

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**  
**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА**

На правах рукопису

**Галкін Олег Валерійович**

УДК 577.112:616

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ПРОТЕАЗ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87 ЗА  
УМОВ ПРИГНІЧЕННЯ IRE1**

03.00.04. – біохімія

**Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук**

Науковий керівник:

**Мінченко Олександр Григорович**  
доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України

Київ 2019

## АНОТАЦІЯ

*Галкін О. В.* Експресія генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення IRE1. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2018.

Робота присвячена вивченню експресії генів протеаз за умов гіпоксії і дефіциту глюкози або глутаміну у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, а також їх можливої участі у IRE1-залежному рості злоякісних пухлин, зокрема гліом.

Було продемонстровано, що за умов пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 рівень експресії генів *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS* – знижується, тоді як для всіх інших генів спостерігалось збільшення рівня експресії їх мРНК, що вказує на диференційний характер IRE1-залежної регуляції їх експресії. Встановлено, що рівень експресії більшості досліджених генів специфічних до убіквітину пептидаз і катепсинів, а також генів *HTRA1* і *STC2* є залежними від гіпоксії, дефіциту глутаміну та глюкози і що ця залежність істотно змінювалась за умов пригнічення IRE1. Виявлені за умов пригнічення IRE1 зміни в експресії генів *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSS*, *HTRA1* та *SCT2* у клітинах гліоми лінії U87, які асоціюються зі зниженням проліферації клітин гліоми і росту із них пухлин, можуть бути використані як потенційні гени-мішені з метою пригнічення росту гліом.

**Ключові слова:** експресія мРНК, катепсини, *USP*, *HTRA1*, *STC2*, пригнічення IRE1, гіпоксія, дефіцит глюкози і глутаміну, клітини гліоми лінії U87.

## ABSTRACT

*Halkin O. V.* Expression of protease genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. – Manuscript.

The thesis for PhD degree by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

The thesis highlights investigation of protease genes expression upon hypoxia and glucose or glutamine deprivation in IRE1 knockdown U87 glioma cells with suppressed kinase and endoribonuclease activities and their possible participation in IRE1-dependent growth of malignant tumors, in particular glioma.

Proteases are an important part of the complex regulatory cascades in cells and play an extremely important role in the dynamic mechanisms of metabolism regulation in different pathological conditions. Living systems maintain a balance between proteases and their inhibitors and disturbing of this equilibrium leads to the development of many diseases, including malignant tumors. In this regard, the study of the role of key proteases and processes that they control is important for understanding the molecular mechanisms of cancer development. IRE1, the most evolutionarily conserved signaling pathway of the endoplasmic reticulum stress, is highly implicated in sustaining the proliferation of glioma cells and subsequent tumor growth, which is decreased by the inhibition of IRE1.

It was shown that inhibition of IRE1 signaling enzyme function in U87 glioma cells led to suppression of *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* and *CTSS* genes expression, while for all other genes an increase of the expression level of their mRNA was observed, indicating the differential nature of IRE1-dependent regulation of their expression.

Therefore, inhibition of IRE1 signaling enzyme in U87 glioma cells modifies the effect of glutamine deficiency on the expression of most studied genes encoding cathepsins and ubiquitin specific peptidases: inducing the effect of glutamine deficiency on the *USP4* and *USP14* genes expression, decreasing - on the expression of *CTSD* gene, and amplifying - on the *USP1* gene expression.

It has been established that the expression level of most of the investigated specific for ubiquitin peptidase and cathepsin genes, as well as the HTRA1 and STC2 genes, are dependent from hypoxia, glutamine and glucose deprivation and that this dependence had significantly changed in the case of IRE1 suppression. Detected upon inhibition of IRE1 changes in the expression of *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSS*, *HTRA1* and *SCT2* genes in U87 glioma cells, which associated with reduced glioma cells proliferation and tumor growth, can be used as targets for suppression of glioma growth.

**Key words:** mRNA expression, cathepsin, USP, HTRA1, STC2, IRE1 suppression, hypoxia, glucose and glutamine deprivation, glioma U87 cells.

### СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Minchenko D. O. Effect of hypoxia on the expression of genes encoded insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without IRE1 function / D. O. Minchenko, A. P. Kharkova, **O. V. Halkin**, L. L. Karbovskiy, O. H. Minchenko // *Endocr. Reg.* – 2016. – Vol. 50, N 2. – P. 43 – 54. (*Особистий внесок здобувача - досліджував експресію гена STC2, проводив аналіз даних і брав участь у підготовці статті до друку*).

2. Minchenko D. O. IRE-1 $\alpha$  regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells / D. O. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, O. O. Ratushna, D. O. Tsybmal, O. H. Minchenko // *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.* – 2016. – N 3. – P. 50 – 62. (*Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів USP, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті*).

3. Minchenko O. H. ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and *LONP1* genes expression in U87 glioma cells / O. H. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, O. O. Ratushna // *Ukr. Biochem.*

J. – 2017. – Vol. 89, N 2. – P. 55 – 69. (*Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів катепсинів, проводив аналіз даних*).

4. **Halkin O. V.** Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation // **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, O. O. Riabovol, V. V. Telychko, O. O. Ratushna, O. H. Minchenko // Ukr. Biochem. J. – 2017. Vol. 89, N 5. – P. 52 – 61. (*Особистий внесок здобувача – досліджував експресію генів USP, проводив аналіз даних, брав участь у підготовці статті до друку*).

5. Minchenko O. H. Expression of ubiquitin specific peptidase genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells upon glucose deprivation / O. H. Minchenko, O. O. Riabovol, **O. V. Halkin**, S. V. Danilovskyi, D. O. Minchenko, O. O. Ratushna // Biotechnol. Acta. – 2016. – Vol. 9, N 5. P. – 7 – 17. (*Особистий внесок здобувача - досліджував експресію мРНК USP, проводив аналіз даних, брав участь у підготовці статті до друку*).

6. Minchenko O. H. Glucose deprivation affects the expression of LONP1 and cathepsins in IRE1 knockdown U87 glioma cells / O. H. Minchenko, **O. V. Halkin**, O. O. Riabovol, D. O. Minchenko, A. Y. Kuznetsova, O. O. Ratushna // Biotechnol. Acta. – 2016. – Vol. 9, N 6. – P. 16 – 27. (*Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію генів катепсинів, проводив аналіз даних*).

7. **Halkin O. V.** IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells / **O. V. Halkin**, O. O. Riabovol, D. O. Minchenko, A. Y. Kuznetsova, O. O. Ratushna, O. H. Minchenko // Biotechnologia Acta. – 2017. – Vol. 10, N 4. – P. 34 – 43. (*Особистий внесок здобувача – проводив роботу з культурою клітин, досліджував експресію генів катепсинів та HTRA1, проводив аналіз даних та приймав участь у написанні статті*).

8. **Галкін О. В.** Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1 / **О. В. Галкін**, O. O. Рябовол // Тези доповідей конференції молодих учених

«Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016». Ukr. Biochem. J. – 2016 р. – Vol. 88, N 4. – P. 89

9. Рябовол О. О. Гіпоксична регуляція експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 / О. О. Рябовол, **О. В. Галкін**, О. О. Ратушна // Тези доповідей VI Міжн. наук. конф. студ., аспір. та мол. вчених «Шевченківська весна: Біологія – 2016». – Київ, Україна. – 2016. – С. 172 – 173.

10. **Галкін О.** Експресія генів специфічних до убіквітину пептидаз у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози / **О. Галкін**, Д. Мінченко, О. Ратушна, О. Мінченко // Тези доповідей XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології». – Львів, Україна. – 2017. – С. 27 – 28.

11. Luzina O. Y. Hypoxic regulation of the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition / O. Y. Luzina, O. S. Hnatiuk, **O. V. Halkin**, L. L. Karbovskiyi // Joint Meeting 25<sup>th</sup> Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2<sup>nd</sup> Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine. - Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, N 4. – P. 87.

12. **Галкін О. В.** Експресія генів катепсинів та LONP1 у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози/ **О. В. Галкін**, Д. О. Мінченко, О. О. Рябовол, О. О. Ратушна, О. Г. Мінченко // Тези доповідей IV Міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології». – Дніпро, Україна. – 2017. – С. 47 – 48.

13. **Halkin O. V.** Expression of protease genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells upon glutamine deprivation / **O. V. Halkin**, D. O. Minchenko, D. O. Tsybmal // Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology - 2018”. – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, N 3. – P. 114.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>10</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>12</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>18</b>
1.1. Роль протеаз за онкологічних захворювань .....	18
1.2. Катепсини та їх роль у регуляції процесів проліферації у пухлинних клітинах.....	20
1.3. Протеази, що мають IGF-зв'язуючий домен і їх можлива роль у злякисному рості.....	23
1.4. Роль специфічних до убіквітину протеаз у регуляції метаболізму та росту злякисних пухлин.....	29
1.5. IRE1 сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, його роль у рості злякисних пухлин.....	32
1.6. Молекулярні механізми контролю експресії генів сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума.....	34
1.7. Значення гіпоксії в рості злякисних пухлин. Молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії.....	36
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>40</b>
2.1. Матеріали.....	40
2.2. Умови проведення екперименту.....	41
2.3. Методи досліджень.....	44
2.3.1. Виділення РНК.....	45
2.3.2. Електрофорез в агарозному гелі.....	46

2.3.3. Отримання кДНК методом зворотної транскрипції.....	46
2.3.4. Вивчення експресії мРНК методом полімеразної ланцюгової реакції.....	47
2.3.5. Вивчення експресії мРНК методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.....	48
2.3.6. Вестерн-блот аналіз протеїнів.....	53
2.3.7. Статистична обробка результатів.....	54
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>56</b>
3.1. Експресія генів <i>USP1</i> , <i>USP4</i> , <i>USP10</i> , <i>USP14</i> , <i>USP22</i> та <i>USP25</i> у клітинах гліоми із пригніченою функцією ензиму IRE1.....	56
3.2. Експресія генів <i>CTSA</i> , <i>CTSB</i> , <i>CTSC</i> , <i>CTSD</i> , <i>CTSF</i> , <i>CTSK</i> , <i>CTSL</i> , <i>CTSO</i> , <i>CTSS</i> та <i>STC2</i> у клітинах гліоми із пригніченою функцією ензиму IRE1.....	58
3.3. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1.....	63
3.4. Експресія генів катепсинів та <i>STC2</i> у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функціональної активності ензиму IRE1.....	69
3.5. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів <i>USP1</i> , <i>USP4</i> , <i>USP10</i> , <i>USP14</i> , <i>USP22</i> і <i>USP25</i> у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму IRE1.....	81
3.6. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів <i>CTSA</i> , <i>CTSB</i> , <i>CTSC</i> , <i>CTSD</i> , <i>CTSF</i> , <i>CTSK</i> , <i>CTSL</i> , <i>CTSO</i> , <i>CTSS</i> і <i>HTRA1</i> у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму IRE1.....	88



3.7. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз, катепсинів та *HTRA1* за умови дефіциту глутаміну у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму IRE1.....99

**РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....105**

4.1. Роль IRE1-залежного стресу ендоплазматичного ретикулула у регуляції експресії генів протеаз .....105

4.2. Гіпоксична регуляція експресії генів протеаз за умови пригнічення функцій ензиму IRE1.....110

4.3. Вплив дефіциту глутаміну на регуляцію експресії генів протеаз за умов пригнічення IRE1.....116

4.4. Роль дефіциту глюкози у регуляції експресії генів протеаз за умови вимкнення ензиматичних функцій сигнального ензиму .....120

**ЗАКЛЮЧЕННЯ.....125**

**ВИСНОВКИ.....127**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....129**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IRE1 – inositol requiring enzyme-1 (ензим-1, що потребує інозитол)

ERN-1 – endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра-1)

XBP1 – X-box binding protein 1 ( протеїн 1, що зв'язується з X-боксом)

ATF6 – activating transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)

HIF – hypoxia-inducible factor (транскрипційний фактор, що індукується за гіпоксії)

HIF- $\alpha$  – альфа-субодиниця фактора HIF

HIF- $\beta$  – бета-субодиниця фактора HIF (ARNT)

HTRA – high temperature requirement A (серинова протеаза , що потребує високої температури)

HTRA1 – серинова протеаза HtrA1

HTRA2 – серинова протеаза HtrA2

HTRA3 – серинова протеаза HtrA3

HTRA4 – серинова протеаза HtrA4

PRSS23 – protease serine 23 (серинова протеаза 23)

FAP – fibroblast activation protein (протеїн, що активує фібробласти)

DPP4 – dipeptidyl peptidase 4 (дипептидилпептидаза 4)

EGF – epidermal growth factor (епідермальний фактор росту)

USP – ubiquitin specific protease (специфічна до убіквітину протеаза)

USP1 – специфічна до убіквітину протеаза 1

USP4 – специфічна до убіквітину протеаза 4

USP10 – специфічна до убіквітину протеаза 10

USP11 – специфічна до убіквітину протеаза 11

USP14 – специфічна до убіквітину протеаза 14

USP22 – специфічна до убіквітину протеаза 22

USP25 – специфічна до убіквітину протеаза 25

USP32 – специфічна до убіквітину протеаза 32

p53 – protein 53 – протеїн 53

TGF $\beta$  – transforming growth factor beta 1 (трансформуючий фактор росту 1)

CTS – cathepsin (катепсин)

STC2 – stanniocalcin 2 (станніокальцин-2)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Протеази є важливою частиною складних регуляторних каскадів клітин і впливають на їх сигнальну мережу, яка відіграє надзвичайно важливу роль у динамічних механізмах регуляції біохімічних процесів як у нормі, так і за різних патологічних станів, а також за дії на організм різноманітних чинників. Вивчення молекулярних механізмів регуляції основних біохімічних процесів як в окремих клітинах, так і у всьому організмі на рівні окремих факторів сигнальних мереж є надзвичайно актуальним напрямком сучасних фундаментальних досліджень у біохімії та інших медико-біологічних науках. У цьому плані вивчення ролі ключових протеаз і процесів, що вони контролюють, є важливим для розуміння молекулярних механізмів розвитку патологічних станів, у тому числі й онкологічних захворювань.

До фундаментальних досліджень біології останніх двадцяти років відноситься накопичення та аналіз відомостей про фізіологічну й патологічну роль протеолізу, а також – важливість оцінки рівня активності протеаз та їх інгібіторів для клінічної практики. Протеолітичні ензими беруть участь у регуляції різноманітних біологічних процесів і забезпечують швидку відповідь організму на загальні та локальні пошкодження в умовах стресу. Це обумовлено особливістю молекулярного механізму протеолізу, який на пост-трансляційному рівні залучений до процесів утворення, інактивації і модифікації біорегуляторів протеїнової природи, забезпечуючи контроль концентрації активних молекул-регуляторів. Беручи участь у процесингу протеїнів та пептидів, протеази запускають каскадні реакції в плазмі крові і клітинах тканин, контролюючи цим велику кількість фізіологічних процесів: включаються у системи рецепції і реалізують різноманітні функції клітин; залучені до адаптаційної перебудови і морфо-генетичних перетворень клітин; беруть участь у здійсненні низки специфічних функцій клітин імунної системи (цитотоксична активність, процесинг антигенів, деяких рецепторів і

цитокинів), в апоптозі, утворенні та інактивації ростових факторів і регуляторних пептидів, модифікації поверхневих білків клітин, взаємодії клітин із вірусами, а також слугують рецепторами для протеїнів матриксу.

Інтерес до вивчення протеолітичних ензимів за неопластичних процесів пояснюється їх високим рівнем біологічної активності, участю в захисних реакціях організму, процесах росту та поділу клітин, ангіогенезі, деградації сполучнотканинних структур при інвазії пухлинних клітин і метастазуванні. Протеази вважаються ключовими елементами, які запускають ті чи інші біохімічні процеси шляхом обмеженого протеолізу різноманітних поліпептидів та залучені до ампліфікаційних каскадів – «протеазної павутини».

Відомо, що протеази клітин також беруть участь у процесах онкогенної трансформації і розвитку злоякісних утворень, а також у контролі міграції та інвазії пухлинних клітин. Саме тому дослідження регуляторних функцій протеаз у розвитку онкогенезу на даний час є перспективним напрямком для створення методів ранньої діагностики онкологічних захворювань та вибору мішеней для протипухлинної терапії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2015-2018 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: “Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії”, № ДР 0111U002234 (2011-2015р.р.), “Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом”, № ДР 0116U001027 (2016-2020р.р.), “Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій”, ДР № 0112U002624 (2012-2016р.р.) та “Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів”, ДР № 0117U004344 (2017-2021р.р.).

**Мета і завдання роботи.** Метою дисертаційної роботи було дослідити зміни в експресії генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну у середовищі в залежності від IRE1 для з'ясування їх можливої ролі в опосередкованому IRE1 контролі проліферації клітин гліоми.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Вивчити експресію генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригніченням сигнального ензиму IRE1.
2. Визначити експресію генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у клітинах гліоми за умов пригніченням IRE1.
3. З'ясувати роль IRE1 в дії гіпоксії на експресію генів основних USP та CTS у клітинах гліоми.
4. Дослідити вплив дефіциту глюкози на експресію генів основних USP і CTS, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми в залежності від функції IRE1.
5. Визначити рівень експресії генів основних USP і CTS, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми за дефіциту глутаміну залежно від функції IRE1.

**Об'єкт дослідження:** молекулярні механізми експресії генів протеаз за умов гіпоксії, а також дефіциту глюкози і глутаміну у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від сенсорно-сигнального ензиму IRE1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума.

