими факторами NF-κB та рецептором естрогенів β, що зв'язуються з позитивними цис-діючими елементами NF-κB та ARE і з негативним цис-діючим елементом CRE.

2. Клітинна специфічність регуляції транскрипції гена *GSTP1* людини частково реалізується завдяки зміні субдинічного складу CRE-білкового комплексу та способу взаємодії білків у ньому.

3. Транскрипційний фактор Jun та субдиніця p65 транскрипційного фактору NF-κB клітинспецифічно забезпечують підвищення рівня експресії гена *GSTP1*.

4. Малігнізація трофобласту супроводжується зниженням рівня експресії гена *GSTP1* внаслідок втрати Jun з CRE-білкового комплексу.

5. Зниження транскрипційної активності гена *GSTP1* за рахунок дії транскрипційних факторів асоціюється з метилуванням його промотору.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Слончак А. М. Застосування полімеразної ланцюгової реакції для отримання промоторного фрагменту гена *GSTP1* /А. Слончак, М. Оболенська // Наукові

- записки НаУКМА. – 2003. – №3. – С.382–385. *(Особистий внесок здобувача: розробка методу ампліфікації промотору GSTP1, дизайн праймерів, виділення ДНК та проведення ПЛР).*
2. Деякі аспекти регуляції транскрипції гена глутатіон S-трансферази P1-1 у плаценті людини / А.М. Слончак, О.П. Марценюк, Й.Жешовська-Вольни, П. Відлак, М.Ю. Оболенська // Український біохімічний журнал. – 2007. – Т. 79, № 4. – С. 67–75. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, аналіз бази даних ДНК-мікромасивів, визначення транскрипційних факторів, визначення метилування).*
3. Crosstalk between transcription factors in regulation of the human glutathione S-transferase P1 gene expression in Me45 melanoma cells / А. М. Slonchak, А. Chwieduk, J. Rzeszowska-Wolny, М. Yu. Obolenskaya // Біополімери і клітина. – 2009. – Т. 25, № 3. – С. 210–217. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, створення репортерних конструкцій, культивування та трансфекція клітин меланоми, проведення люциферазного тесту, визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором).*
4. Transcriptional mechanisms responsible for the differential expression of the human GSTP1 gene in breast cells Hbl-100 and BeWo choriocarcinoma cells / А. М. Slonchak, А. Chwieduk, J. Rzeszowska-Wolny, М. Yu. Obolenskaya // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 4. – С. 205–213. *(Особистий внесок здобувача: культивування клітин, виділення ДНК та РНК, проведення ЗТ-ПЛР-РЧ та імуноблотингу, створення репортерних конструкцій, проведення люциферазного тесту, визначення транскрипційних факторів, визначення метилування).*
5. А. М. Слончак. Структура і функції глутатіон S-трансферази P1-1 / А. Слончак, М.Ю. Оболенська // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 5–13. *(Особистий внесок здобувача: аналіз літератури).*
6. Slonchak А. М. Regulation of the human glutathione S-transferase P1 gene transcription / А. М. Slonchak // Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics dedicated to the golden jubilee of the double helix of the DNA and 30 anniversary of the Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine: Abstract book (Kyiv, 25-27 September, 2003). – Kyiv. – 2003. – P.215. *(Особистий внесок здобувача: виділення ДНК, визначення показників експресії гена GSTP1, підбір праймерів та умов ПЛР для визначення поліморфізму).*
7. Methylation and site-specific interactions of nuclear proteins with GSTP1 promoter in human placenta / А.М. Slonchak, О.Р. Martsenyuk, J. Lanushevskaya, P. Widlak, J. Rzeszowska-Wolny, М. Yu. Obolenskaya // Gliwice Scientific Meeting 2006 - The 10th Anniversary of Gliwice Scientific Meeting: Abstract book (Gliwice, 17-18 November, 2006). – Gliwice. – 2006. – P.62. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором GSTP1 у плаценті, визначення метилування промотору).*
8. Investigation of glutathione S-transferase P1-1 transcription in human placenta, the unique non-cancer model / А.М. Slonchak, О.Р. Martsenyuk, P. Widlak, J. Rzeszowska-Wolny, М. Yu. Obolenskaya // 41st Annual meeting of the European society for clinical investigation: European Journal of Clinical Investigation (Upsala, 17-20 April, 2007). – Upsala. – 2007. – Vol. 37., Suppl. I. – P.50. *(Особистий внесок здобувача: люциферазний тест, визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором GSTP1 у плаценті).*
9. Identification of transcription factors acting on the glutathione S-transferase P1 promoter in human placenta / А.М. Slonchak, О.Р. Martsenyuk, P. Widlak, J.

