

РОЛЬ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕЛЕНОПРОТЕИНОВ-РЕЗИДЕНТОВ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА НА ПРИМЕРЕ ФИБРОСАРКОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. Е.Г. Варламова, М.В. Гольтяев

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: 1928lv@mail.ru

Поступила в редакцию 15.01.18 г.

После доработки 03.04.18 г.

Селенит натрия – одно из наиболее распространенных соединений селена, рассматриваемое в качестве потенциального противоракового агента, способного индуцировать снижение жизнеспособности клеток, наличие которого было зарегистрировано во многих типах раковых клеток. Окислительный стресс также является одной из причин любого злокачественного образования в том числе ввиду длительного стресса эндоплазматического ретикулума, вызванного резким увеличением свободных радикалов в организме. Поскольку селенопротеины являются оксидоредуктазами и обладают антиоксидантными свойствами благодаря наличию селена в их составе, весьма актуальны исследования, посвященные их роли в регуляции процессов канцерогенеза, при этом основное внимание уделяется селенопротеинам-резидентам эндоплазматического ретикулума – органоида клетки, в котором весьма активно протекают окислительно-восстановительные процессы. Кроме того, почти треть из известных к настоящему времени селенопротеинов человека локализуется именно в эндоплазматическом ретикулуме, для некоторых из них доказана роль в регуляции процессов, связанных со стрессом эндоплазматического ретикулума в различных типах раковых клеток. В работе исследован характер изменения экспрессии мРНК генов селенопротеинов-резидентов эндоплазматического ретикулума, а также генов-основных участников регуляции стресса эндоплазматического ретикулума в клетках фибросаркомы человека под влиянием селенита натрия.

Ключевые слова: селенит натрия, селенопротеины, фибросаркома человека, стресс эндоплазматического ретикулума.

DOI: 10.1134/S000630291805006X

Эндоплазматический ретикулум (ER) – обширная мембранная органелла, играющая важнейшую роль в жизнеспособности эукариотической клетки, одной из функций которой является регуляция секреции белков, сопровождающаяся их нативным сворачиванием и посттрансляционной модификацией [1–4]. Только правильно свернувшиеся белки транспортируются к комплексу Гольджи, белки с неправильным фолдингом остаются в ER, где либо завершается процесс их сворачивания, либо они подвергаются процессу деградации. Для нормального созревания белка необходимо выведе-

ренное соответствие между биосинтетической нагрузкой и функциональной вместимостью ER. Результатом нарушения этого баланса является перегрузка ER и аккумуляция в его просвете неактивных или химически агрессивных белков [5]. Для того чтобы обеспечить это динамическое равновесие, эукариоты выработали сложный механизм, известный как «ответ на мисфолдинг белков» (UPR – Unfolded Protein Response). Однако причины, которые могут вызвать ER-стресс и UPR, весьма разнообразны, одной из них является окислительный стресс, представляющий собой дисбаланс между образованием активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантным ответом клетки [6]. Кроме того, окислительный стресс, вызванный резким ростом свободных радикалов в организме, является также одной из важных причин любого злокачественного образования. Одним из наиболее распространенных соединений селена, рассматриваемого в качестве потенциального

Сокращения: ER – эндоплазматический ретикулум; UPR – ответ на мисфолдинг белков; АФК – активные формы кислорода; CHOP – С/ЕВР-гомологичный белок; D2 – йодотирониндейодиназа 2; SELK, SELN, SELS, SELM, SELT, SELI, SEP15 – соответственно селенопротеины K, N, S, M, T, I, 15; GADD34 – белок 34, вызывающий прекращение роста и повреждение ДНК, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