**Предмет дослідження:** експресія генів основних протеаз за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну в клітинах гліоми лінії U87 в залежності від активності IRE1 для виявлення можливої ролі IRE1 в гіпоксичній регуляції експресії генів.

**Методи дослідження.** В даній роботі використовувалися такі методи біохімії та молекулярної біології, як: вестерн-блот аналіз протеїнів, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, наноспектрофотометричне визначення кількості РНК та їх спектральних характеристик, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, культивування клітин та статистичний аналіз отриманих результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримано нові дані про залежність рівня експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, та *CTSS* у клітинах гліоми лінії U87 від активності IRE1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума.

Показано, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1*, *USP10*, *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у контрольних клітинах гліоми, тоді як інших генів – підвищує. Пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у цих клітинах по-різному змінювало ефект гіпоксії на експресію більшості досліджених генів, що вказує на геноспецифічний характер цих змін та залежність гіпоксичної регуляції їх експресії від активності IRE1.

Виявлено, що дефіцит глютаміну та глюкози впливає на експресію більшості генів специфічних до убіквітину пептидаз та катепсинів, а також гена *HTRA1* у клітинах гліоми лінії U87, причому пригнічення активності сигнального ензиму IRE1 по-різному змінювало чутливість їх експресії до дефіциту як глютаміну, так і глюкози.

Отримані дані розкривають певні молекулярні механізми IRE1-опосередкованої регуляції проліферації пухлинних клітин через специфічні зміни в експресії генів досліджених протеаз, а також через модулюючу роль цього сигнального ензиму на ефекти гіпоксії, дефіциту глюкози та глютаміну.

**Практичне значення роботи** полягає у з'ясуванні можливої ролі протеаз у механізмах пригнічення проліферації клітин гліоми, що спостерігається за умов пригнічення основного сигнального шляху стресу

ендоплазматичного ретикулума і що важливо для розробки принципово нових підходів до створення анти-пухлинних препаратів на основі виявлених нами змін в експресії генів ключових катепсинів та специфічних до убіквітину протеаз за умов пригнічення IRE1. Отримані результати є підґрунтям для можливого використання специфічних інгібіторів протеаз в якості протипухлинних терапевтичних засобів, зокрема до USP14, CTSC, CTSL та CTSS, і були використані у лекціях по спецкурсам “Конструювання генів” та “Сучасні біотехнології” для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом було самостійно виконано аналіз даних літератури по темі роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* та *HTRA1*. Дослідження експресії деяких генів проводили за участі к.мед.н. Д. О. Мінченка, к.б.н. Ратушної О. О., к. б. н. Харькової А. П. та провідного інженера Рябовол О. О., розробка методології, аналіз та обговорення результатів здійснювались за участі наукового керівника, д. б. н., проф., члена-кор. НАН України Мінченка О. Г.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 2016; VI Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна: Біологія-2016”, КНУ ім. Тараса Шевченка, 2016; XIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», м. Львів, 2017 р.; IV Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», м. Дніпро, 2017 р., а також на Науковому семінарі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України “Актуальні проблеми сучасної біохімії”.



**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, із них 7 статей у вітчизняних та іноземних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конгресів та конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота складається із анотації, списку опублікованих робіт за темою дисертації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів досліджень, заключення, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 187 джерел. Робота викладена на 149 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 51 рисунком та містить 9 таблиць.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Роль протеаз за онкологічних захворювань

Протеоліз є однією з найбільш важливих біологічних реакцій. Протеолітична активність характерна для ензимів, що називаються протеазами. Ці ензими широко розповсюджені і виконують важливі біологічні функції. Протеази беруть участь у рості пухлин як на первинних стадіях, так і на стадіях метастазування, причому була виявлена позитивна кореляція між агресивністю пухлин і секрецією різних типів протеаз [1].

Протеази є необхідними для здійснення важливих біологічних процесів. У багатьох випадках пухлинні клітини індукують експресію протеолітичних ензимів у сусідніх непухлинних клітинах, сприяючи їх поширенню.

Відносно недавня доступність послідовностей генів різних організмів сприяла виявленню всього репертуару протеаз, які назвали «деградома». Людська деградома складається щонайменше з 569 протеаз та гомологів, згрупованих у 5 каталітичних класів: 194 металопротеаз, 176 серинових, 150 цистеїнових, 28 треонінових і 21 аспарагінових протеаз; але не всі з них пов'язані із онкогенезом [2]. Формування пухлини – складний процес, який включає в себе різні типи змін у нормальних клітинах. Прогресія пухлини включає в себе позитивні раунди мутацій та природний відбір мутованих клітин.

У пухлинній клітині також відбуваються епітеліально-мезенхімальні перетворення. Епітеліально-мезенхімальний перехід включає в себе руйнування міжклітинних контактів і підвищення рухливості клітин, що призводить до вивільнення клітин із материнської епітеліальної тканини. В результаті фенотип мезенхіми підходить для міграції і робить можливим

вторгнення та поширення пухлин. Іншими передумовами для росту пухлини є те, що пухлинні клітини повинні стимулювати розвиток кровоносних судин для забезпечення доставки поживних речовин і кисню. Формування нових судин стимулюється там, де ендотеліальні клітини розмножуються і контактують із пухлинами. Пухлинні судини утворюються за допомогою різних механізмів:

1. Судинна мережа розширюється шляхом утворення нових судинних містків (ангіогенез).

2. Пухлинні судини реконструюються і розширюються шляхом включення інтерстиціальної тканини у просвіт вже існуючих судин (інвагінації).

3. Попередники ендотеліальних клітин (ангіобласти) з кісткового мозку або периферичної крові потрапляють у пухлини і роблять свій внесок у розвиток ендотеліальної вистилки судин пухлини (васкулогенез).

Пухлинні клітини мають циркулювати, після чого вони зупиняються у місці призначення, екстравазілюють, вторгуються у певне середовище і ростуть, щоб утворити віддалені метастази (рис. 1.1.1.).

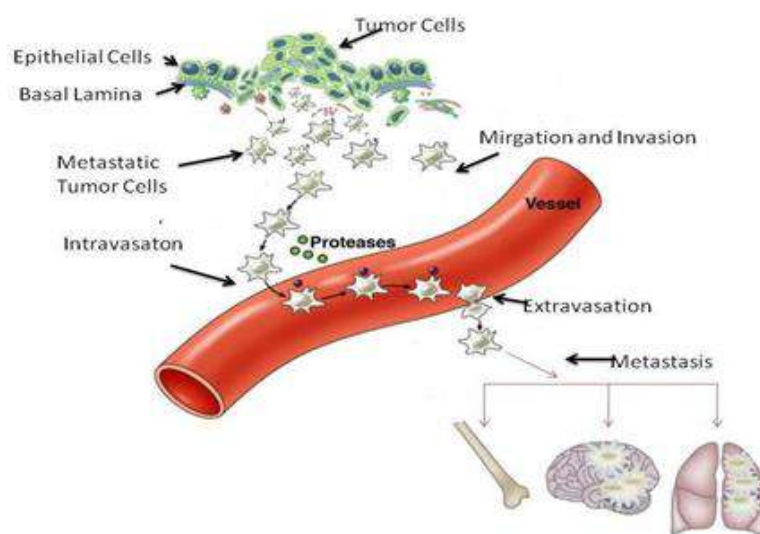


Рис. 1.1.1. Загальна модель розповсюдження і колонізації пухлинних клітин [<http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380188105>].

Ці етапи метастазування відбувається завдяки взаємодії пухлинних клітин (ПК), ендотеліальних клітин (ЕК), фібробластів і вторгненню запальних клітин (ЗК), таких як макрофаги і клітини позаклітинного матриксу [3]. Макрофаги відіграють подвійну роль у рості пухлини та ангиогенезі. Асоційовані з пухлиною макрофаги сприяють її прогресії за допомогою секреції факторів росту замість генерації імунної відповіді на них. Також вони впливають на ендотеліальні клітини та сприяють неоваскуляризації пухлини.

Усі ці етапи, починаючи з ініціації пухлинного росту, метастазування і, нарешті, вторгнення в інші сайти, включають у себе залучення всіх п'ятих класів протеаз [4]. Ці ензими взаємодіють із різноманітними цільовими субстратами і регулюють безліч процесів, необхідних як для забезпечення життя клітини, так і для її загибелі у різних типах організмів [5], що сприяє еволюції [6].

## **1.2. Катепсини та їх роль у регуляції процесів проліферації у пухлинних клітинах**

Цистеїнові протеази ссавців утворюють широку групу протеолітичних ензимів, що характеризуються наявністю в активному сайті залишку цистеїну. Вони можуть локалізуватися у лізосомах (катепсини B, L, H і S) або цитозолі (кальпаїни) і секретуватися у деяких типах клітин за патологічних станів. Цистеїнові протеази опосередковують загальні функції, такі як внутрішньоклітинний катаболізм протеїнів, і спеціалізовані функції, наприклад, селективна активація сигнальних молекул (інтерлейкінів, енкефалінів, протеїнкази C) або позаклітинна деградація протеїнів (резорбція кістки, функції макрофагів) [7]. Була показана кореляція між активністю лізосомальних цистеїнових протеаз і пухлинною прогресією.

Катепсинові цистеїнпротеази можуть проявляти активність як і всередині клітини, так і у позаклітинному матриксі. Функції катепсинів регулюється шляхом встановлення рівноваги між їх ендogenousними інгібіторами та активацією їх неактивних форм. Катепсини можуть функціонувати як внутрішньоклітинно, так і позаклітинно, що протиставляє їх більшості інших протеаз, таким як металопротеази або серинові протеази. Позаклітинна активність катепсинів дозволяє пухлинним клітинам атакувати кровоносні та лімфатичні судини і метастазувати у віддалені тканини [8].

Катепсин В - перша лізосомальна протеаза, яка була пов'язана з утворенням злоякісних пухлин у тканинах молочної залози. Катепсин В бере участь у розчиненні і ремоделюванні сполучної тканини та базальної мембрани в процесі росту пухлини, інвазії і метастазування завдяки опосередкованій деградації позаклітинного матриксу [9]. Підвищення рівня катепсинів В і L у пухлинах або позаклітинних рідинах пов'язане із періодами протікання хвороби, тому є прогностичним фактором для виявлення онкохворих. Відомо, що експресія катепсинів D і В корелює з інвазивністю злоякісних пухлин. Катепсини В і L частіше надекспресуються при хронічній атрофічній виразці з дисплазією. Катепсин В також надлишково продукується в клітинах карциноми гортані.

Функції катепсинів можуть регулюватися ендogenousними інгібіторами цистеїнових протеаз у нормальних тканинах і клітинах, названими цистатінами. Цистатіни - це група сильних конкурентних інгібіторів для цистеїнових протеаз, таких як катепсини В, Н, і L. Було припущено, що цистеїнові інгібітори протеаз можуть відігравати важливу роль у розвитку пухлин, яка пов'язана зі змінами в протеолітичній системі. Показано, що цистатіни блокують інвазію та метастазування різних типів пухлинних клітин у експериментальних системах [10]. Цистатін С інгібує рухливість та інвазивність пухлинних клітин *in vitro*. В умовах запалення цистатін С у

крові або інших рідинах тіла інгібує цистеїнові протеази і тим самим запобігає пошкодженню тканин.

Підвищення рівня інших лізосомальних протеаз, таких як катепсини Н, L, або D спостерігається у багатьох видах злоякісних пухлин. Катепсин L2 (CTSL2) активується у пухлинних клітинах молочної залози, легень, шлунку, товстої кишки, меланоми та гліоми [11].

Аспарагінові протеази утворюють групу ензимів, які складаються із двох фрагментів, розділених щілиною, що містить каталітичний сайт із двох залишків аспартату. Катепсин D (CTSD) є аспарагіновою ендо-протеазою, яка повсюдно розподілена у лізосомах [12]. Протягом тривалого часу вважалося, що основною функцією CTSD була деградація протеїнів у лізосомах за кислого рН. Було показано, що катепсин D може також активувати попередники біологічно активних протеїнів у прелізосомальних компартментах спеціалізованих клітин.

Оскільки CTSD надекспресується в пухлинних епітеліальних клітинах молочної залози людини, його прийнято вважати маркером розвитку пухлинних клітин [13]. Катепсин D стимулює проліферацію пухлинних клітин, розростання фібробластів, ангіогенез і метастазування. Пряма роль CTSD у процесі метастазування була вперше продемонстрована на пухлинних клітинах щурів, у яких викликали надекспресію катепсину D, після якої клітини збільшували свій метастатичний потенціал. У цій моделі пухлинних клітин щура CTSD, відповідальний за стимуляцію метастазування, здійснював позитивний вплив на проліферацію клітин та на утворення мікрометастаз, а не на підвищення інвазивності.

Прокатепсин D секретується у пухлинних клітинах і може виступати в якості мітогену для пухлинних і стромальних клітин, стимулюючи їх про-інвазивні та про-метастатичні властивості. Рівень прокатепсину D / катепсину D являє собою незалежний прогностичний фактор для

різноманітних пухлинних захворювань і розглядається в якості потенційної мішені для протипухлинної терапії. Дослідження функцій катепсину D були ускладнені тим, що в клітинах існувало кілька подібних форм катепсину - прокатепсину. Стало очевидним, що ці форми можуть по-різному регулювати вищезазначені процеси. Інші дослідження також показали, що прокатепсин D секретується в пухлинних клітинах і впливає на безліч етапів прогресії пухлини, тому інгібування секреції прокатепсину D у пухлинних клітинах може пригнічувати їх ріст *in vitro* та *in vivo*. Це припускає можливість використання супресорів прокатепсину D у клінічній практиці [14].

Дослідження катепсинів та їх ролі у регуляції процесів проліферації у пухлинних клітинах є перспективним напрямом, так як дасть змогу більш детально вивчити з біохімічної точки зору їх вплив на проліферацію пухлинних клітин і виявити можливі підходи для пригнічення розвитку онкогенезу.

### **1.3. Протеази, що мають IGF-зв'язуючий домен і їх можлива роль у злоякісному рості**

HtrA (high temperature requirement A) є представником класу олігомерних серинових протеаз. HtrA була спочатку ідентифікована в *E.coli* двох фенотипів відповідних нульових мутантів. Мутанти або не росли при підвищених температурах (HtrA) [15], або не розщеплювали неправильно згорнуті протеїни у периплазмі (DegP) [16]. Людські гомологи, як вважають, беруть участь у розвитку артрити, клітинному рості, запрограмованій загибелі клітин (апоптозі) і старінні. Окрім цих фізіологічних впливів, HtrA є одним із факторів контролю правильного фолдингу протеїнів, який функціонує АТР-незалежним шляхом.

Бактеріальна HtrA є найбільш вивченим членом цієї родини і необхідна для виживання бактерій за підвищених температур [17]. Вона виступає в якості шаперона за нормальної температури, а при підвищених температурах – як протеаза [18, 19].

Було визначено чотири людські HtrA: HtrA1 [20, 21], HtrA2 [22, 23], HtrA3 [24, 25] і HtrA4 [26, 27]. Усі HtrA містять високо консервативний домен серинових протеаз і один PDZ-домен на С-кінці [28]. Вони беруть участь у розвитку запалення, ішемічних реперфузій, нейро-дегенеративних станів і нервово-м'язових розладів, а також захисті від стресових станів, включаючи тепловий шок [29].

HtrA протеази, особливо HtrA1 і HtrA3 залучені до процесу пригнічення росту ряду злоякісних пухлин, оскільки HtrA1 має IGF-зв'язуючий домен і може регулювати активність інсуліноподобних факторів росту шляхом розщеплення IGFБPs (протеїни, що зв'язують подібні до інсуліну фактори росту), інгібує сигнальні шляхи членів родини TGF- $\beta$  та NF- $\kappa$ B сигнального шляху, а тому вважається регулятором клітинної проліферації [30-32].

HtrA1 і HtrA3 використовують у якості інгібіторів процесу інвазії і пригніченні пухлин [33-35]. HtrA1 негативно регулюється в SV40 трансформованих фібробластах. Показано, що HtrA1 пригнічує розвиток меланоми лімфатичних вузлів, а також пухлинних клітин шлунку і яєчників [36-38].

HtrA2 є протеазою, яка позитивно регулюється у клітинах ссавців у відповідь на стрес клітин. Вона бере участь у апоптозі [39-41], процесі, який порушується за прогресії онкологічних захворювань, і, таким чином, може грати певну роль у розвитку злоякісності клітин.

HtrA3 спочатку була ідентифікована як серинова протеаза, пов'язана із розвитком вагітності [42]. Існують два варіанти HtrA3, які виникають завдяки



альтернативному сплайсингу мРНК (довгий (HtrA3-L) і короткий (HtrA3-S). HtrA3-S ідентична довгій формі за винятком того, що у ній відсутній термінальний PDZ домен.

HtrA3 ізоформи розпізнають різні субстрати і тому виконують різні функції. HtrA3 подібну амінокислотну послідовність і організацію домену із HtrA1, що дозволяє припустити аналогічність їх функцій. Рівень мРНК HtrA3 знижуються за розвитку пухлинних клітин яєчників і легенів людини [43, 44]. HtrA1 і HtrA3 ссавців мають схожу доменну організацію, включаючи N-кінцеву сигнальну послідовність, а також домен, що зв'язує подібні до інсуліну фактори росту (IGFBP) [45].

Роль HtrA4, недавно виявленого члена родини HtrA ссавців, у прогресії злоякісних пухлин поки що невідома, як і біохімічні характеристики, однак його висока гомологічність структури із HtrA1 припускає певну специфічність продукції цього протеїну у плаценті [46].