Rzeszowska-Wolny, M.Yu. Obolenskaya // Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics dedicated to 120th anniversary of M. I. Vavilov: Abstract book (Kyiv, 20-22 September, 2007). – Kyiv. – 2008. – P.188. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором GSTP1 у плаценті, виділення ДНК та визначення метилування промотору).*

10. Детоксикаційна функція глутатіонтрансферази P-1 та роль поліморфізму метилентетрагідрофолатредуктази у зниженні її активності в плаценті людини // М. П. Кривошея, А.М. Марценюк, А.М. Слончак, М.Ю. Оболенська// VIII всеукраїнська наукова конференція студентів, аспірантів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих учених в Україні»: тези доп. (Київ, 25-26 вересня, 2008). – Київ. – 2008. – С.39. *(Особистий внесок здобувача: виділення ДНК, визначення показників експресії гена GSTP1).*

11. Interactions of human glutathione S-transferase P1 promoter with placental nuclear proteins /A.M. Slonchak, O.P. Martsenyuk, P. Widlak, J. Rzeszowska-Wolny, M.Yu. Obolenskaya // Conference of young scientists dedicated to the 35th anniversary of Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine: Biopolymers and cell (Kyiv, 28-29 May, 2008). – Kyiv. – 2008. – Vol.24, №5. – P.349. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, визначення транскрипційних факторів, що взаємодіють з промотором GSTP1 у плаценті).*

12. Expression of glutathione S-transferase P1-1 (*GSTP1*) in cultured human cells and changes induced by ionizing radiation / A. Chwieduk, A. M. Slonchak, D. Scieglinska, J. Rzeszowska-Wolny / Congress of biochemistry and cell biology 43rd meeting of Polish biochemical society and 10th conference of the Polish cell biology society: Abstract book (Olsztyn, 7-11 September, 2008). – Olsztyn. – 2008. – P.299. *(Особистий внесок здобувача: визначення вмісту мРНК GSTP1, створення репортерних конструкцій, культивування клітин та проведення люциферазного тесту).*

13. Functional analysis of the human *GSTP1* gene promoter region in cultured cancer cells / A. Chwieduk, A. M. Slonchak, J. Rzeszowska-Wolny // XIIth Gliwice Scientific meeting 2008: Abstract book (Gliwice, 21-22 November, 2008). – Gliwice. – 2008. – P.45. *(Особистий внесок здобувача: клонування промоторної ділянки гена GSTP1, створення репортерних конструкцій, культивування клітин меланоми, проведення люциферазного тесту).*

14. Cell-specific features of the human glutathione S-transferase P1 gene transcription regulation / A. M. Slonchak, A. Chwieduk, J. Rzeszowska-Wolny, M. Yu. Obolenskaya // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2009», 28-29 травня 2009 р.: тези доп. – Київ, 2009. – С.34. *(Особистий внесок здобувача: визначення показників експресії гена GSTP1, клонування промотору, створення репортерних конструкцій, культивування та трансфекція клітин, проведення люциферазного тесту, визначення транскрипційних факторів, визначення метилування).*

15. Cell-specific regulation of the human glutathione S-transferase P1 gene transcription / A. M. Slonchak, A. Chwieduk, J. Rzeszowska-Wolny, M.Yu Obolenskaya // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 4. – С. 126. – (Спецвип.: VII Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology). *(Особистий внесок здобувача: визначення показників експресії гена GSTP1, клонування промотору, створення репортерних конструкцій, культивування та трансфекція клітин, проведення люциферазного тесту, визначення транскрипційних факторів, визначення метилування).*

АНОТАЦІЯ

Слончак А.М. Клітиноспецифічні особливості регуляції транскрипції гена *GSTP1* людини. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2009.