противоракового агента, способного индуцировать образование АФК, является селенит натрия (Na_2SeO_3) [7–9]. Известно, что Na_2SeO_3 может индуцировать торможение роста клеток, ассоциированное с UPR [10,11], а также активацию каспазы 4 и экспрессию гена С/ЕВР-гомологичного белка (СНОР – С/ЕВР Homologous Protein) и других проапоптотических генов [10,12,13]. Поскольку микроэлемент селен обладает антиоксидантными свойствами и входит в состав ферментов-антиоксидантов, то исследование роли Na_2SeO_3 и селенопротеинов в регуляции процессов, протекающих в ER, особенно ER-стресса, а также канцерогенеза является весьма актуальным. К настоящему времени известно, что у млекопитающих существует семь селенопротеинов-резидентов ER: йодотирониндейодиназа 2 (D2), селенопротеины K, N, S, M, T, 15 (SELK, SELN, SELS, SELM, SELT и SEP15 соответственно). Относительно недавно нами было показано, что еще один селенопротеин млекопитающих селенопротеин I (SELI) локализуется в ER [14]. Принимая во внимание вышесказанное, в рамках данной работы исследован характер изменения экспрессии мРНК генов восьми селенопротеинов ER в клетках фибросаркомы человека при действии на них Na_2SeO_3 . Предполагая, что Na_2SeO_3 вызывает гибель раковых клеток вследствие регуляции экспрессии проапоптотических генов и индукции АФК, мы провели анализ уровней экспрессии мРНК генов, кодирующих, факторы транскрипции Xbp1 (полноразмерная последовательность и укороченная форма, без 26-нуклеотидного интрона), белок 34 (GADD34 – Growth Arrest and DNA Damage gene-34), СНОР, экспрессию проапоптотических генов ВН3: Vim (BCL2L11) и Puma (P53 up-regulated modulator of apoptosis), каспазы 4. Чтобы проверить, как меняется окислительно-восстановительный баланс в исследуемых раковых клетках под влиянием Na_2SeO_3 , проанализировали экспрессию генов, кодирующих глутатионпероксидазу 1, глутатионпероксидазу 4 и тиоредоксинредуктазу 1, поскольку системы тиоредоксина и глутаредоксина являются основными регуляторами редокс баланса в клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение тотальной РНК. В работе использовали клеточную линию НТ-1080-фибросаркома человека (American Type Culture Collection, США). Выделение тотальной РНК из клеток проводили с помощью реагента «Extract tRNA reagent» («Евроген», Россия), содержащего раствор фенола и гуанидинизотиоционата.

Для этого сначала лизировали клетки путем добавления данного реагента на чашку Петри с клеточным монослоем из расчета 1 мл на 10 см^2 поверхности чашки. Далее проводили выделение тотальной РНК согласно предложенному протоколу.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу и с использованием реактивов для синтеза первой цепи кДНК («Евроген», Россия), содержащего обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей MMLV. Количество тотальной РНК в реакционной смеси составило 2 мкг, реакцию проводили с помощью oligodT-праймеров.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для проведения реакции ПЦР в реальном времени с помощью смеси qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия). В таблице приведены последовательности нуклеотидов для синтеза участков анализируемых генов. Количество суммарной РНК (2 мкг), используемое в реакциях обратной транскрипции, контролировали, проводя параллельно реакцию амплификации с использованием праймеров, специфичных к гену Gaphd человека. Относительный уровень экспрессии генов (ОУЭ – уровень экспрессии исследуемого гена относительно экспрессии референсного гена) в клетках определяли по формуле: $\text{ОУЭ} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$, где ΔCt – разница между значениями пороговых циклов для референсного (ген, кодирующий глицеральдегидфосфатдегидрогеназу) и целевого генов (исследуемый ген). Изменение уровня экспрессии мРНК исследуемых генов до и после обработки Na_2SeO_3 определяли по формуле $\text{ОУЭ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, где $\Delta\Delta\text{Ct}$ – разница значений ΔCt для каждого гена до и после обработки клеток Na_2SeO_3 . Каждый цикл работы (выделение РНК, реакция обратной транскрипции, ПЦР в реальном времени) повторяли трижды.

Анализ жизнеспособности клеток после обработки селенитом натрия. Данную процедуру проводили с помощью клеточного анализатора iCelligence RTCA (ACEA Biosciences®, США), предназначенного для исследования жизнеспособности клеток в режиме реального времени до, в момент и после оказания на них любого воздействия. Принцип определения жизнеспособности основан на непрерывном измерении электрического сопротивления в образце, находящемся на поверхности электрода, который встроен в реакционный модуль прибора. Таким образом, чем больше клеток располагается на электроде, тем сильнее меняется сопротивление этого электрода.