Серинова протеаза 23 (PRSS23, або SPUVE) - ензим, який був пов'язаний із пухлинною прогресією у різних типах онкологічних утворень. Вона кодується у хромосомі 11q14.1 в організмі людини [47-49]. Попередні дослідження дозволили припустити, що посилена експресія *PRSS23* спостерігається в пухлинних клітинах молочної залози [50-52], простати [53], щитовидної [54] та підшлункової залози [55], тому експресія *PRSS23* була пов'язана з прогресією пухлинних захворювань у людини. Крім того, дослідження MCF-7/BUS лінії клітин показали, що рівень мРНК *PRSS23* може підвищуватися естрогенами і знижуватися тамоксифеном [51, 56].

*PRSS23* коекспресується з естрогеновим рецептором  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), який є біомаркером і терапевтичної мішенню пухлинних клітин молочної залози людини. Дослідження *in vitro* лінії пухлинних клітин MCF-7 молочної залози показали, що експресія *PRSS23* індукується  $17\beta$ -естрадіол-активованим  $ER\alpha$  через взаємодію з промоторною ділянкою гена *PRSS23*, тому *PRSS23* може

бути ключовим компонентом естроген-опосередкованої проліферації пухлинних клітин молочної залози і перспективною терапевтичною мішенню для протипухлинних препаратів.

FAP, раніше відомий як F19 антиген клітинної поверхні - глікопротеїн, ідентифікований у 1986 році в культурі фібробластів із використанням моноклональних антитіл (MAb) F19 [57]. У 1994 році F19 антиген клітинної поверхні був перейменований на протеїн, що активує фібробласти (FAP - fibroblast activation protein) [58].

FAP є трансмембранним глікопротеїном II типу, що складається з 760 амінокислот. Ген людського FAP локалізований у хромосомі 2q23 і має подібну генну організацію й 89% ідентичних амінокислотних послідовностей із геном FAP миші, який також розташований на хромосомі 2 [59]. Мономер FAP має п'ять потенційних сайтів для N-глікозилювання, 13 залишків цистеїну, три сегменти, що відповідають високо консервативним каталітичним доменам серинових протеаз, гідрофобний трансмембранний сегмент і короткий цитоплазматичний хвіст із шести амінокислотних залишків [60]. Завдяки гомодимеризації утворюється димер, необхідний для забезпечення ензиматичної активності FAP [61].

Вважається, що FAP сприяє росту і проліферації пухлинних клітин. Роль FAP досліджувалася із використанням ліній пухлинних клітин молочної залози людини, які продукували FAP (MDA-MB-435 і MDA-MB-436) [62]. Пригнічення експресії *FAP* з використанням анти-смыслових олігонуклеотидів надало цим клітинам чутливість до відсутності сироватки, тоді як контрольні клітини з високим рівнем експресії *FAP* добре росли за відсутності сироватки. Таким чином, пухлинні клітини молочної залози з високими рівнями FAP менш залежні від екзогенних факторів. Відсутність контролю росту клітин є ключовою характеристикою злоякісних пухлин, що відрізняє їх від нормальних клітин.

Чен та інші [63] показали, що FAP збільшує інвазію, проліферацію та міграцію пухлинних клітин HO-8910PM яєчників.

Цікавим фактом є те, що була сконструйована ДНК-вакцина, спрямована проти FAP і значною мірою пригнічувала первинні пухлини і розвиток метастаз у легенях в основному через CD8+ Т-клітини [64]. Крім того, для лінії клітин HEK293, трансфікованої мишачим FAP, було показано 10-40-кратне збільшення росту пухлин у порівнянні з контрольними клітинами. При застосуванні анти-FAP антитіл відбувалося пригнічення ензиматичної активності FAP [65]. Ці дані вказують на те, що FAP впливає на ріст пухлинних клітин.

На противагу цьому, інші дослідження показують, що FAP також може здійснювати пригнічуючий вплив на пухлинні клітини, і що цей процес не залежить від його ензиматичної активності. Підвищена експресія *FAP* за онкогенних захворювань викликає різке підвищення або пригнічення росту пухлин залежно від моделі дослідження [66].

Було виявлено, що експресія *FAP*, або каталітичного мутанта *FAP*, знижувала рівень розвитку пухлинних клітин меланоми миші, відновлювала контактне гальмування і залежність від факторів росту [67]. Інші дослідження нормальних фібробластів і клітин карциноми HeLa визначили FAP як потенційний інгібітор онкогенезу, а також висловили гіпотезу, що FAP бере участь у пригніченні онкогенного фенотипу клітин [68]. Крім того, рівень експресії *FAP* у стромальних пухлинних клітинах молочної залози був пов'язаний із тривалістю життя пацієнтів [69].

Таким чином, існує явна невідповідність між функціями FAP у прогресуванні росту пухлин і його пригніченням. FAP виконує свої біологічні функції у клітині шляхом поєднання його протеазної активності і здатності утворювати комплекси з іншими молекулами. Проте, роль FAP у

рості пухлин та їх інвазії, а також точні молекулярні механізми, які відповідають за ці процеси, поки що залишаються в значній мірі невідомими.

Недавні дослідження виявили *дипептидилпептидазу 4 (DPP4) / CD26* як ген, який впливає на інвазивність багатьох пухлинних клітин [70-74], тому він асоціюється з онкогенезом. *DPP4* широко експресується в епітеліальних клітинах людини, мікросудинних ендотеліальних клітинах і клітинах сітківки. Вона виконує багато функцій: розщеплює фізіологічно важливі пептиди кровотоку, наприклад, деякі хемокіни, мітогенні чинники росту і гормони, у тому числі глюкагон-подібний пептид-1 (GLP-1) і глюкозо-залежний інсулінотропний поліпептид (GIP), зв'язує аденозиндезамінази і взаємодіє із позаклітинним матриксом.

CD26 може бути заякорений у клітинну мембрану, або в розчинній формі (sCD26). Клітинно-асоційований CD26 широко експресується на Т- і В-клітинах, ендотеліальних і епітеліальних клітинах. Різні види біологічної активності CD26 і його повсюдна експресія можуть відображати різноманітні функції, що він виконує, і які при цьому часом суперечать одна одній за фізіологічних і патологічних умов [75].

Було відмічено дефіцит розчиненого CD26 у гомогенатах пухлинних клітин товстої кишки, нирок, легень і печінки. І навпаки, експресія CD26 на клітинній поверхні корелює з агресивністю лімфоми Т і В клітин, лейкемією, карциномою щитовидної залози [76].

CD26 також був ідентифікований як сироватковий маркер для виявлення колоректальних пухлинних утворень [77-79], а також в якості прогностичного фактора, здатного сприяти метастазуванню пухлинних клітин [80]. Поки що існує невелика кількість досліджень, присвячених ролі CD26 в утворенні та розвитку пухлинних клітин шлунку, клітинах гліоми та інших типів онкологічних захворювань. Попереднє дослідження показало, що рівень експресії CD26 може вважатися надійним біомаркером для

виявлення злоякісних пухлин шлунку, який характеризується різними клінічними, генетичними і гістологічними ознаками [81], що вказує на перспективність даного напрямку досліджень.

Активність фактора транскрипції E2F1, індукованого EGF, підвищується DPP4, збільшуючи тим самим експресію гена *PIN1*. Крім того, DPP4 підсилює MEK/ERK і JNK/c-Jun сигнальні системи, індуковані EGF, і це активує AP-1 і трансформацію епітеліальних клітин. На противагу цьому, зниження рівня експресії *DPP4* або інгібування *DPP4* у клітинах лінії MCF7 пригнічує експресію *PIN1* через активність E2F1, викликану EGF, зменшуючи утворення колоній пухлинних клітин. У 4T1 моделі пухлинних клітин молочної залози надекспресія DPP4 прискорювала розвиток пухлин, у той час як лікування препаратом «Сітагліптіном» сповільнювало ріст та розвиток пухлин. Відповідно до цих спостережень, рівень DPP4 були позитивно корельовані з експресією *PIN1* у розвитку пухлинних клітин молочної залози людини. DPP4 сприяла EGF-індукованій епітеліальній трансформації клітин і утворенню пухлин молочних залоз через індукцію експресії *PIN1*. Це дозволяє припустити, що таргетування сітагліптіном DPP4 може бути перспективною стратегією лікування пухлинних клітин молочної залози [82].

#### **1.4. Роль специфічних до убіквітину протеаз у регуляції метаболізму та рості злоякісних пухлин**

Убіквітин є високо консервативним протеїном, який бере участь у регуляції внутрішньоклітинної деградації протеїнів, регуляції клітинного циклу, ремоделюванні хроматину, а також здійсненні реакції на клітинний стрес. Він вивільняється із деградованих протеїнів шляхом розбирання поліубіквітинових ланцюгів, що опосередковується убіквітин-специфічними

протеазами, роллю яких є деубіквітинування протеїнів [83-85]. Крім того, E3 убіквітинлігаза і деубіквітиназа відіграють важливу роль в онкогенезі [84,86-88].

Убіквітин-специфічна пептидаза 1 (USP1), а також USP7 відповідають за деубіквітинування моноубіквітинованого PCNA (proliferating cell nuclear antigen), який активує ДНК-полімерази і контролює оксидативний стрес-індукований мутагенез у клітинах людини [89]. Зниження рівня USP1 в пухлинних клітинах може відігравати важливу роль у прогресі пухлинних клітин легень, а також у рості гліобластоми [90,91]. Було показано, що фосфорилування серину має вирішальне значення для активації USP1 та його взаємодії з WD40-повтором протеїну UAF1, і що два сигнали ядерної локалізації в USP1 опосередковують ядерний імпорт комплексу USP1 / UAF1 [92,93].

USP4 є деубіквітинуючим ензимом із ключовою роллю в регуляції TP53 і TGF $\beta$ . Це позитивно регулює передачу сигналів WNT/ $\beta$ -катеніну, що свідчить про його важливість в онкогенезі [94-96].

Деубіквітинуючий ензим UPS10 пригнічує проліферацію і ріст пухлинних клітин за рахунок стабілізації протеїну p53 [97]. Крім того, мікроРНК-191 може знизити рівень USP10 і сприяти прогресуванню пухлинних клітин підшлункової залози [98].

USP10 деубіквітинує p53 і регулює MDM2-опосередкований ядерний транспорт p53. Виявлено знижені рівень USP10 у більшості карцином нирок і клітинних лініях без мутації p53. Проте, невелика частина карцином нирок із мутаціями p53 містить підвищені рівень USP10, що забезпечують онкогенну активність в культурах пухлинних клітин. USP10 стабілізує p53 як дикого, так і мутантного типу, і в цьому контексті може виступати в якості супресора росту пухлин [99]. USP10 також протидіє с-тус транскрипції через деубіквітинування SIRT6 [100].

USP22 бере участь у пухлинній прогресії, так як ця протеаза може регулювати клітинний цикл у багатьох типах пухлинних клітин [101,102]. Нещодавно було показано, що USP22 видаляє убіквітин із гістонів, регулюючи тим самим транскрипцію генів [103].

USP25 бере участь в ERAD (endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation) неправильно згорнутих протеїнів [104]. USP25 протидіє убіквітинуванню субстратів ERAD завдяки убіквітинлігазі HRD1, яка запобігає їх деградації у протеосомі.

У той же час, USP14 сприяє прогресії онкогенезу, регулюючи клітинну проліферацію і апоптоз пухлинних клітин печінки [105,106]. Також, фосфорилування і активація USP14 за допомогою Akt регулює убіквітин-протеосомну систему [107]. Таким чином, його інгібування може бути перспективним для створення нової терапевтичної стратегії [108].

USP11 був ідентифікований як протеїн, що взаємодіє з *BRCA2*, важливим геном-супресором пухлин [109-110]. Особи з мутаціями цього гена схильні до утворення карциноми молочної залози [111]. USP11 є фактором, який бере участь у репарації пошкоджень *BRCA2* [112]. При нокдауні USP11 у нормальних мишачих епітеліальних клітинах молочних залоз відзначено зниження TGF $\beta$ -індукованого епітеліально-мезенхімального переходу [113]. У хворих на карциному молочної залози із високим рівнем експресії *USP11* частіше трапляються рецидиви у порівнянні з пацієнтами, у яких низький рівень експресії USP11 [114].

Ген *USP32* локалізується у хромосомі 17q23, і його експресія зазвичай посилюється за карциноми молочної залози. Пригнічення експресії гену *USP32* призводить до зниження проліферації і міграції пухлинних клітин лінії MCF7. Високий рівень транскриптів *USP32* були також помічені в 50% (9 з 18) ліній пухлинних клітин молочної залози і 22% (9 з 41) первинних

пухлин молочної залози [115]. *USP32* було запропоновано використовувати в якості прогностичного гена пухлин молочної залози людини.

### **1.5. IRE1 сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, його роль у рості злоякісних пухлин**

Ендоплазматичний ретикулум впершу чергу характеризується як компартмент, в якому здійснюється дозрівання і збірка протеїнів, депонування вільного кальцію, а також він є місцем біосинтезу ліпідів і стеролів. Близько третини синтезованих протеїнів переміщується в ретикулум, де за допомогою ряду молекулярних шаперонів відбувається їх фолдинг. Котрансляційні та посттрансляційні модифікації, що включають формування дисульфідних містків та N-глікозилювання, відіграють важливу роль у згортанні та формуванні олігомерних комплексів. Ендоплазматичний ретикулум забезпечує чіткий контроль за фолдингом, тому лише правильно згорнуті протеїни можуть транспортуватись за межі ретикулума, тоді як незгорнуті та невірно згорнуті зберігаються в ендоплазматичному ретикулумі і піддаються деградації [116].

Реакція сенсорно-сигнальних шляхів ендоплазматичного ретикулума на накопичення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів називається «реакцією на незгорнуті протеїни» (unfolded protein response) і такий стан клітин отримав назву «стресу ендоплазматичного ретикулума».

Цей стрес розвивається за дії на клітини різноманітних чинників, у тому числі і гіпоксії, а також дефіциту чи надлишку глюкози, амінокислот, дії різних токсичних речовин внаслідок накопичення в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів. Для протидії накопиченню в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих протеїнів у клітинах еукаріот існує комплекс сенсорно-сигнальних шляхів від



ендоплазматичного ретикулума до цитоплазми і ядра. Причиною стресу ендоплазматичного ретикулума можуть бути також зміни в гомеостазі кальцію чи окисно-відновному потенціалі, посилений синтез секреторних протеїнів, експресія протеїнів із помилковою конформацією, а також зміни у глікозилуванні протеїнів.

Накопичені експериментальні дані свідчать, що відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного швидкого поділу та мають високу стійкість під час онкотерапії. Здебільшого дерегуляція гомеостазу ендоплазматичного ретикулума корелює з різними патологічними станами і з ростом злоякісних новоутворень, причому ці ефекти виявляються на різних рівнях, в тому числі на рівень посттрансляційної модифікації протеїнів ендоплазматичного ретикулума або шляхом порушення їх секреції [117].

Разом з тим, основним сенсорно-сигнальним шляхом реалізації ефектів стресу ендоплазматичного ретикулума на ріст злоякісних пухлин є IRE1, причому він дуже тісно пов'язаний також із гіпоксією та ішемією [118]. Це було чітко продемонстровано на клітинах гліоми, найагресивніших із відомих злоякісних пухлин із вираженим ангиогенезом та посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку [119]. Цей сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума є тісно пов'язаним не лише з гіпоксією та ішемією, а і з процесами проліферації та росту злоякісних пухлин. В експериментах на клітинах гліоми та аденокарциноми легені шляхом повної блокади функції сигнального ензиму IRE1 було виявлено різке пригнічення росту пухлин із таких клітин, як клітини ембріонів курчат, так і мозку мишей, за рахунок змін в експресії проангіогенних та антиангіогенних генів, пухлинних супресорів та циклінів і, відповідно, зниження інтенсивності процесів ангиогенезу та проліферації [120].

Отже, сенсорно-сигнальний шлях IRE1 контролює експресію великої групи генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулула, а також і від гіпоксії, і є важливим фактором росту злоякісних пухлин.

### **1.6. Молекулярні механізми контролю експресії генів сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулула**

Існує три основні сигнальні каскади стресу ендоплазматичного ретикулула, які розпочинаються з трьох первинних сенсорних протеїнів: IRE1 (inositol-requiring 1 alpha), який також має назву – IRE1 (endoplasmic reticulum – nuclei 1); PERK (RNA-activated protein kinase-like ER kinase); ATF6 (activating transcription factor 6), але IRE1 є найважливішою сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулула [121-125].

Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1 представлений біфункціональним трансмембранним ензимом, який має сенсорну частину, локалізовану в люмені ендоплазматичного ретикулула, трансмембранний домен та цитоплазматичну частину з активністю двох ензимів: серин/треонінової кінази і ендорибонуклеази.

За індукції стресу ендоплазматичного ретикулула активується кіназа, яка автофосфорилує IRE1, внаслідок чого відбувається його активація та димеризація в мембрані ендоплазматичного ретикулула, що призводить до активації ендорибонуклеази [125, 126]. Основна функція ендорибонуклеази IRE1 полягає у вирізанні короткого фрагмента з кодуєчої частини мРНК транскрипційного фактора XBP1 (протеїн-1, що зв'язується з X-боксом), з утворенням вкороченого альтернативного сплайс-варіанта мРНК XBP1 (XBP1s), який кодує синтез транскрипційного фактора, більшого за розміром і зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця, внаслідок зміни рамки зчитування.