Дисертацію присвячено дослідженню клітиноспецифічної ролі цис- та транс-діючих факторів у регуляції транскрипції гена *GSTP1* людини в трьох малігнізованих клітинних лініях (секрету молочної залози Hbl-100, меланоми Me45, хоріокарциноми BeWo), які відрізняються за експресією *GSTP1*, та дослідженню змін у регуляції транскрипції гена *GSTP1* при злоякісній трансформації клітин трофобласту. Встановлено, що у досліджених клітинах сайти ARE та NF-κB промотору *GSTP1* є позитивними регуляторними елементами, а сайти CRE та NF-κB-подібний - негативними, та ідентифіковано білки, що з ними взаємодіють. З'ясовано, що за клітиноспецифічну експресію гена *GSTP1* відповідають сайти CRE та NF-κB. Клітиноспецифічна дія першого визначається способом взаємодії ERβ з Fos та наявністю у комплексі Jun, а другого – субодичним складом фактора NF-κB (p50/p50 або p50/p65). Встановлено, що при злоякісній трансформації клітин трофобласту зниження експресії *GSTP1* є наслідком зникнення Jun із CRE-білкового комплексу. Показано, що промотор *GSTP1* у клітинах зі зниженою за рахунок транскрипційних факторів активністю метилується.

Ключові слова: *GSTP1*, промотор, рецептор естрогенів, NF-κB, метилування.

АННОТАЦИЯ

Слончак А. Н. Клеточноспецифические особенности регуляции транскрипции гена глутатион S-трансферазы P1 человека. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2009.

Диссертация посвящена исследованию роли цис- и транс-действующих факторов в клеточноспецифической регуляции транскрипции гена глутатион S-трансферазы P1 в трех линиях малигнизированных клеток (молочной железы Hbl-100, меланома Me45 и хориокарцинома BeWo), которые отличаются уровнем экспрессии данного гена, а также исследованию изменений в регуляции транскрипции гена *GSTP1*, происходящих при злокачественной трансформации клеток трофобласта в клетки хориокарциномы.

Согласно результатам количественного ОТ-ПЦР в реальном времени и полуколичественного иммуноблоттинга, ген *GSTP1* экспрессируется на высоком уровне в клетках Hbl-100, клетки Me45 и BeWo имеют пониженную экспрессию данного гена. Для выявления молекулярных механизмов, обуславливающих данные различия, был проведен функциональный анализ сайтов промотора *GSTP1* при помощи люциферазного теста, и методом исследования электрофоретической активности ДНК-белковых комплексов с применением антител и конкурентных олигонуклеотидов были определены транскрипционные факторы,

взаимодействующие с этими сайтами. Для проведения люциферазного теста необходимо было клонировать промотор гена *GSTP1* и его фрагменты. Однако получение данного промотора при помощи стандартной ПЦР-амплификации оказалось невозможным из-за неравномерности распределения GC и AT-богатых участков и наличия множественных шпилечных структур. Для преодоления этой проблемы нами был предложен метод, включающий медленную элонгацию в присутствии Q-Solution. Данный подход, который может быть использован и для амплификации других фрагментов ДНК с подобными особенностями, позволил амплифицировать полный промотор *GSTP1* и его фрагменты, использованные впоследствии для создания репортерных конструкций.

Результаты люциферазного теста с репортерными конструкциями на основе вектора pGL3-Basic показали, что сайты ARE и NF-κB промотора *GSTP1* являются позитивными регуляторными элементами, а сайты CRE и NF-κB-подобный – негативными.

В эксперименте по определению электрофоретической активности ДНК-белковых комплексов было установлено, что ядерные белки из исследуемых клеток специфически взаимодействуют с сайтами ARE, NF-κB и CRE промотора *GSTP1*. При помощи антител было установлено, что с сайтом ARE во всех типах клеток взаимодействует ERβ, который связывается с ДНК в комплексе с неидентифицированным белком. эстрогеновый рецептор был Также обнаружен в комплексе с сайтом CRE, с которым он взаимодействует совместно с фактором Fos. Однако структура CRE-белкового комплекса в клетках Hbl-100 отличается от таковой в других типах клеток, что обуславливает повышение уровня экспрессии *GSTP1* в Hbl-100. Также клеточноспецифические различия были выявлены в составе комплексов, образующихся с NF-κB-сайтом. В клетках Hbl-100 и Me45 с данным сайтом связывается гетеродимер p50/p65, а в клетках BeWo – гомодимер p50/p50. Поскольку у субъединицы p50 отсутствует трансактиваторный домен, связывание такого гомодимера вызывает репрессию транскрипции и, соответственно, отвечает за пониженную экспрессию *GSTP1* в клетках хориокарциномы. Таким образом, установлено, что сайты CRE и NF-κB и взаимодействующие с ними белки отвечают за клеточноспецифические уровни экспрессии гена *GSTP1* в исследованных типах клеток. Также выявление рецептора эстрогенов в комплексе с элементами промотора *GSTP1* позволяет объяснить выявленное ранее явление активации транскрипции данного гена эстрадиолом при отсутствии в промоторе гена канонических и неканонических сайтов связывания ER.