Последовательности праймеров, используемых для проведения реакции ПЦР в реальном времени

Название праймера	Последовательность прямого праймера 5' → 3'	Последовательность обратного праймера 5' → 3'
Chop	GCTCTGATTGACCGAATGG	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
Gadd34	GAGGGCAGGGAAGTCAATT	CCTCCCCTGGGTCTCTATC
Bim	CAGATATGCGCCAGAGAT	CCATTCGTGGGTGGTCTTC
Puma	ACCTCAACGCACAGTACGAG	GTAAGGGCAGGAGTCCCA
Uxbp1	ACTCAGACTACGTGCACCTC	ACTCAGACTACGTGCACCTC
Sxbp1	CTGAGTCCGCAGCAGCAGG	GGTCCAAGTTGTCCAGAATG
Casp4	CACGCCTGGCTCTCATCATA	TAGCAAATGCCCTCAGCG
Gpx1	CTACTTATCGAGAATGTGGCG	CGAAGAGCATGAAGTTGGG
Gpx-4	CCATGCACGAGTTTTCCTG	AATTTGACGTTGTAGCCCG
Txnrd1	GGTCTGGCAGCTGCTAAGG	TAGCCCCAATTCAAAGAGC
Seli	CCAAATGAGTAGTACCCGGTG	CCAAAGAAAGATTATACAGGCC
Seprn	TGATCTGCCTGCCCAATG	TCAGGAACATGCATGTAGGTGG
D2	AGCTTCCTCCTCGATGCC	AAAGGAGGTCAAGTGGCTG
Sels	GCGTCCAGGTCTCCAGG	TGGGACAGCATGCAAGAAG
Selk	GGTCTGGCAGCTGCTAAGG	TAGCCCCAATTCAAAGAGC
Sep15	TACGGTTGTTGTTGGCGAC	CAAATTTGTGCTTCCTCCTGAC
Selt	TCTCCTAGTGGCGGCGTC	GTCTATATATTGGTTGAGGGAGG
Selm	GCCTCCTGTTGCCTCCGA	AGGTCAGCGTGGTCCGAAG
Gapdh	AACGGGAAGCTCACTGGC	CACCACCTGTTGCTGTAGC

Предварительно проводили подбор концентраций селенита натрия, значительным образом подавляющих жизнеспособность исследуемой раковой клеточной линии. В работе использовали высокоочищенную (99%) соль селенита натрия (Sigma-Aldrich, США). Клетки подращивали в специальных планшетах в 500 мкл питательной среды ДМЕМ с добавлением 10%-й сыворотки при 37°C в течение 24 ч, после чего добавляли различное количество Na₂SeO₃ (0, 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мкМ). Инкубировали клетки в анализаторе в течение 48 ч. Для анализа жизнеспособности клеток после их обработки селенитом натрия вышеописанную процедуру повторяли трижды.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 приведены результаты исследования влияния Na₂SeO₃ на жизнеспособность раковых клеток HT-1080. Можно заключить, что уже при добавлении 1 мкМ Na₂SeO₃ наблюдалось снижение жизнеспособности, однако в наших экспериментах это не повлияло на экспрессию исследуемых генов. Все остальные используемые нами концентрации Na₂SeO₃ приводили к существенному снижению жизнеспособности раковых клеток, правда, с разной эффективностью. Поскольку при использовании

7,5 мкМ и 10 мкМ Na₂SeO₃ гибель исследуемых клеток наблюдалась практически сразу после добавления Na₂SeO₃, в последующих экспериментах к монослою клеток линии HT-1080 добавляли 10 мкМ Na₂SeO₃ и инкубировали 12 ч, после чего проводили анализ экспрессии мРНК исследуемых генов, результаты которого отражены на рис. 2. Очевидно, что после обработки клеток Na₂SeO₃ происходит значительное увеличение уровней экспрессии мРНК генов, кодирующих CHOP, GADD34, Bim, Puma. Это может свидетельствовать об активации в клетках проапоптотической ветви UPR, что происходит, как правило, при продолжительном ER-стрессе и приводит к апоптозу клеток. Известно, что активированный CHOP подавляет экспрессию антиапоптотического гена Bcl2, что также способствует усилению окислительного стресса [15,16], о чем может свидетельствовать увеличение экспрессии ферментов-антиоксидантов глутатионпероксидазы 1, глутатионпероксидазы 4 и тиоредоксинредуктазы 1. Кроме того, наблюдается усиление экспрессии укороченного транскрипта шаперона ER SXP1, что может говорить об активации киназы IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1), которая вырезает интрон длиной 26 нуклеотидов из несплайсированной мРНК XBP1 (UXBP1). Известно, что проапоптотический UPR включает активацию каспаз,