Саме цей альтернативний сплайс-варіант транскрипційного фактора ХВР1 є відповідальним за регуляцію експресії сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також до деградації неправильно згорнутих протеїнів [126, 127]. Ці гени є відповідальними за синтез шаперонів, що контролюють процеси фолдингу протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі, пропроліферативних, проангіогенних, проапоптотичних та антиапоптотичних факторів, але існує досить складна і мало досліджена система контролю включення та виключення певних груп генів за різних форм стресу ендоплазматичного ретикулума.

Інша функція ендорибонуклеази IRE1 полягає у вибіркового розщепленні (деградації) певних мРНК в умовах стресу ендоплазматичного ретикулума, що, мабуть, є надзвичайно важливим у швидкому виключенні певних сигнальних шляхів, які можуть заважати виходу клітини із стану стресу [128].

Було встановлено, що пептиди, які утворюються з біфункціонального сигнального ензиму IRE1 в процесі його протеолізу мають здатність модулювати активність біфункціонального ензиму IRE1 і захищати клітини від стресу ендоплазматичного ретикулума [129, 130].

Доцільно відмітити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 не є ізольованим у клітині, він тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6), але всі ці шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума також контролюються низкою важливих протеїнкіназ та факторів.

Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума PERK представлений протеїнкіназою ендоплазматичного ретикулума, яка подібна до PRK-кінази (протеїнкінази, що активується дволанцюговою РНК; double stranded RNA-activated protein kinase). Це кіназа 3- $\alpha$ -субодиниці фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (eIF2 $\alpha$ k3; eukaryotic translation initiation factor 2- $\alpha$  kinase 3), що інактивує  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (eIF2 $\alpha$ ) шляхом її фосфорилювання, призводячи до

швидкого пригнічення ініціації трансляції і тотальної репресії біосинтезу протеїнів, а також зменшення їх надходження до ендоплазматичного ретикулула [131 – 133]. Одночасно PERK індукує синтез транскрипційного фактора ATF4 (активуючий транскрипційний фактор 4), який посилює експресію низки генів.

Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула ATF6 представлений трансмембранним попередником транскрипційного фактора ATF6, який за індукції стресу розщеплюється з утворенням не зв'язаної з мембраною ендоплазматичного ретикулула розчинної форми ATF6 [134]. Ця розчинна форма транскрипційного фактора ATF6 відповідає за регуляцію транскрипції низки залежних від стресу ендоплазматичного ретикулула генів, причому він може працювати як окремо, так і синергічно з іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулула [135]. Більше того, транскрипційний фактор ATF6 може брати участь у комплексній регуляції експресії генів, зокрема транскрипційними факторами NF- $\kappa$ B та YY1.

Виявлені сайти зв'язування транскрипційного фактора ATF6 на промоторах багатьох генів важливих транскрипційних факторів, у тому числі фактора регуляції транскрипції E2F3, який відіграє надзвичайно важливу роль у контролі клітинного циклу та дії пухлинних супресорів. Разом з тим, варто відмітити, що функціональне значення сенсорно-сигнального шляху ATF6 вивчено ще недостатньо у порівнянні із сигнальними шляхами PERK та IRE1.

### **1.7. Значення гіпоксії в рості злоякісних пухлин. Молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії**

Відомо, що гіпоксія істотно змінює характер метаболічних процесів у організмі, значно посилює інтенсивність гліколізу, що сприяє забезпеченню клітин організму енергією в умовах зниженого рівня кисню або

недостатнього його використання, а також є надзвичайно важливим фактором росту і прогресії злоякісних пухлин. Реакція клітин на недостатню кількість кисню має важливе значення для розуміння патологічних процесів, що відбуваються в організмі. Відомо, що за онкологічних захворювань істотно порушується тонкий баланс між потребою у кисні та його доставкою до клітин і що у трансформованих клітинах відбуваються певні зміни в метаболізмі, хоча повне розуміння цих змін, як і механізмів їх виникнення, залишається ще недостатньо з'ясованим [136-138].

Коли первинна пухлинна клітина починає інтенсивно ділитися, то значна маса клітин, які містяться в центрі такої мікропухлини, віддалена від капілярів, а відповідно і від кисню, і від багатьох речовин, потрібних для життєдіяльності клітин [139]. Таким чином створюються гіпоксичні умови, і клітини відповідають на гіпоксію активацією ключового транскрипційного фактора, який індукується гіпоксією (HIF) і який контролює експресію великої групи генів, що є необхідною передумовою забезпечення виживання трансформованих клітин і їхньої резистентності до лікування. І хоча вже відомо багато чинників, необхідних для забезпечення ефективного росту злоякісних пухли точна роль гіпоксії у рості пухлин залишається ще далеко не з'ясованою.

Транскрипційний комплекс HIF складається з однієї альфа-субодиниці (HIF- $\alpha$ ) та однієї бета-субодиниці (HIF- $\beta$ , яка має ще й іншу назву – ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). На даний момент відомим є лише один варіант субодиниці HIF- $\beta$ , а HIF- $\alpha$  субодиниця існує у кількох варіантах із різними біологічними властивостями (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ), що кодуються трьома різними генами, причому транскрипти першого і третього генів можуть утворювати по шість альтернативних сплайс-варіантів із різною структурою і функціональними властивостями [140–145].

За вивчення ефектів гіпоксії на експресію великого числа генів, залежних від функції сенсорно-сигнального шляху IRE1, було показано, що більшість клітин гліоми є залежними від гіпоксії і що величина ефекту

гіпоксії на їх експресію, а інколи і на спрямованість змін, здебільшого істотно залежать від функціональної активності IRE1 [146]. Так, за дослідження впливу гіпоксії на експресію генів у контрольних клітинах гліоми лінії U87 та клітинах гліоми із пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1 за гіпоксії було виявлено три різних варіанти змін в експресії генів. Це можна продемонструвати на прикладі генів *RBL1*, *E2F1* та *PFKL*. Типовим варіантом змін в експресії генів за гіпоксії є зміни одного спрямування в обох типах клітин гліоми, причому виключення функції гена *IRE1* зменшує ефект гіпоксії, що характерно, зокрема, для гена *RBL1*. Іншими варіантами гіпоксичної регуляції є наявність змін в експресії генів (як посилення, так і зменшення) лише в одному із варіантів клітин: у контрольних клітинах гліоми лінії U87 або лише у клітинах гліоми із пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1. Так, гіпоксія впливає на експресію гена *E2F1* лише в клітинах із виключеною функцією сигнального ензиму IRE1, а експресія гена *PFKL* – лише в контрольних клітинах гліоми. Варто зазначити, що різке збільшення експресії гена *PFKL*, ключового гена гліколізу, в контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії повністю узгоджується з агресивним характером росту гліом та залежністю інтенсивності їх росту від гіпоксії і гліколізу, причому виключення функції сигнального ензиму IRE1 повністю блокує ефекти гіпоксії на гліколіз [147].

За гіпоксії ініціюються багато різноманітних процесів, які значною мірою опосередковані індукцією чутливого до кисню транскрипційного фактора HIF [148, 149]. Більше того, експресія HIF не лише посилюється в умовах гіпоксії, а й є також підвищеною в різних злоякісних пухлинах людей і корелює з несприятливим прогнозом, а пригнічення експресії альфа-субодиниці цього транскрипційного фактора часто призводить до зниження інтенсивності росту різних злоякісних пухлин [150-154].

Гіпоксія є характерною рисою більшості злоякісних пухлин і тісно пов'язана не лише з ростом пухлин, а і з метастазуванням та резистентністю

до лікування [155-157]. Гіпоксія є одним із обов'язкових факторів злоякісного росту, оскільки виражено активує процеси проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу і пентозо-фосфатного циклу, через що пухлинні клітини характеризуються посиленням гліколізом та високим рівнем лактату і пірувату, що корелює зі збільшеним рівнем експресії ензимів гліколізу та переносників глюкози завдяки механізмам опосередкованих транскрипційним фактором HIF [158-161].

У зв'язку з тим, що пригнічення IRE1, сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, знижує інтенсивність проліферації клітин гліоми, то отримання результатів стосовно змін рівня експресії генів протеаз у клітинах гліоми за умов пригнічення функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 будуть вагомим внеском у розуміння механізмів опосередкованого IRE1 контролю росту злоякісних пухлин, зокрема гліом, та ідентифікації нових перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій протипухлинної терапії.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали

Досліди проводили на клітинах гліоми людини лінії U87, отриманих від компанії ATCC (American Type Culture Collection, США), які вирощували згідно рекомендацій фірми-виробника. В цій роботі використовувалися 2 сублінії цих клітин гліоми. Одна сублінія була отримана шляхом відбору трансфікованих клонів з надекспресією вектору pcDNA3.1+, який було використано для створення домінантно/негативної конструкції ензиму ERN1 (dnER1). Ця сублінія була використана як контроль-1. Друга сублінія мала пригнічені протеїназу та ендорибонуклеазну активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

Генетична карта плазмідного вектора pcDNA3.1, що використовувалася для створення dnER1, представлена на рис. 2.1.1.

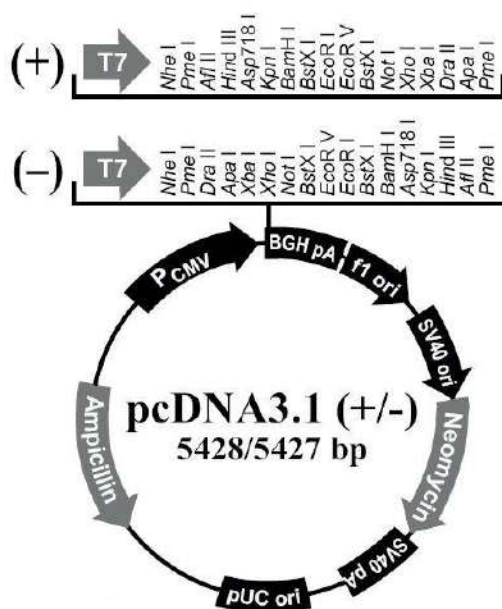


Рис. 2.1.1. Генетична карта плазмиди pcDNA3.1+, що була використана для створення домінантно/негативної конструкції ERN1 (dnER1).



## 2.2. Умови проведення експерименту

Клітини гліоми росли у середовищі DMEM з високою концентрацією глюкози (4.5 г/л), що містило додатково 2mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco) та стрептоміцин (0.1 мг/мл; Gibco) при 37°C в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub>. Культуральне середовище оновлювали кожні 2-3 доби. В даній роботі було використано такі сублінії клітин гліоми: 1) контрольні клітини гліоми, що були стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1, та 2) клітини з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 домінант-негативною конструкцією dnIRE1, що не мала кіназного та ендорибонуклеазного доменів IRE1.

Перша сублінія клітин гліоми була отримана шляхом селекції стабільно трансфікованих клонів з експресією евкаріотичного вектора pcDNA3.1, який був використаний для створення домінантно-негативної конструкції dnIRE1. Друга сублінія клітин гліоми (клон 1C5) була отримана шляхом селекції стабільно трансфікованих клонів з надекспресією dnIRE1, з пригніченням протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей сигнального ензиму IRE1 стресу ендоплазматичного ретикулума.

Виключення функції сигнального ензиму IRE1 було досягнуто за допомогою технології домінант-негативних кДНК-конструкцій, якими проводили трансфекцію клітин з подальшою селекцією клонів. На рис. 2.2.1 приведено схематичне зображення структури комплементарної ДНК IRE1 та її варіантів без обох ензиматичних активностей (протеїнкінази та ендорибонуклеази) та з мутацією в ендорибонуклеазному домені.

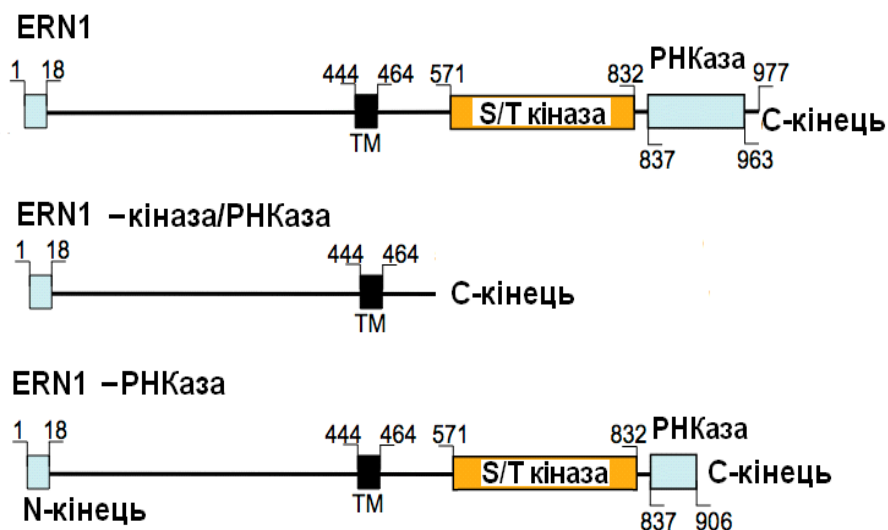


Рис. 2.2.1. Схематичне зображення структури комплементарної ДНК IRE1 (IRE1) та її змінених варіантів: без обох ензиматичних активностей (IRE1 –кіназа/RNКаза) та з мутацією в ендорибонуклеазному домені (IRE1 –RNКаза) конструкцій IRE1. Цифрами позначені амінокислотні залишки в послідовності IRE1. На схемі позначені N-кінцева частина (N-кінець), трансмембранна частина (TM), ділянки серин/треонінової кіназної активності (S/T кіназа) та ендорибонуклеазної активності (RNКаза), а також С-кінцева частина (С-кінець) [162].

Пригнічення функції ензиму IRE1 було оцінено раніше за рівнем фосфорилування IRE1 та утворення альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулума (рис. 2.2.2) [162].

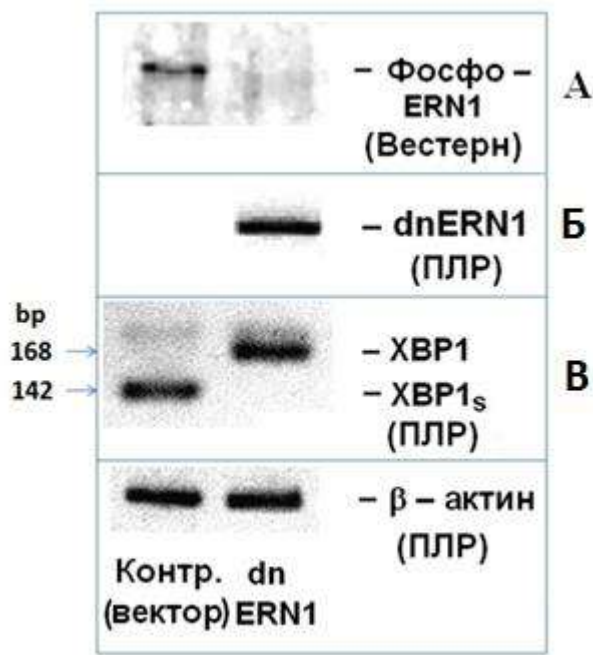


Рис. 2.2.2. Вплив тунікаміцину (0,01 мг / мл - 2 години) на: А - рівень фосфорильованої форми IRE1

(Фосфо-IRE1) за даними вестерн-блот аналізу; Б - рівень експресії мРНК домінант-негативної конструкції IRE1 (dnIRE1) мРНК транскрипційного фактора XBP1; В - рівень експресії мРНК транскрипційного фактора XBP1 та його альтернативного сплайс-варіанта (XBP1s) за даними полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в клітинах гліоми U87, стабільно трансфікованих вектором (контроль) і конструкцією dnIRE1 [162].

Наведені дані вказують на те, що в контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1, тунікаміцин збільшує рівень як фосфорильованої за серином 724 форми IRE1, так і альтернативного сплайс-варіанта мРНК XBP1, що кодує синтез ключового транскрипційного фактора сигналіngu IRE1 за стресу ендоплазматичного ретикулула. В той же час, у клітинах гліоми, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією IRE1, ефект тунікаміцину не виявляється, що переконливо свідчить про відсутність у цих клітинах функціонально активної форми сигнального ензиму IRE1.

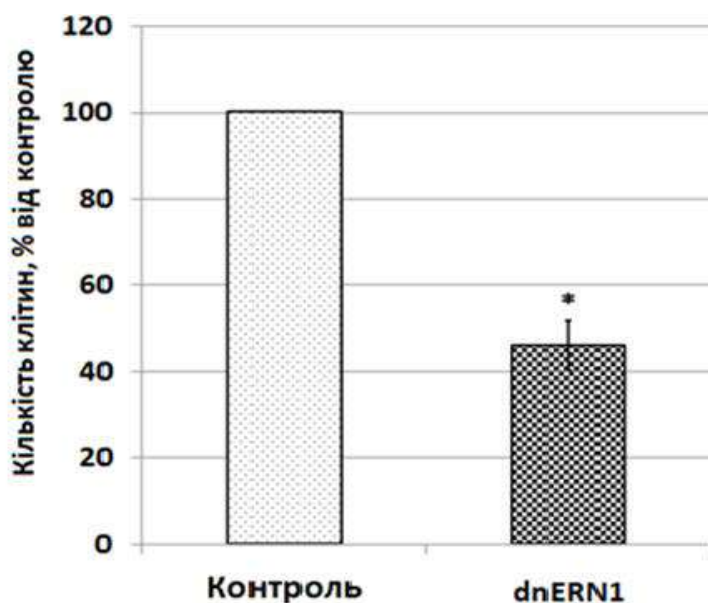


Рис. 2.2.3. Ріст клітин гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (контроль) та сублінії цих клітин з пригніченою функцією IRE1 (як кінази, так і ендорибонуклеази) [163].