Следующим этапом работы был сравнительный анализ спектра транскрипционных факторов, взаимодействующих с промотором гена *GSTP1* в плаценте и клетках хориокарциномы. При помощи количественного ОТ-ПЦР в реальном времени и полуквантитативного иммуноблоттинга было установлено, что в клетках хориокарциномы происходит снижение экспрессии гена *GSTP1* по сравнению с клетками нормального трофобласта. В исследовании ДНК-белковых комплексов, образующихся в плаценте на промоторе гена *GSTP1*, было показано, что с сайтами ARE и NF-κB в нормальном трофобласте взаимодействуют те же белки, что и в клетках хориокарциномы – ERβ в комплексе с

неидентифицированным белком и p50/p50 гомодимерная форма транскрипционного фактора NF-κB соответственно. Однако в комплексе с сайтом CRE в плаценте помимо присутствующих в хориокарциноме белка Fos и ERβ был выявлен транскрипционный фактор Jun. По-видимому, его сильное трансактиваторное действие и отвечает за высокий уровень экспрессии *GSTP1* в плаценте, несмотря на действие репрессора p50/p50.

Заключительным этапом работы было определение ранних стадий метилирования промотора *GSTP1* в исследованных клетках и в ткани плаценты с целью проверки предположения о том, что в процессе канцерогенеза репрессия данного гена за счет транскрипционных факторов закрепляется путем метилирования. Метилирование определяли при помощи ПЦР-амплификации модифицированной бисульфитом ДНК с используемыми для клинической диагностики рака простаты праймерами к сайтам промотора, которые первыми подвергаются метилированию. В клетках Hbl-100 с высоким уровнем экспрессии исследуемого гена и в ткани плаценты метилирование промотора не было выявлено ни в одном из тестируемых сайтов. В то же время, в клетках Me45 и BeWo, где транскрипция гена подвергается ингибирующему действию транскрипционных факторов, метилирование в одном из сайтов было выявлено. Таким образом, было показано, что промотор гена *GSTP1* в клетках меланомы и хориокарциномы со сниженным уровнем его экспрессии подвергается метилированию.

Ключевые слова: *GSTP1*, промотор, рецептор эстрогенов, NF-κB, метилирование.

SUMMARY

Slonchak A.M. Cell-specific particularities of the human glutathione S-transferase gene transcription regulation. – Manuscript.

Thesis for Philisophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2009.

The thesis is devoted to study of the cell-specific role of cis- and trans-acting factor in regulation of *GSTP1* gene transcription in three malignant cell lines (breast cells Hbl-100, melanoma cells Me45 and choriocarcinoma cells BeWo), which possess different levels of *GSTP1* expression and identification of changes in transcriptional regulation associated with neoplastic transformation of trophoblast cells. ARE and NF-κB sites were identified as positive and CRE and NF-κB-like site as negative regulatory elements. Proteins interacting with these sites were also identified. We demonstrated that CRE and NF-κB sites are responsible for cell-specific regulation of the *GSTP1* transcription. The mode of ERβ and Fos interaction together with Jun binding mediates cell-specific influence of CRE and subunit composition of NF-κB is responsible for cell-specific action of NF-κB site. It was indicated that down-regulation of *GSTP1* during placental carcinogenesis occurs due to lack of Jun in CRE-protein complex. We also demonstrated that in cells with transcription factor-mediated *GSTP1* repression promoter of this gene undergoes methylation.

Key words: *GSTP1*, promoter, estrogen receptor, NF-κB, methylation.