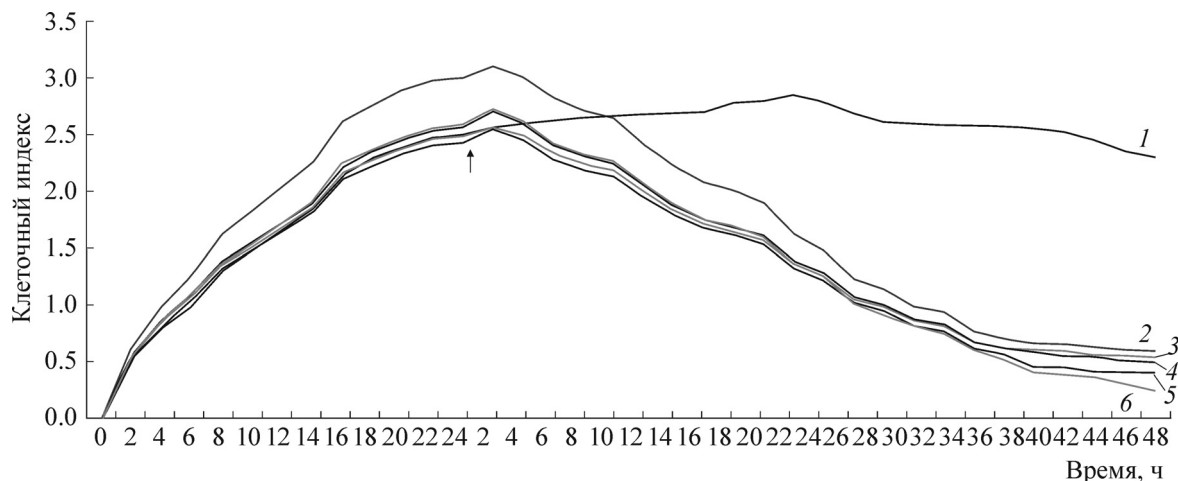


Рис. 1. Изменение жизнеспособности клеток линии HT-1080 после их инкубирования с Na_2SeO_3 в различных концентрациях: 1 – 0 мкМ, 2 – 1 мкМ, 3 – 2,5 мкМ, 4 – 5 мкМ, 5 – 7,5 мкМ, 6 – 10 мкМ. Na_2SeO_3 добавляли спустя 24 ч после инкубирования клеток в клеточном анализаторе. Стрелкой обозначен момент добавления Na_2SeO_3 к клеткам. Измерение клеточного индекса проводили в течение 48 ч после добавления Na_2SeO_3 . Клеточный индекс, являющийся показателем сопротивления электронного потока клеткам, находящимся в адгезивном состоянии, в момент времени n вычисляли по формуле: (значение сопротивления в момент времени n – значение сопротивления в отсутствие клеток)/номинальное значение сопротивления.

в частности каспазы 4 и 9 [17,18]. Однако в наших экспериментах, наоборот, происходило снижение уровня экспрессии каспазы 4.

Основной целью данной работы было исследование изменения уровней экспрессии мРНК генов селенопротеинов, локализуемых в ER, при воздействии на клетки фибросаркомы человека селенита натрия, по сути, в условиях продолжительного ER-стресса. Из результатов, отраженных на рис. 2, можно заключить, что 10 мкМ Na_2SeO_3 способствует снижению экспрессии генов, кодирующих селенопротеины SELN, SELK, SEP15 и в значительной степени D2, а также усилению уровней экспрессии SELI, SELM, SELS и SELT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Селенит натрия в концентрациях 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мкМ, как и ожидалось, индуцировал торможение роста и гибель клеток, скорее всего, в результате увеличения образования АФК и последующей активации ER-стресса. Известно, что в ответ на возникновение ER-стресса в клетке активируется комплекс эволюционно сохраненных высокоспецифичных внутриклеточных сигнальных путей – UPR [19–21]. Существует две ветви UPR – адаптивная и ветвь, запускающая апоптоз (проапоптотическая) [22, 23]. Адаптивная ветвь реализуется тремя сигнальными каскадами, центральная роль в запуске которых принадлежит шаперону-регулятору глюкозы GRP78 (BIP), в обычном состоя-