Крім того, було продемонстровано, що швидкість проліферації клітин гліоми без функціонально активного IRE1 (з пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази) знижується більш, ніж у два рази (рис. 2.2.3). Дані результати свідчать про вагомую роль IRE1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума у рості злоякісних пухлин, в тому числі і гліом.

У досліджах з гіпоксією клітини поміщали у спеціальну камеру з 3% кисню, 5% діоксиду карбону та 92% азоту на 16 годин. Дефіцит глюкози та глутаміну створювали шляхом заміни середовища на таке, в якому була відсутня глюкоза або глутамін (Gibco, США) і витримували протягом 16 годин.

### 2.3. Методи досліджень

У роботі використовували метод виділення РНК з клітин гліоми за допомогою Trisol реагенту, виділення плазмідних ДНК,

спектрофотометричні методи визначення кількості РНК та ДНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, зворотна транскрипція РНК, полімеразна ланцюгова реакція (у тому числі і полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі), вестерн блот аналіз, синтез анти-сенсової РНК, метод заснований на захисті РНК-РНК гібридів від рибонуклеази Т1 та комп'ютерна обробка отриманих даних, а також статистичний аналіз отриманих результатів.

### **2.3.1. Виділення РНК**

Тотальну РНК з клітин виділяли за допомогою реагенту Trizol, який містить ізотіоціанат гуанідину, буфер та фенол (Invitrogen, США), згідно з протоколом виробника. Для цього клітини, що виростили в культуральній чашці, спочатку промивали забуференим фізіологічним розчином. Для лізису клітин до чашки з клітинами додавали 1 мл реагенту Trizol і витримували протягом 5 хвилини при 4°C. Після цього лізат клітин переносили до центрифужних пробірок і додавали до нього по 0,2 мл хлороформу, перемішували і інкубували зразки при 4°C протягом 5 хвилин. Отриману суміш центрифугували при 12000 g і температурі 4°C протягом 10 хвилин. Верхню водну фазу, що містила РНК, відбирали та переносили в нові мікропробірки. Осаджували РНК рівним об'ємом ізопропанолу. Зразки інкубували 10 хвилин при 4°C і центрифугували протягом 20 хвилин при 16000 g і температурі 4°C. Супернатант зливали, а осад РНК промивали двічі 75 % етанолом і розчиняли у стерильній воді, що не містить домішок рибонуклеаз. Після цього для видалення можливих залишків фенолу РНК переосаджували етанолом у присутності 0,2 М ацетату натрію, центрифугували, осад промивали 75 % етанолом і розчиняли у стерильній воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм, а їх чистоту оцінювали по співвідношенню A260/A280, яке

було більше двох. Чистоту і стабільність препаратів РНК із клітин гліоми перевіряли також електрофорезом в агарозному гелі.

### **2.3.2. Електрофорез в агарозному гелі**

Для електрофоретичного розділення ампліфікованих продуктів ПЛР використовували 2 % агарозний гель в Tris-ацетат-ЕДТА буфері ТАЕ (0,14 М Tris-HCl; 20 мМ оцтова кислота, 2 мМ ЕДТА (рН 8,0)). Агарозу розчиняли при нагріванні до 100°C, розчин охолоджували до 50°C і заливали в камеру для електрофорезу. Агарозний гель формувався протягом 30–40 хв. при кімнатній температурі. Зразки ДНК змішували з буфером для фарбування і вносили в лунки гелю по 5-10 мкл. Електрофорез проводили в буфері ТАЕ при градієнті напруги 5 В/см протягом 60 хв. Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували 100х-ДНК-маркер (Fermentas, США). Після проходження електрофорезу гель фарбували 30 хв. в розчині фарби 5x Sight DNA Stain EUROMEDEX (Франція).

Гелі документували за допомогою цифрової фотокамери в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм. Денситометричний аналіз продуктів ПЛР проводили за допомогою програми TotalLab.

### **2.3.3. Отримання кДНК методом зворотної транскрипції**

Зворотну транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію проводили як описано [162]. Для зворотної транскрипції використовували тотальну РНК, виділену із клітин гліоми. В реакційну суміш, загальним об'ємом 20 мкл, вносили 0,5 мкг тотальної РНК, 5 нмоль (oligo dT<sub>15</sub>)-праймера, 4 мкл 5 х буфера, 1 мкл 100 мМ ДТТ, 10 мкмоль суміші всіх чотирьох dNTPs, 0,5 мкл інгібітору РНКаз (40 од./мкл), 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus M-MuLV з активністю 200 од./мкл, отриманої із фірми Fermentas (Франція). Денатурацію РНК проводили при

+65<sup>0</sup>C протягом 5 хвилин одразу після додавання (oligo dT<sub>15</sub>)-праймера, охолоджували і після цього добавляли інші компоненти реакційної суміші. Синтез проводили при +42<sup>0</sup>C протягом однієї години. Реакцію зупиняли шляхом інкубації при 70<sup>0</sup>C протягом 5 хвилин, охолоджували і використовували або зберігали при -20<sup>0</sup>C. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції брали в реакцію 1 мкл синтезованої кДНК (реакційної суміші).

Зворотну транскрипцію РНК проводили також за допомогою набору „QuantiTect Reverse Transcription” (QIAGEN, Німеччина) відповідно протоколу виробника, який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короткочасно (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<sup>0</sup>C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95<sup>0</sup>C протягом 3 хвилин і отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

#### **2.3.4. Вивчення експресії мРНК методом полімеразної ланцюгової реакції**

Для ампліфікацію кДНК *XBP1* брали 1 мкл продукту реакції зворотної транскрипції (кДНК), 10 мкл двократної реакційної суміші для ПЛР HotStartTaq Master Mix (Qiagen, Німеччина), 2 мкл суміші прямого та зворотного праймерів та доводили об'єм суміші водою вільною від рибонуклеаз до 20 мкл. Реакцію проводили в “MasterCycler Personal” (Eppendorf, Німеччина) з наступними параметрами:

Крок 1 - + 95<sup>0</sup>C, 10 хв.;

Крок 2 (денатурація) - + 94<sup>0</sup>C, 30 сек.;

Крок 3 (асоціація праймерів) - + 55 – 60°C, 30 сек.;

Крок 4 (синтез) - + 72°C, 30 сек.

Кількість циклів ампліфікацію для кожного з досліджуваних генів – 35.

На заключному етапі проводили інкубацію при 72°C протягом 5 хвилин для повного завершення синтезу всіх ланцюгів і зупиняли реакцію, охолоджуючи до 4°C.

Для визначення рівня експресії мРНК альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 ампліфікацію проводили з такими праймерами: прямий – 5'-GGAGTTAAGACAGCGCTTGG-3' і зворотний – 5'-TCACCCCTCCAGAACATCTC-3' (Sigma, США). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 441 – 460 та 608 – 589 у молекулі мРНК ХВР1 (GenBank NM\_005080). Розмір ампліфікованих фрагментів ХВР1 - 168 пар нуклеотидів для основного варіанту ХВР1, а для альтернативного сплайс-варіанту ХВР1 – 142 пари нуклеотидних залишків.

### **2.3.5. Вивчення експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі**

Для проведення ПЛР в реальному часі брали 2 мкл кДНК, 10 мкл SYBRGreen, 0,8 мкл суміші прямого та зворотного праймерів (з концентрацією по 10 мкМ кожного) та доводили об'єм суміші водою, що не містила рибонуклеаз, до 20 мкл. Реакцію проводили в “Mx 3000P QPCR” компанії Stratagene (США) або в “QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems, США).

Для ампліфікації кДНК USP1 використовували специфічні для цього гена праймери: прямий (5'– CAGCATGATGCACAGGAAGT –3') та зворотний (5'– CCCATTTCCSTTTTGGGAGTT –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1347–1366 та 1565–1546 кДНК USP1 гена людини (GenBank номер NM\_003368).



Ампліфікацію кДНК USP4 здійснювали використовуючи прямий праймер (5'– СТТАТТGACAGCCGGTGGTT –3') та зворотний праймер (5'– GTTTATTCCACGCCTCGGTA –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 185–204 та 389–370 кДНК USP4 гена людини (GenBank номер NM\_003363).

Для ампліфікації кДНК USP10 були використані такі праймери: прямий (5'– CAGGAAATCCAAGGTCAGGA –3') та зворотний (5'– AGCCTGCCTCATCTTCTTCA –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1216–1235 та 1434–1415 кДНК USP10 гена людини (GenBank номер NM\_001272075).

Ампліфікацію кДНК USP14 для кількісного ПЛР аналізу здійснювали за допомогою такої пари олігонуклеотидних праймерів: прямий (5'– CGTTCTGTGCCTGAACTCAA –3') та зворотний (5'– TTCACSTTTCTCGGCAAACCT –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 586–605 та 789–770 кДНК USP14 гена людини (GenBank номер NM\_005151).

Ампліфікацію кДНК USP22 здійснювали використовуючи прямий праймер (5'– TGGAAATAATCGCCAAGGAG –3') та зворотний праймер (5'– GAAGAAGTCCCGCAGAAGTG –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 575–594 та 816–797 кДНК USP22 гена людини (GenBank номер NM\_015276).

Для ампліфікації кДНК USP25 були використані такі праймери: прямий (5'– GGCACATAACGGAGGAAGAA –3') та зворотний (5'– AGCTTGGCCTTCGTGAACTA –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1982–2001 та 2178–2159 кДНК USP25 гена людини (GenBank номер NM\_001283041).

Ампліфікацію кДНК CTSA здійснювали використовуючи прямий праймер (5'– CAGCTGCTTCCACCTACCTC –3') та зворотний (5'– CTTCTGGTTGAGGGAATCCA–3'). Нуклеотидні послідовності даних

праймерів відповідають послідовностям 1432–1451 та 1682–1663 кДНК CTSA гена людини (GenBank номер NM\_000308).

Для ампліфікації кДНК CTSB були використані такі праймери: прямий (5'– CAAGCCACCCAGAGAGTTA–3') та зворотний (5'– TAGAGGCCACCAGAAACCAG–3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 360–379 та 680–661 кДНК CTSB гена людини (GenBank номер NM\_001908).

Ампліфікацію кДНК CTSC для кількісного ПЛР аналізу здійснювали за допомогою такої пари олігонуклеотидних праймерів: прямий (5'– TCAGACCCCAATCCTAAGCC–3') та зворотний (5'– GCATGGAGAATCAGTGCCTG–3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 949–968 та 1108–1089 кДНК CTSC гена людини (GenBank номер NM\_001814).

Для ампліфікації кДНК CTSD були використані такі праймери: прямий (5'–CAAGTTCGATGGCATCCTGG–3') та зворотний (5'– CGGGTGACATTCAGGTAGGA–3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 712–731 та 930–911 кДНК CTSD гена людини (GenBank номер NM\_001909).

Ампліфікацію кДНК CTSF здійснювали використовуючи прямий (5'– AGGAGCTCTTGGACTGTGAC–3') та зворотний (5'– TAGACCTTGGCCTTCTCTGC–3') праймери. Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1052–1071 та 1217–1198 кДНК CTSF гена людини (GenBank номер NM\_003793).

Для ампліфікації кДНК CTSK були використані такі праймери: прямий (5'–GCTCAAGGTTCTGCTGCTAC—3') та зворотний (5'– TCTTCACTGGTCATGTCCCC—3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 238–257 та 483–464 кДНК CTSK гена людини (GenBank номер NM\_000396).

Ампліфікацію кДНК CTSL здійснювали використовуючи прямий (5'– ACAGCTTCASCAATGGCCATG–3') та зворотний (5'–

AAGCCCAACAAGAACCACAC–3’) праймери. Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 562 – 581 та 717 – 698 кДНК CTSL гена людини (GenBank номер NM\_001912).

Для ампліфікації кДНК CTSO були використані такі праймери: прямий (5’–ATTATGGCTGCAATGGAGGC–3’) та зворотний (5’–GGGCCAAAGGTAAGAAGTGC–3’). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 549–568 та 768–749 кДНК CTSO гена людини (GenBank номер NM\_001334).

Ампліфікацію кДНК CTSS для кількісного ПЛР аналізу здійснювали за допомогою такої пари олігонуклеотидних праймерів: прямий (5’–AACAAGGGCATCGACTCAGA–3’) та зворотний (5’–AAGAAAGAAGGATGACGCGC–3’). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 844–863 та 468–449 кДНК CTSS гена людини (GenBank номер NM\_004079).

Для ампліфікації кДНК STC2 були використані такі праймери: прямий (5’–GTTTCATGACCCTGGCTTTGG–3’) та зворотний (5’–GCGTGGGCCTTACATTTCAA–3’). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1334–1353 та 1648–1629 кДНК STC2 гена людини (GenBank номер NM\_003714).

Ампліфікацію кДНК HTRA1 здійснювали використовуючи прямий (5’–TGGAATCTCCTTTGCAATCC–3’) та зворотний (5’–ACGCTCCTGAGATCACGTCT–3’) праймери. Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1175 – 1194 та 1365 – 1346 кДНК HTRA1 гена людини (GenBank номер NM\_002775).

Для ампліфікації кДНК PRSS23/SPUVE (protease, serine, 23/serine protease, umbilical endothelium) були використані такі праймери: прямий (5’–GCCCCAGTCTACCCTCAATT –3’) та зворотний (5’–TGAGGATGTAGATGCCACC –3’). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 548–567 та 744–725 кДНК PRSS23/SPUVE гена людини (GenBank номер NM\_007173).

Ампліфікацію кДНК FAP (fibroblast activation protein, alpha) здійснювали використовуючи прямий (5'– TACGTTTCATCACTGGCCCT – 3') та зворотний (5'– CATCTGCTGTTCCGTGGATG –3') праймери. Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 2090–2109 та 2315–2296 кДНК FAP гена людини (GenBank номер NM\_004460).

Для ампліфікації кДНК DPP4 (dipeptidyl peptidase 4) були використані такі праймери: прямий (5'– TGGTCACCAGTGGGTCATAA –3') та зворотний (5'– CTCCTGCSTTTGGATATGGA –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 1030–1049 та 1342–11323 кДНК DPP4 гена людини (GenBank номер NM\_001935).

Ампліфікацію кДНК АСТВ ( $\beta$ -актину) проводили за допомогою таких праймерів: прямий (5'– GGAСТTCGAGCAAGAGATGG –3') та зворотний праймер (5'– AGCAСТGTGTTGGCGTACAG –3'). Нуклеотидні послідовності даних праймерів відповідають послідовностям 747 – 766 та 980 – 961 кДНК АСТВ гена людини (GenBank номер NM\_001101).

Праймери для всіх генів отримані від компанії Sigma-Aldrich (США).

Відносну кількість транскриптів розраховували по кількості транскриптів бета-актину. Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три – п'ять незалежно виділених препарати РНК у трьох повторях.

Для визначення оптимальної кількості кДНК, необхідної для проведення ПЛР, здійснювали серію розведень. Максимальна концентрація кДНК в контролі забезпечувала досягнення порогового циклу С(Т), в діапазоні 24-26 циклів, а мінімальна концентрація забезпечувала дещо більший С(Т) ніж у експериментальних зразків. Оптимальна концентрація кДНК у контролі забезпечувала С(Т) в районі 22 - 25 циклів. Результати було проаналізовано завдяки інтегрованому програмному забезпеченню системи "Mx 3000P QPCR" та отримано величини С(Т) для кожного сигналу.

Специфічність ампліфікацію визначали за допомогою аналізу кривих плавлення ПЛР продуктів. Криві плавлення аналізували в діапазоні температур 55 – 94°C (від температури гібридизації праймерів до повної денатурації ДНК). На кривих плавлення спостерігався 1 пік флуоресценції, що відповідав плавленню специфічного продукту. Здебільшого, пік флуоресценції знаходився в діапазоні від 80 до 90°C.

Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential expression calculator” а статистичний аналіз – в програмі Excel.

### **2.3.6. Вестерн блот-аналіз протеїнів**

Вестерн блот-аналіз проводили використовуючи ядерні та цитозольні екстракти з клітин гліоми, які отримували як описано [162]. Для цього клітини гомогенізували у холодному буфері А (10 мМ HEPES-KOH pH 7.9, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ KCl, 0,5 мМ дитіотриітол, 0,5 мМ фенілметилсульфоніл флуорид, 1 мМ бензамідин, 1 мг/л лейпептин, 1 мг/л пепстатин, 0.5 % NP-40). Гомогенат залишали на льоду протягом 10 хвилин, ресуспендували та центрифугували 15 секунд. Супернатант (цитозольний екстракт) переносили у нові мікропробірки використовували для проведення вестерн блот-аналізу.

Для отримання ядерного екстракту, до осаду додавали холодний ізоляційний буфер, що містив 20 мМ HEPES-KOH pH 7.9, 25 % гліцерилу, 420 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ EDTA і 0,5 мМ дитіотрейтолу, та витримували на льоду протягом 20 хвилин для екстракції регуляторних протеїнів. Залишки клітинних структур видаляли центрифугуванням при 4°C протягом 2 хвилин, а супернатант відбирали у нові мікропробірки.

Отримані ядерні та цитозольні екстракти з двох субліній клітин гліоми лінії U87 денатурували у буфері з додецилсульфатом натрію і дітіотрейтолом та розділяли за допомогою електрофорезу у 12,5 % поліакриламідному гелі з

використанням Tris-гліцинового буферу (TGB). Окрім екстрактів клітин гліоми в окрему лунку також вносили протеїновий маркер (Fermentas, США). Для дослідження протеїнів групи USP використовували цитозольні екстракти, тоді як для HIF1 $\alpha$  протеїну – ядерні.

Продукт електрофорезу переносили на PVDF мембрану завдяки напів-сухому електротрансферному апараті у трансфер-буфері (Tris 47,9 мМ, гліцин 38,6 мМ, метанол 10 %) протягом 45 хвилин при 40 мА. Потім проводили блокування (забивку) PVDF мембрани у PBST буфері (1x PBS, 0,1%) за допомогою 5 % сухого знежиреного молока протягом 1 години при кімнатній температурі. Після блокування, проводили інкубацію з первинними поліклональними антитілами до USP1 (ab108104), USP14 (ab137432), HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals, США) та бета-актину (Santa-Cruz, США), що додавали у НВ буфер (1x PBS, 0,05% Tween20) з 5% сухого знежиреного молока у співвідношеннях 1:500, 1:500, 1:500, 1:2000, 1:5000. PVDF мембрани інкубували з антитілами при 4<sup>0</sup>С протягом 2 годин. Потім мембрану знову промивали у TBST буфері та ставили на інкубацію з вторинними анти-козячими та анти-кролячими антитілами протягом 1 години у НВ буфер з 5% сухого знежиреного молока у співвідношенні 1:5000. Вторинні антитіла були кон'югованими з пероксидазою хрому (Santa-Cruz, США).

Після другої інкубації мембрану промивали у PBST буфері і ідентифікували зв'язані з антитілами протеїни застосовуючи ECL-реактиви (Розчин А: 68 мМ кумарова кислота розчинена в DMSO, Розчин Б: 1,25 мМ Люмінол в 0,1 М Tris-HCl рН 8,5 та 50 мкл розчину 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Результат реєстрували на рентгенівській плівці відповідно до протоколу.

### **2.3.7. Статистична обробка результатів**

Досліди повторювали три - п'ять разів для кожного із досліджених генів як описано [162]. Аналіз результатів дослідження експресії генів

протеаз методом ПЛР виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «Differential expression calculator», а для статистичного аналізу використовували двовибірковий *t*-тест для середнього, обчислення проводили в програмному пакеті Excel (Гланц С., 1998). Результати виражали як  $M \pm m$ . Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Експресія генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* у клітинах гліоми із пригніченою функцією ензиму IRE1

У даній роботі було використано дві лінії клітин гліоми U87: одна була трансфікована вектором pcDNA3.1 і виступала як контроль, а інша – містила домінант-негативну конструкцію ензиму IRE1 (dnIRE1). Для того, щоб дослідити зміну рівня експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* за умов пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 ми виміряли рівень експресії їх мРНК у клітинах гліоми лінії U87, що містили конструкцію dnIRE1 та порівняли їх із контролем.

Показано, що пригнічення функцій IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до позитивної регуляції експресії генів *USP1* та *USP4* (+70 % і +59 %, відповідно), а для гена *USP10* виявлено збільшення рівня експресії на 31 %. Крім того, підвищення рівня експресії продемонстровано також для генів *USP22* і *USP25* (+34 % і +73 %, відповідно). У той же час, експресія гена *USP14*, який кодує ензим із протеазною і трансглюкозилазною активністю, знизилася на 32 % у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1 (рис. 3.1.1).



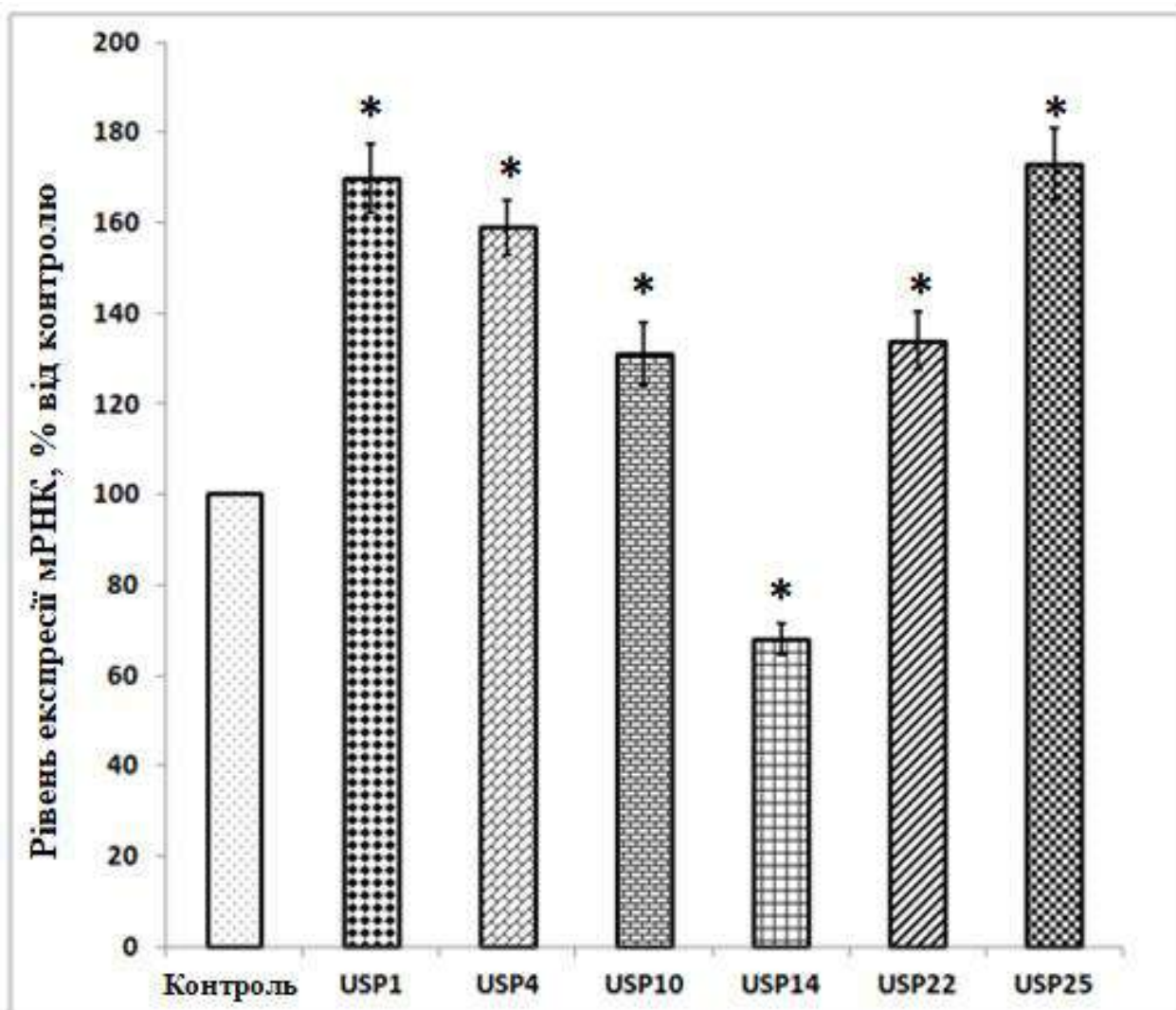


Рис. 3.1.1. Рівень експресії генів *USP1*, *USP4* і *USP10*, *USP14*, *USP22* і *USP25* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та субклініях клітин, що містили домінант-негативну конструкцію ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і виражали у відсотках від контролю (100%);  $n = 4$ , \* –  $P < 0,05$  при порівнянні з контролем.

Після цього ми досліджували рівень продукції протеїнів USP1 та USP14. Встановлено, що рівень продукції протеїну USP1 у цитозольній

фракції клітин гліоми з пригніченими функціями IRE1 підвищився, але для USP14 рівень продукції протеїну за цих експериментальних умов знизився, причому виявлені зміни рівня продукції обох протеїнів (USP1 та USP14) узгоджуються зі змінами в експресії мРНК, що кодують їх синтез (рис. 3.1.2).

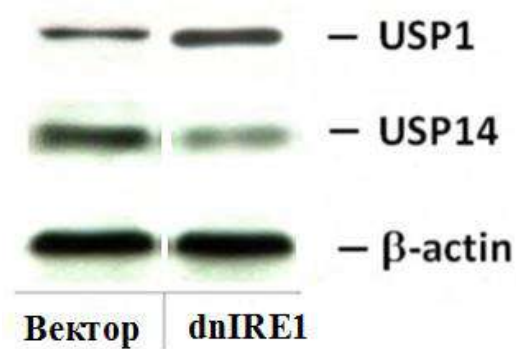


Рис. 3.1.2. Рівень протеїнів USP1 та USP14 у цитозольній фракції клітин гліоми із пригніченими функціями IRE1 (dnIRE1). В якості контролю використовували  $\beta$ -актин ( $\beta$ -actin).

### 3.2. Експресія генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* та *STC2* у клітинах гліоми із пригніченою функцією ензиму IRE1

Ми вивчали, як впливатиме пригнічення функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 на рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* та *STC2* у клітинах гліоми лінії U87. Для цього нами було визначено рівень експресії мРНК цих генів за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченими ензиматичними активностями IRE1.

Дослідження показали, що вимкнення обох ензиматичних функцій гена IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до значної позитивної регуляції експресії мРНК *CTSA* та *CTSB* (+110% і +60%, відповідно), а також *CTSD*

(+105%). Крім того, для генів *CTSF* і *CTSO* рівень експресії також підвищився (+135% і +85%, відповідно) (рис. 3.2.1).

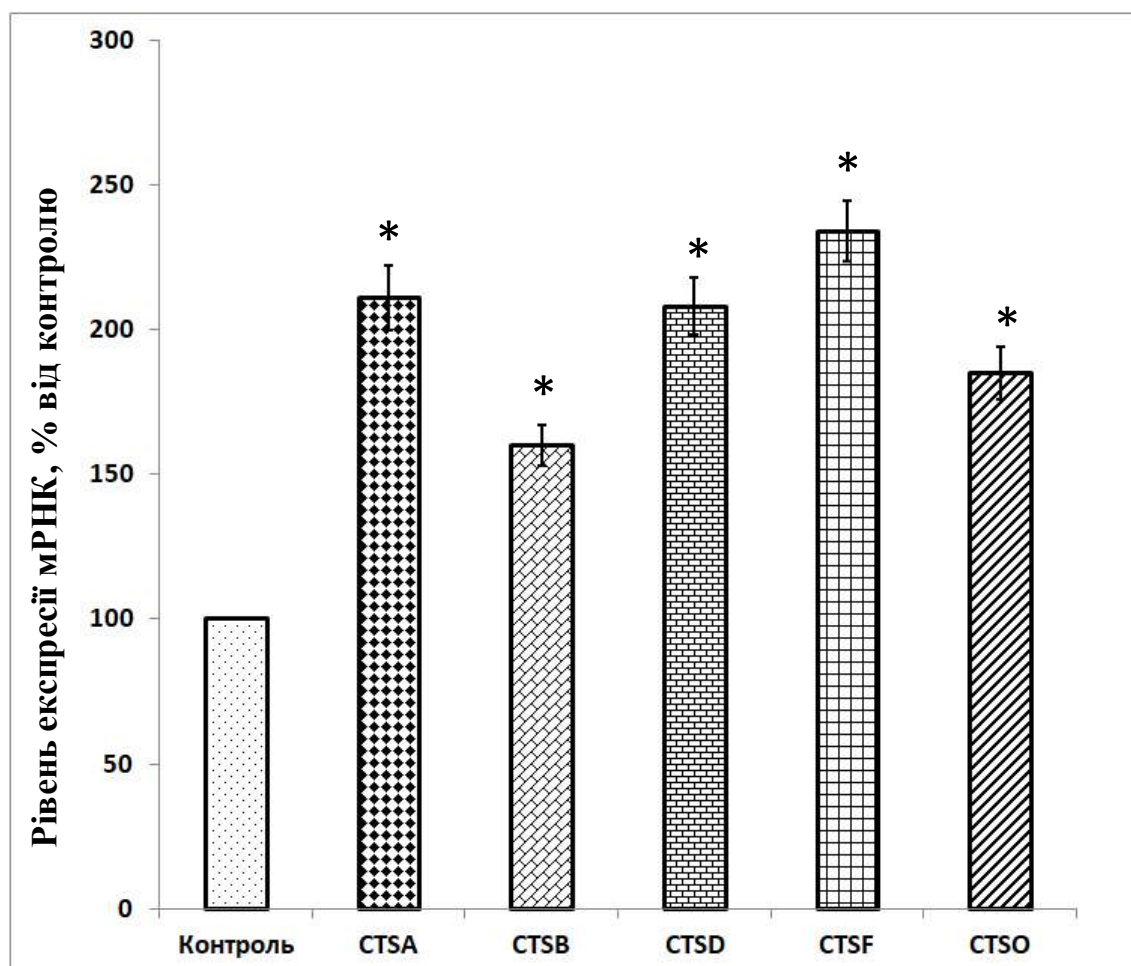


Рис. 3.2.1. Рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF* і *CTSO* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та сублініях клітин, що містили доміант-негативну конструкцію ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і виражали у відсотках від контролю (100%);  $n = 4$ ; \* –  $P < 0,05$  при порівнянні з контролем.

Також ми досліджували зміну рівня експресії генів *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS* за умов пригнічення функцій ензиму IRE1 у клітинах гліоми. Отримані дані свідчать про те, що рівень експресії мРНК досліджуваних

генів у значній мірі знизився, і це вказує на негативну регуляцію їх експресії внаслідок інгібування функцій IRE1 (-65%, -17%, -66% і -94%, відповідно) (рис. 3.2.2).

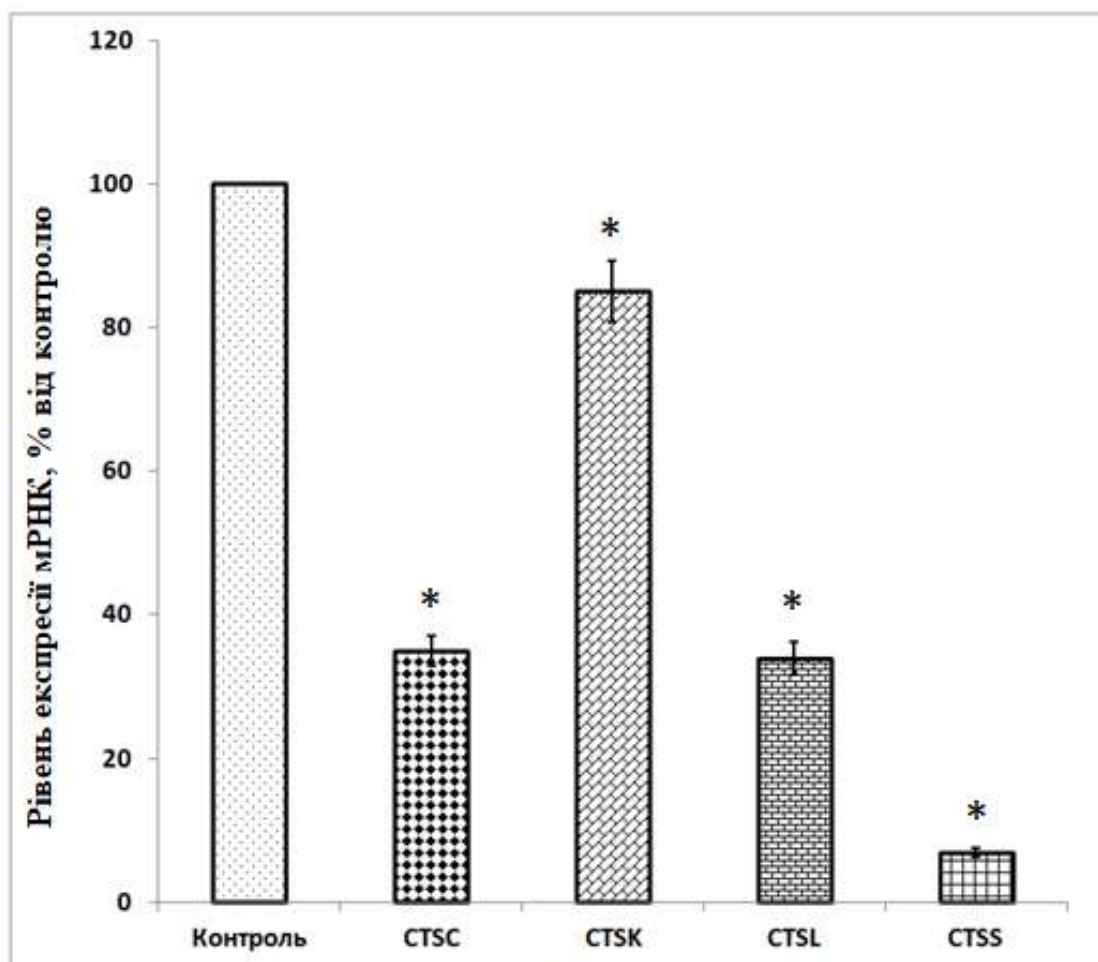


Рис. 3.2.2. Рівень експресії генів *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* і *CTSS* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та сублініях клітин, що містили доміант-негативну конструкцію ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і виражали у відсотках від контролю (100%); n = 4; \* – P < 0,05 при порівнянні з контролем.

Було також виявлено, що за умови пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1 зростає рівень експресії генів *STC2* (Staniocalcin 2), *SPUVE/PRSS23* (Serine protease, umbilical

endothelium/protease, serine, 23), FAP (Fibroblast activation protein, alpha) та DPP4 (dipeptidylpeptidase-4; CD26; adenosine deaminase complexing protein 2) на 509, 209, 430 та 271 % у порівнянні із контролем (клітини гліоми, трансфіковані вектором pcDNA3.1) (рис. 3.2.3).