нии связанному с тремя сенсорно-сигнальными ферментами, находящимися на мембране ER: киназами PERK и IRE1, а также фактором транскрипции ATF-6. При ER-стрессе GRP78 отщепляется от сенсоров, активирует их и запускает адаптивный UPR [24,25]. При продолжительном стрессе ER активируется механизм проапоптотического UPR, приводящего к запрограммированной гибели клеток. При этом происходит активация CHOP, который индуцирует увеличение экспрессии генов, кодирующих белки-участники апоптоза (GADD34, Bim, Puma) [13,26]. Результаты данной работы дают основание полагать, что Na_2SeO_3 способствует активации пролонгированного ER-стресса и последующего проапоптотического UPR. Кроме того, наблюдается активация IRE1-пути, о чем свидетельствует усиление экспрессии мРНК укороченного транскрипта гена, кодирующего шаперон XBP1.

Известно, что Na_2SeO_3 является одним из наиболее распространенных соединений селена, рассматриваемого в качестве потенциального противоракового агента, способного индуцировать образование АФК [7–9]. Скорее всего, окислительный стресс, возникший в результате усиленной генерации АФК при воздействии на клетки Na_2SeO_3 , и явился причиной ER-стресса. Это привело к активации системы глутаредоксина и тиоредоксина, являющихся основными регуляторами редокс-баланса в клетках, о чем свидетельствует усиление экспрессии ферментов-антиоксидантов глутатионпероксидаз и

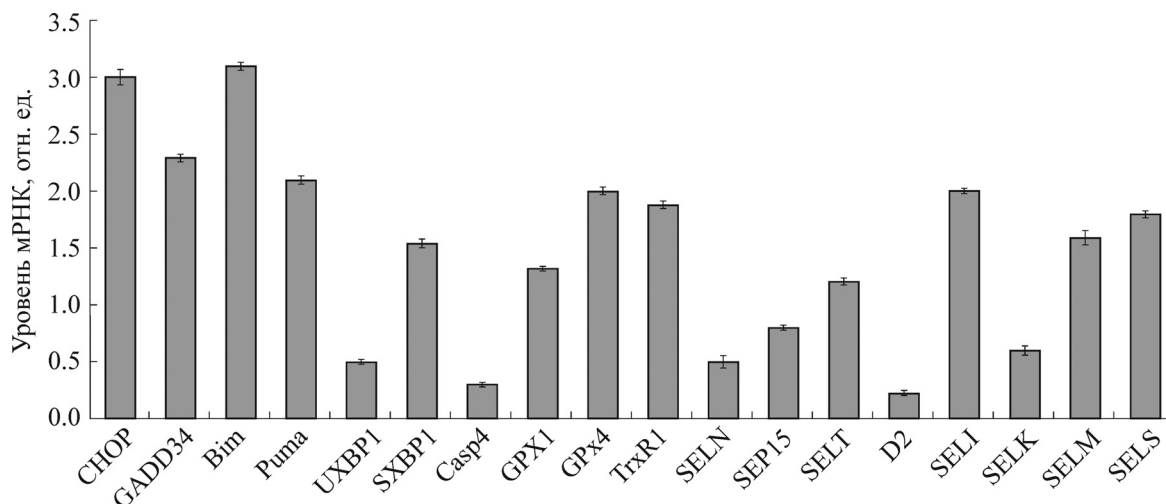


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии мРНК исследуемых генов в клетках HT-1080 после их инкубирования с 10 мкМ Na_2SeO_3 в течение 12 ч. За единицу принят уровень экспрессия мРНК данных генов в интактных клетках. Значения представлены в виде средних по трем независимым экспериментальным значениям \pm стандартное отклонение. Количество суммарной РНК (2 мкг), используемое в реакциях обратной транскрипции, контролировали, проводя параллельно реакцию амплификации с использованием праймеров, специфичных к человеческому гену *Gapdh*.

тиоредоксинредуктаз, используемых в данной работе.

Однако большое количество работ в последнее время посвящено исследованию роли микроэлемента Se в регуляции процессов, протекающих в ER, как ключевого компонента селенопротеинов-резидентов ER. Известно, что SELS и SELK обладают похожей структурной организацией и вовлечены в одни и те же процессы, протекающие в данном органоеде. Так, первоначально было показано, что SELS взаимодействует с белками деградации ER – Derlin-1, p97 [27], Derlin-2 [28,29], в качестве партнеров SELK были обнаружены также Derlin-1, Derlin-2, p97, SELS, а также компоненты олигосахаридтрансферазного комплекса [27,29–31], а также участвуют в поддержании гомеостаза ER. Однако наши результаты, скорее, свидетельствуют об отсутствии синергичности действия обоих белков, поскольку в исследуемой раковой клеточной линии Na_2SeO_3 вызывал значительное усиление (в полтора–два раза по сравнению с контролем) экспрессию мРНК гена, кодирующего SELS, и снижение экспрессии гена селенопротеина SELK.

Отдельного внимания заслуживает анализ снижения уровня экспрессии гена белка SEP15.

На сегодняшний день достаточно хорошо изучена его роль в регуляции ER-стресса, однако механизм данной регуляции в значительной степени зависит от индуктора стресса. Так, экспрессия гена SEP15 увеличивалась при адаптивном UPR, вызванном кратковременной инкубацией с дитиотреитолом [32]. Известно, что дитиотреитол активирует UPR за счет восстановления дисульфидных связей в белках и нарушения их структуры. Увеличение экспрессии SEP15 в клетках NIH3T3 наблюдалось только при адаптивном UPR, когда клетки инкубировали с 0,1 и 1 мМ дитиотреитолом, но не при остром ER-стрессе [32]. При обработке данной клеточной линии 10 мМ дитиотреитолом происходила специфическая протеосомная деградация данного селенопротеина вследствие нарушения белок-белковых взаимодействий между SEP15 и UGGT, которые связываются посредством N-концевого домена, богатого остатками цистеина. При нарушении данного взаимодействия SEP15, скорее всего, становится мишенью протеосомной деградации. Результаты настоящей работы дают основание полагать, что Na_2SeO_3 способствует активации именно пролонгированного ER-стресса и последующего проапоптотического UPR, а снижение экспрессии гена SEP15 подтверждает ранее полученные результаты [32].

Также можно наблюдать почти двукратное снижение экспрессии гена SELN. Из ранее полученных данных известно, что в его промоторной области обнаружено пять сайтов для

связывания с транскрипционным фактором NF- κ B, ERSE-участок [33], а также сайт связывания для редокс-чувствительного фактора AP-1 [34], следовательно, экспрессия SELN может регулироваться в процессе ER-стресса различными клеточными стрессорами (АФК, ER-стресс, цитокины) [35]. Анализируя результаты нашей работы, можно говорить о негативной регуляции экспрессии мРНК гена SELN в условиях ER-стресса, вызванного селенитом натрия.

Кроме того, можно наблюдать существенное снижение экспрессии мРНК селенопротеина D2, что также согласуется с ранее полученными данными. Так, было показано, что ER-стресс может приводить к быстрой потере активности D2 и снижению концентрации тиреоидного гормона Т3 [36]. На примере клеток мезотелиомы MSTO-211H, способных эндогенно экспрессировать D2 [37], было показано, что при обработке их тапсигаргином (5–450 нМ), известным индуктором ER-стресса, происходило дозозависимое снижение активности D2 вплоть до 25%. При глютаминовом голодании в течение 24 ч – состоянии, способствующем усилению ER-стресса, – также наблюдалось снижение активности D2 на 50% [38].

При анализе результатов, приведенных на рис. 2, можно заключить, что при обработке клеток фибросаркомы человека селенитом натрия происходит почти двукратное усиление экспрессии мРНК генов селенопротеинов SEL1 и SELM, в меньшей степени SELT. К сожалению, к настоящему времени имеется совсем немного информации о роли данных белков в канцерогенезе и в регуляции процессов, происходящих в ER. Недавно нами было показано, что SEL1, помимо распределения в ядре и цитоплазме, локализуется и в ER [14], а методом ПЦР в реальном времени установлено, что мРНК генов обоих белков в значительной степени экспрессируется во всех тестируемых нами раковых клеточных линиях – HT-1080 (фибросаркомы), HerG2 (карциномы печени), MCF7 (аденокарциномы молочных желез), A-172 (глиобластомы), HeLa (аденокарциномы шейки матки) и DU-145 (карциномы простаты) [14,39,40]. Было показано, что в условиях дефицита селена уровень экспрессии SEL1 положительно коррелирует с семейством генов Bcl-2, которые играют центральную роль в апоптозе, и отрицательно – с экспрессией проапоптотической каспазой 3 [41]. На примере эндокринных клеток линии AtT20 было показано, что SELT выступает в качестве защитного агента против ER-стресса, вызванного действием на эти клетки его индуктором туникамицином (1 мкг/мл) и дитиотреитолом (100 мкМ). Снижение актив-