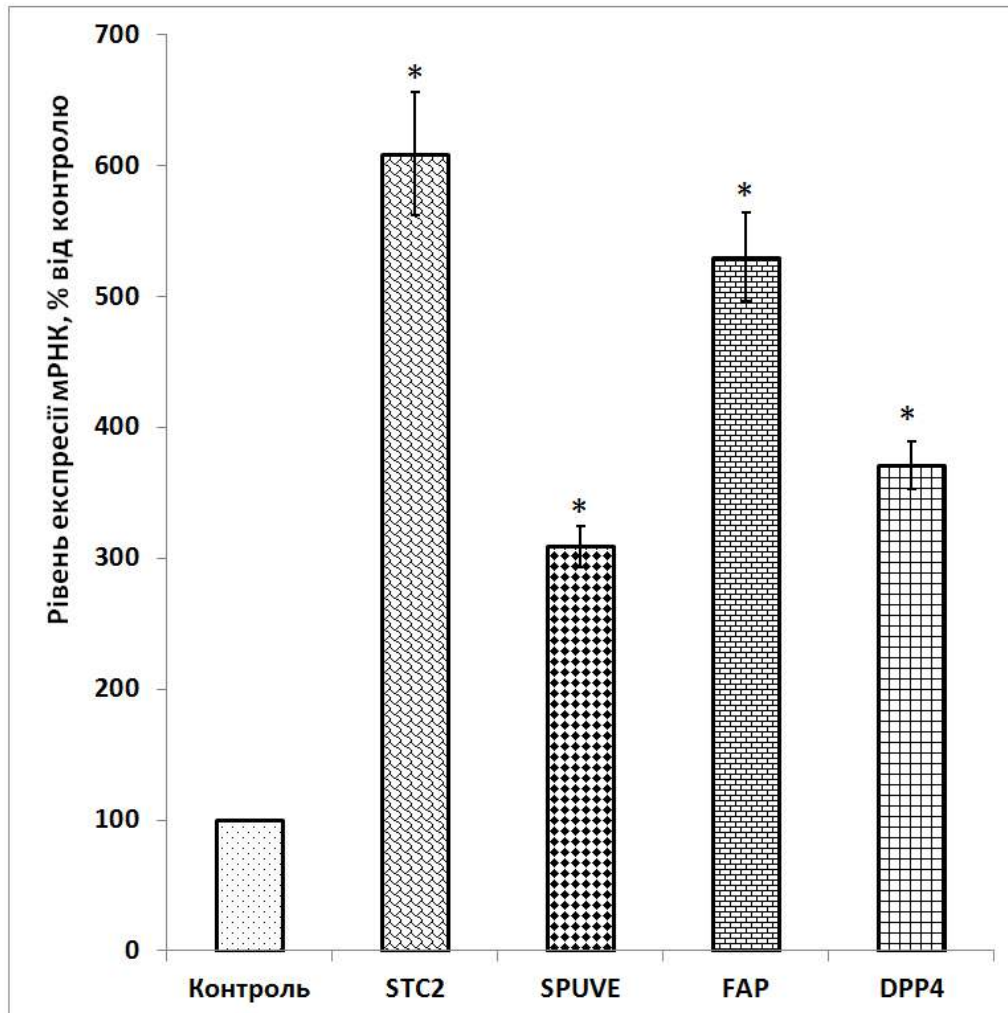


Рис. 3.2.3. Рівень експресії генів *STC2*, *SPUVE*, *FAP* та *DPP4* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль) та сублініях клітин, що містили доміант-негативну конструкцію ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і виражали у відсотках від контролю (100%); n = 4; \* – P < 0,05 при порівнянні з контролем.

Молекулярні механізми зниження рівня експресії генів *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS* за умов пригнічення функціональної активності сигнального ензиму IRE1 ще остаточно не з'ясовані. Одним із можливих механізмів IRE1-залежної регуляції експресії досліджених генів може бути наявність у їх промоторних ділянках специфічних сайтів зв'язування сплайс-варіанта транскрипційного фактора ХВР1. У зв'язку з цим, нами був проведений біоінформатичний аналіз наявності таких сайтів зв'язування в промоторних ділянках низки досліджених генів. Із даних, представлених у таблиці 3.2.1, видно, що сайти зв'язування сплайс-варіанта транскрипційного фактора ХВР1 були виявлені в промоторних ділянках генів *USP14* та *CTSC*, причому один із них був у 5' – 3' орієнтації, а другий мав обернену орієнтацію.

Таблиця 3.2.1.

Послідовності ССАСГ/СГТГГ, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1 (ХВР1-responsive element), в промоторних ділянках генів *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS*.

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотора та GenBank номер
USP14	-420 до -424	gaCCACGtg	1; NC_000018.10
USP14	-417 до -421	caCGTGGcc	1; NC_000018.10
CTSC	-1 до -5	gcCCACGgg	2; NC_000011.10
CTSC	40 до 44	ctCGTGGtg	2; NC_000011.10
CTSK, CTSL, CTSS		Не ідентифіковано	

1 - [https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id\\_709011/](https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_709011/)

2 - [https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id\\_712246/](https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_712246/)

### 3.3. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функціональної активності ензиму IRE1

Дослідження останніх років переконливо свідчать про те, що стрес ендоплазматичного ретикулума є одним із центральних облігатних факторів росту злоякісних пухлин, оскільки забезпечує такі зміни в метаболізмі клітин, які направлені на активацію ростових та прозапальних процесів, активує ангиогенез, а також толерантність до гіпоксії, причому як стрес ендоплазматичного ретикулума, так і прозапальні процеси поширюються від пухлинних до мієлоїдних клітин [67].

Для в'ясування ролі гіпоксії у регуляції експресії генів протеаз, які нас цікавили через сигнальний шлях відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума IRE1 ми досліджували, як умови гіпоксії впливатимуть на рівень експресії генів специфічних до убіквітину протеаз *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25*.

Виявлено, що розміщення контрольних клітин гліоми (трансфікованих порожнім вектором pcDNA3.1) в умови гіпоксії призводить до пригнічення експресії мРНК *USP1* (-36%). У клітинах гліоми, які містили конструкцію dnIRE1 експресія мРНК також знижувалася за умов гіпоксії (-33%). Це вказує на те, що негативна регуляція експресії цього гена гіпоксією здійснюється IRE1-незалежним чином (рис. 3.3.1).

Також було встановлено, що за умов гіпоксії експресія гена *USP4* не змінюється в значній мірі як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах із пригніченою активністю сигнального ензиму IRE1, що вказує на IRE1-незалежну регуляцію експресії цього гена (рис. 3.3.2).

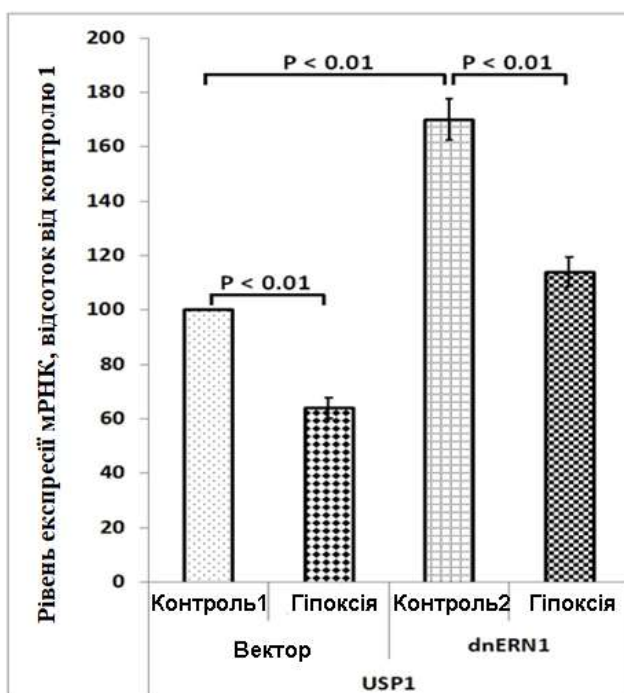


Рис. 3.3.1. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP1* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). В цьому та наступних рисунках: рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ ; Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

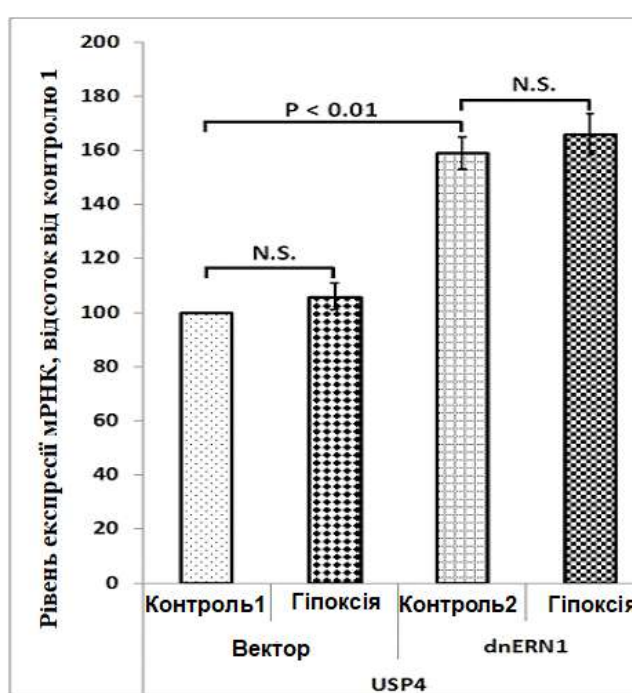


Рис. 3.3.2. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP4* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1).



Показано, що гіпоксія в значній мірі знижує рівень експресії гена *USP10* як у контрольних клітинах гліоми (-34%), так і у клітинах із конструкцією dnIRE1 (-24%), що свідчить про незначне зниження впливу гіпоксії на експресію цього гена за умов пригнічення IRE1 (рис. 3.3.3).

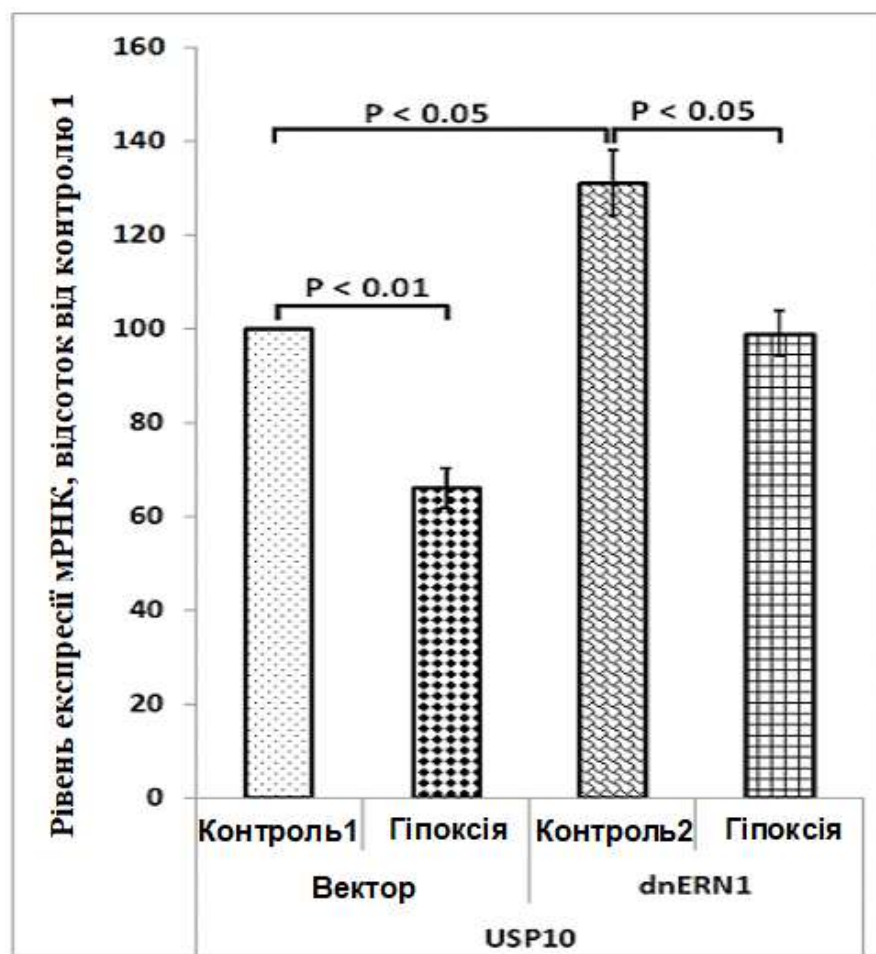


Рис. 3.3.3. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP10* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4.

Встановлено, що гіпоксична регуляція гена *USP14* подібна до гена *USP1*: для обох типів клітин гліоми спостерігалось зниження рівня експресії (-21% - pcDNA3.1; -25% - dnIRE1). Це дозволяє припустити, що за умов гіпоксії регуляція експресії цього гена відбувається незалежно від функціонального стану IRE1 (рис. 3.3.4).

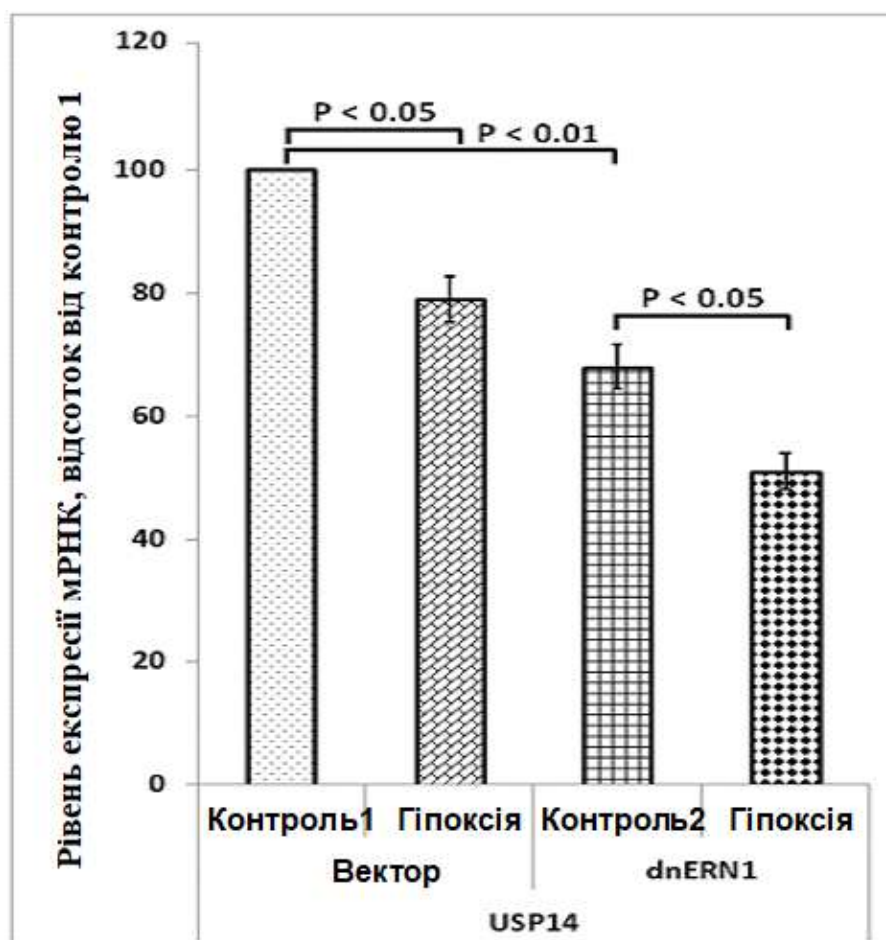


Рис. 3.3.4. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP14* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ .

У той же час, гіпоксія не викликає значних змін рівня експресії мРНК *USP22* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення IRE1 спричиняє незначне, але статистично важливе зниження експресії цього гена за умов гіпоксії (рис. 3.3.5).

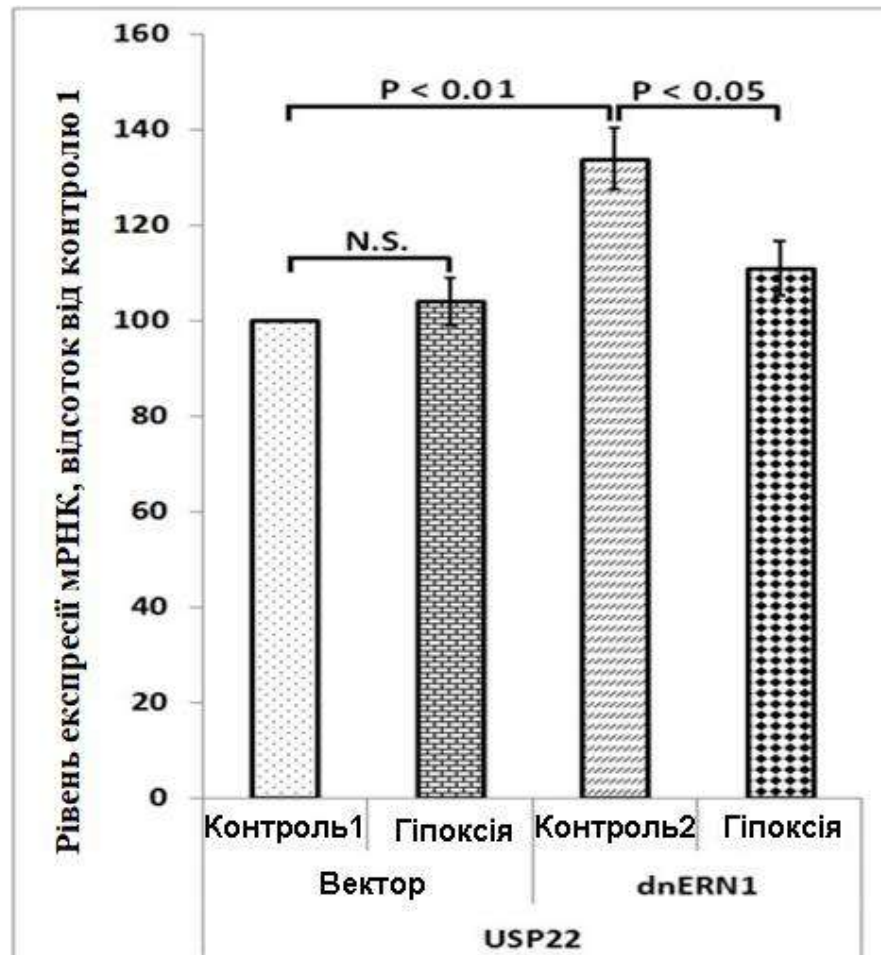


Рис. 3.3.5. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP22* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих доміант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівень експресії гена *USP25* підвищується у обох типах клітин гліоми за умов гіпоксії, але пригнічення IRE1 не здійснює значного впливу на експресію цього гена за умов гіпоксії: +18% у контрольних клітинах гліоми і +25% у клітинах із пригніченими функціями сенсорно-сигнального ензиму IRE1 (рис. 3.3.6).