ности SELT приводило к увеличению чувствительности этих клеток к индукторам ER-стресса и снижению их жизнеспособности на 37 и 31% соответственно, что также сопровождалось значительным увеличением экспрессии генов, кодирующих CHOP, ATF4 и Xbp-1. Было высказано предположение, что это может привести к накоплению в ER неправильно свернувшихся белков и, как следствие, к дисфункции ERAD [41]. В наших экспериментах на клеточной линии эти результаты получили подтверждение.

ВЫВОДЫ

Na_2SeO_3 в концентрациях 2,5, 5,0, 7,5 и 10 мкМ приводит к существенному снижению жизнеспособности раковых клеток линии HT-1080, скорее всего, по причине ER-стресса, вызванного резким ростом АФК, о чем свидетельствует усиление экспрессии ферментов-антиоксидантов глутатионпероксидаз и тиоредоксинредуктаз, используемых в данной работе. Несмотря на то что токсический эффект Na_2SeO_3 на клетки фибросаркомы наблюдался и при воздействии на них 1 мкМ данного соединения, это не повлияло на экспрессию исследуемых в данной работе генов. На основании данных относительно экспрессии мРНК генов, задействованных в регуляции ER-стресса, можно предположить, что Na_2SeO_3 в концентрации 10 мкМ способствует активации пролонгированного ER-стресса и последующего проапоптотического UPR. Na_2SeO_3 в концентрации 10 мкМ способствует существенному усилению экспрессии мРНК генов селенопротеинов SEL1, SELM и SELS, негативная регуляция экспрессии селенитом натрия наиболее ярко выражена для D2, SELN и SELK.

Результаты, полученные в ходе данной работы, послужат начальным этапом исследований роли восьми селенопротеинов-резидентов ER в процессах, протекающих в данном органе в условиях пролонгированного стресса ER, вызванного действием селенита натрия. Полученные данные требуют дальнейшего подтверждения в более серьезных исследованиях, направленных на изучение изменений, вызванных Na_2SeO_3 в клетках фибросаркомы, с помощью различных независимых подходов, например, при сайленсинге генов, исследуемых селенопротеинов, потребуются анализ изменения экспрессии генов других селеноцистеин-содержащих белков, опухолевых маркеров, а также известных участников регуляции ER-стресса и др.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных

исследований (гранты №№ 17-04-00356 и 18-34-00118 мол_а) и стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам СП-2059.2016.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Lavoie and J. Paiement, *Histochem. Cell Biol.* **129**, 117 (2010).
2. K. Powell and M. Latterich, *Traffic* **1**, 689 (2000).
3. G. Voeltz, M. Rolls, and T. Rapoport, *EMBO Reports* **3**, 944 (2002).
4. C. Hwang, A. J. Sinskey, and H. F. Lodish, *Science* **257**, (1992).
5. C. M. Haynes, E. A. Titus, and A. A. Cooper, *Mol. Cell* **15**, 767 (2004).
6. M. Kitamura and N. Hiramatsu, *Biometals* **23**, 941 (2010).
7. B. J. Lee, M. Rajagonpalan, Y. S. Kim, et al, *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1940 (1990).
8. C. Liu, H. Liu, Y. Li, et al., *Mol. Carcinog.* **51**, 303 (2012).
9. C. M. Weekley, G. Jeong, M. E. Tierney, et al., *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 813 (2014).
10. R. R. Ramoutar, J. L. Brumaghim, *Cell. Biochem. Biophys.* **58**, 1 (2010).
11. K. Zu, T. Bihani, A. Lin, et al., *Oncogene* **25**, 546 (2006).
12. H. Puthalakath, L. A. O'Reilly, P. Gunn, et al., *Cell* **129**, 1337 (2007).
13. S. C. Cazanave, N. A. Elmi, Y. Akazawa, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G236 (2010).
14. E. G. Varlamova, M. V. Goltjaev, V. I. Novoselov, and E. E. Fesenko, *Dokl. Biochem. Biophys.* **476** (1), 320 (2017).
15. K. D. McCullough, J. L. Martindale, L. O. Klotz, et al., *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1249 (2001).
16. A. L. Anding, J. S. Chapman, D. W. Barnett, et al., *Cancer Res.* **67**, 6270 (2007).
17. R. V. Rao, S. Castro-Obregon, H. Frankowski, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 21836 (2002).
18. N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, et al., *J. Biol. Chem.* **277**, 34287 (2002).
19. E. Szegezdi, S. E. Logue, A. M. Gorman, and A. Samali, *EMBO Rep.* **7** (9), 880 (2006).
20. M. Kitamura, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295** (2), F323 (2008).
21. R. Inagi, *Nephron. Exp. Nephrol.* **112** (1), e1 (2009).
22. J. D. Malhotra and R. J. Kaufman, *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2277 (2007).
23. D. Ron and P. Walter, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 519 (2007).
24. K. Zhang and D. J. Kaufman, *Methods Enzymol.* **442**, 395 (2008).
25. J. G. Dickhout, J. C. Krepinsky, *Antioxid. Redox Signal.* **11** (9), 2341 (2009).
26. H. Puthalakath, L. A. O'Reilly, P. Gunn, et al., *Cell* **129**, 1337 (2007).
27. Y. Ye, Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, and T. A. Rapoport, *Nature* **429**, 841 (2004).
28. Y. Oda, T. Okada, H. Yoshida, et al., *J. Cell. Biol.* **172**, 383 (2006).
29. B. N. Lilley and H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14296 (2005).
30. Y. Ye, Y. Shibata, M. Kikkert, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14132 (2005).
31. V. A. Shchedrina, R. A. Everley, Y. Zhang, et al., *J. Biol. Chem.* **286**, 42937 (2011).
32. V. M. Labunskyy, M. H. Yoo, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev, *Biochemistry* **48**, 8458 (2009).
33. S. B. Baylin, J. G. Herman, J. R. Graff, et al., *Adv. Cancer Res.* **72**, 141 (1998).
34. Z. R. Stoytcheva and M. J. Berry, *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1429 (2009).
35. S. Arbogast and A. Ferreiro, *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 893 (2010).
36. M. W. Pitts, P. R. Hoffmann, *Cell Calcium* **70**, 76 (2017). DOI: 10.1016/j.ceca.2017.05.001.
37. C. Curcio, M. M. Baqui, D. Salvatore, et al., *J. Biol. Chem.* **276**, 30183 (2001).
38. R. A. Drigo, T. L. Fonseca, M. Castillo, et al., *Mol. Endocrinol.* **25**, 2065 (2011).
39. E. G. Varlamova, M. V. Goltjaev, and E. E. Fesenko, *Dokl. Biochem. Biophys.* **468** (1), 203 (2016).
40. E. G. Varlamova and I. V. Cheremushkina, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **39**, 76 (2017).
41. Q. Wang, J. Huang, H. Zhang, et al., *Biol. Trace Elem. Res.* **176**, 407 (2017).

The Role of Sodium Selenite in Regulation of Gene Expression of Endoplasmic Reticulum Resident Selenoproteins as in the Case of Human Fibrosarcoma

E.G. Varlamova and M.V. Goltyaev

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Sodium selenite is one of the most common selenium compounds, which is considered to be a potential anticancer agent, capable of inducing a decrease in cell viability; this compound is present in many different cells where cancer develops. Oxidative stress is also one of the causes of any malignancy, that may be associated with the prolonged stress of the endoplasmic reticulum, caused by a sharp increase in free radicals in the body. It is known that selenoproteins are oxidoreductases and their antioxidant activity is due to the presence of selenium in their composition, hence, research devoted to the role of selenoproteins in regulation of carcinogenic processes is very relevant, with the aim to investigate endoplasmic reticulum resident selenoproteins – a cell organoid, where the oxidation-reduction processes are very active. Furthermore, almost one-third of the currently known human selenoproteins are located in the endoplasmic reticulum, the role of some of these selenoproteins in regulation of processes, associated with endoplasmic reticulum stress in different cells where cancer develops, has been proven. In this study, the changes in the patterns of mRNA gene expression of endoplasmic reticulum resident selenoproteins and expression of key genes involved in the regulation of endoplasmic reticulum stress in human fibrosarcoma cells under the influence of sodium selenite have been studied.

Key words: sodium selenite, selenoproteins, human fibrosarcoma, endoplasmic reticulum stress