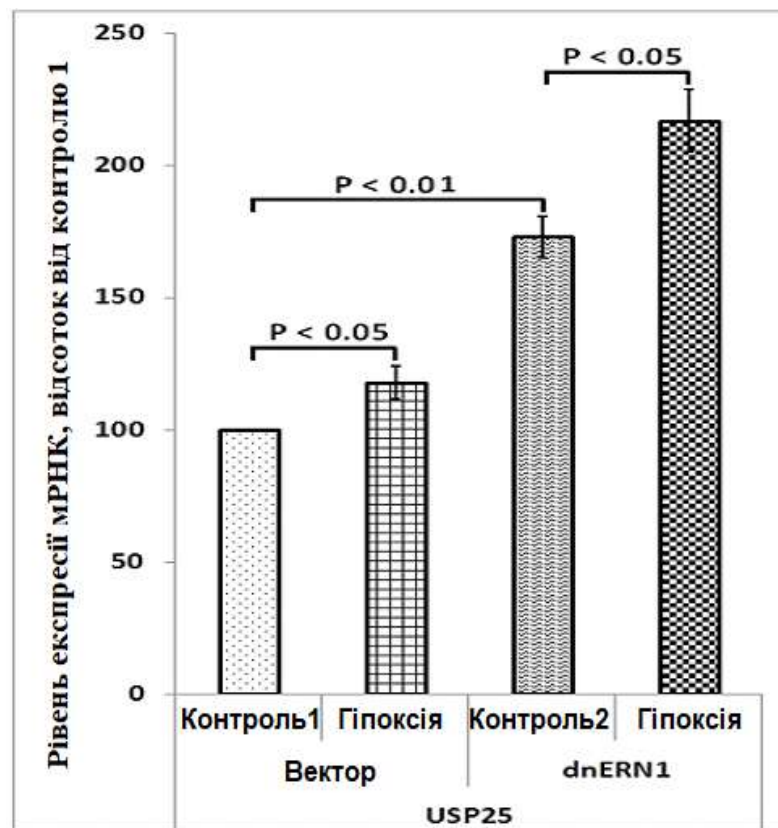


Рис. 3.3.6. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *USP25* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

### 3.4. Експресія генів катепсинів та *STC2* у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функціональної активності ензиму IRE1

Гіпоксія є одним із чинників, що індукують стрес ендоплазматичного ретикулума, причому як гіпоксія, так і стрес ендоплазматичного ретикулума є необхідними компонентами росту злоякісних пухлин і значною мірою контролюють їх процеси метаболізму. Виключення функції IRE1 – основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума – знижує інтенсивність росту пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії генів, які контролюють процеси проліферації та гліколізу. Сенсорно-сигнальний шлях IRE1 контролює експресію великої групи генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума, а також і від гіпоксії і є важливим фактором росту злоякісних пухлин.

Ми досліджували вплив гіпоксії на експресію генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS*, *STC2* та *HTRA1* у двох сублініях клітин гліоми лінії U87 в залежності від функціонального стану сенсорно-сигнального ензиму IRE1, який є головним компонентом відповіді на незгорнуті протеїни.

Показано, що у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором) гіпоксія значно підвищує рівень експресії гена катепсина А (+33%). Більше того, у клітинах без функціонально-активного IRE1 експресія цього гена не змінюється гіпоксією. Тому пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми U87 конструкцією dnIRE1 призводить до значної позитивної регуляції експресії гена *CTSA* (+111%) за нормоксії у порівнянні із контрольними клітинами (рис. 3.4.1).

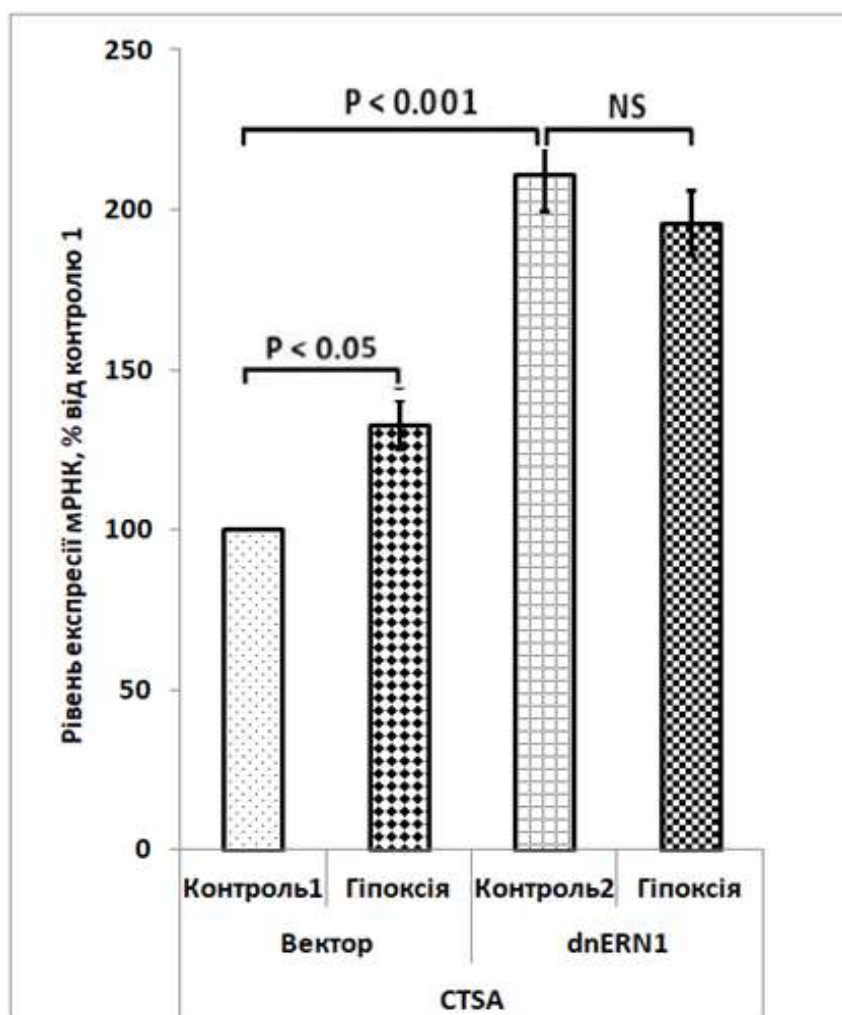


Рис. 3.4.1. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSA* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Виявлено, що рівень експресії гена *CTSB* підвищується як у контрольних клітинах гліоми, так і у клітинах із пригніченою активністю сигнально ензиму IRE1 за умов гіпоксії (+25% і +45%, відповідно). Вимкнення ензиматичних функцій IRE1 посилює вплив гіпоксії на експресію

цього гена. Також ми досліджували вплив пригнічення IRE1 на експресію цього гена за умов нормоксії, і результати вказують на те, що пригнічення функцій IRE1 значно підвищує рівень експресії мРНК *CTSB* (+60%) у порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.4.2).

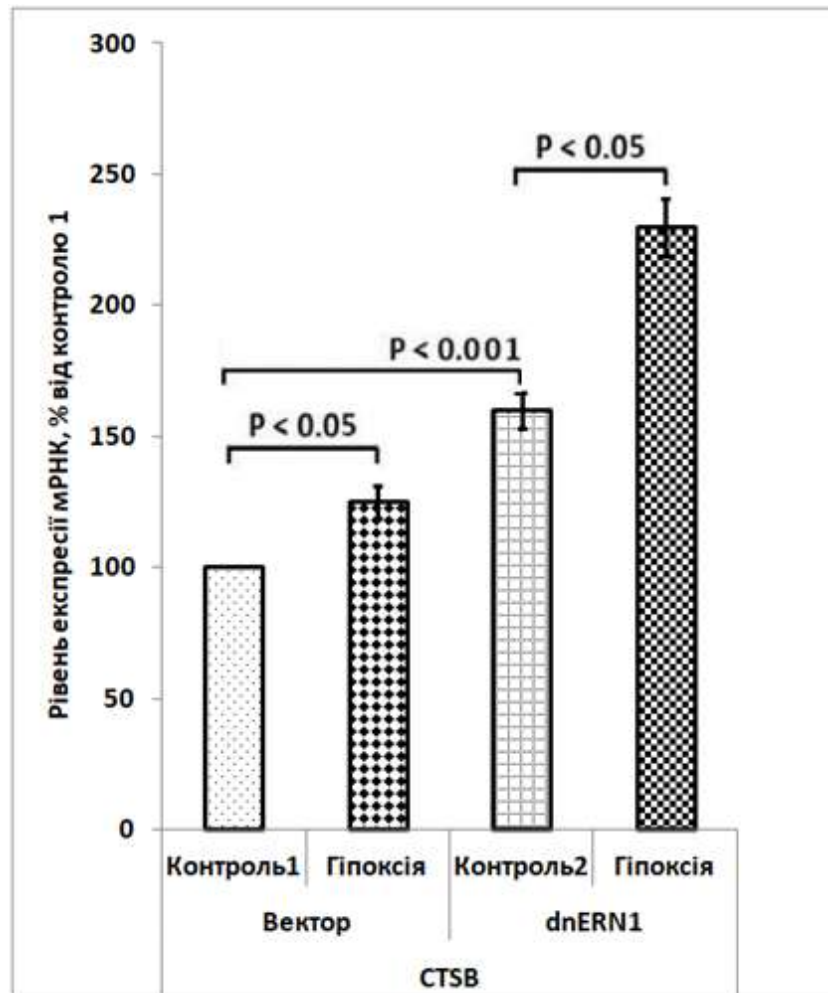


Рис. 3.4.2. Вплив гіпоксії на рівень експресії гена *CTSB* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pCDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pCDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Експресія гена *CTSC* негативно регулюється гіпоксією у клітинах гліоми із функціонально активним IRE1 та клітинах із конструкцією dnIRE1 (-53% і -54%, відповідно). Після цього ми вивчали вплив пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 на експресію гена *CTSC* за нормальних умов: рівень експресії мРНК негативно регулювався (майже в 3 рази) у клітинах гліоми з пригніченим IRE1 у порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.4.3).

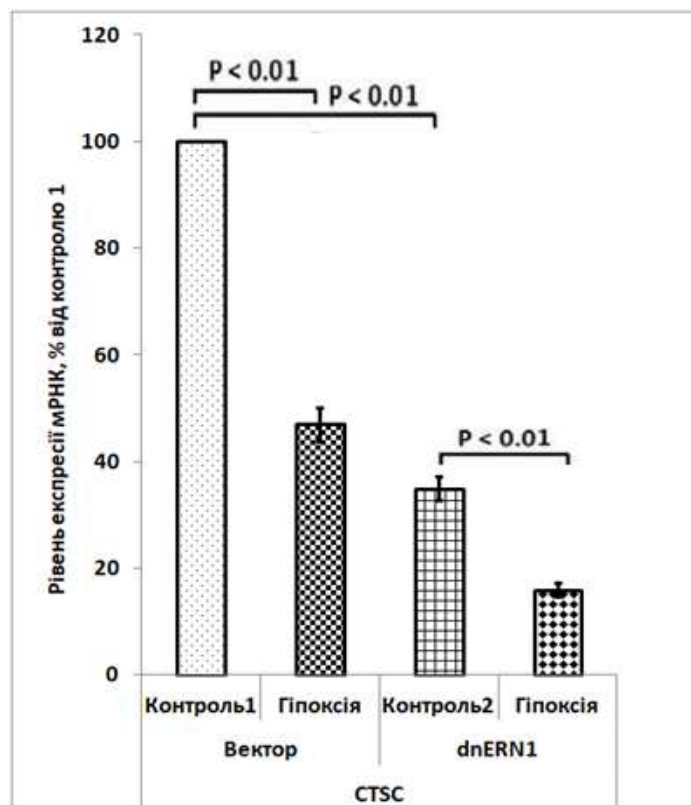


Рис. 3.4.3. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSC* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.



Також вивчали вплив гіпоксії на експресію гена *CTSD*. Показано, що рівень експресії мРНК зростає (+46%) у контрольних клітинах за гіпоксії. У клітинах із пригніченою функцією IRE1 гіпоксія знижувала рівень експресії мРНК *CTSD* у порівнянні із контролем (-17%). Отже, вплив гіпоксії на експресію цього гена повністю нівелювався у клітинах гліоми без функціонально активного IRE1. Більш того, експресія цього гена в значній мірі підвищується за нормоксії завдяки пригніченню функцій сигнального ензиму IRE1 (+208%) у порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.4.4).

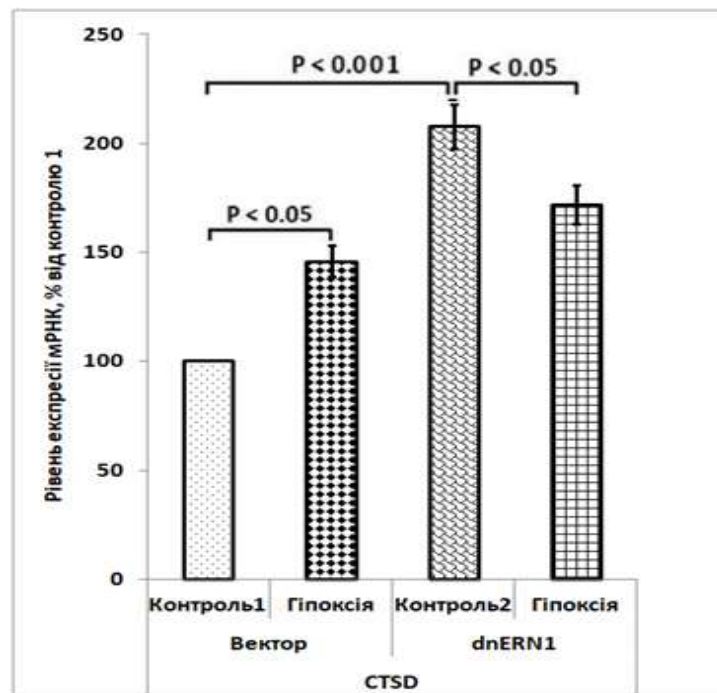


Рис. 3.4.4. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSD* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Встановлено, що рівень експресії мРНК *CTSF* підвищується як у контрольних клітинах гліоми (Вектор), так і у клітинах із конструкцією dnIRE1 за умов гіпоксії (+52% та +19%, відповідно). Пригнічення IRE1 значно знижує вплив гіпоксії на експресію цього гена. Ми також досліджували вплив пригнічення IRE1 на експресію гена *CTSF* за нормоксії. Виявлено, що вимкнення обох ензиматичних функцій IRE1 у значній мірі підвищує рівень експресії цього гена (+134%) у клітинах гліоми у порівнянні із контрольними клітинами (рис. 3.4.5).

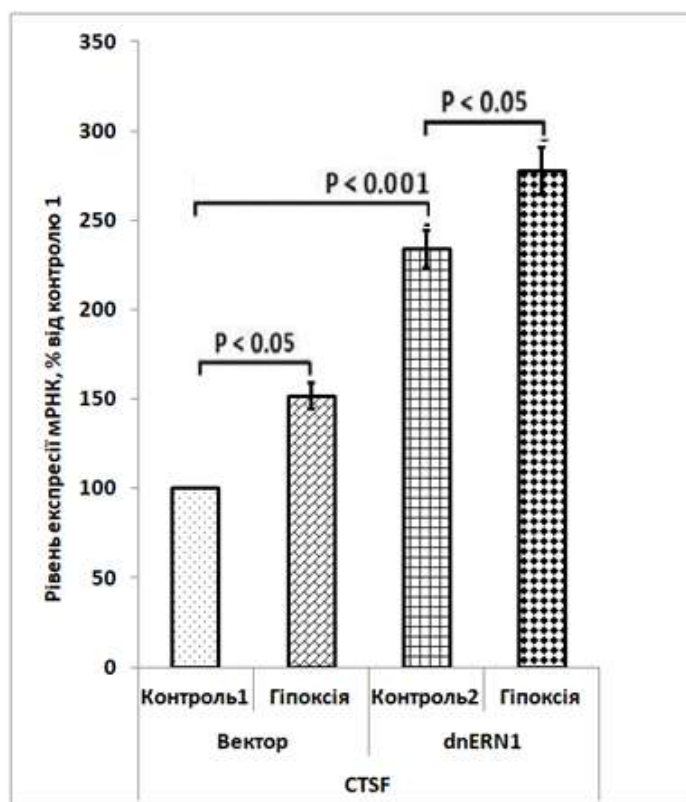


Рис. 3.4.5. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSD* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1;

Досліджено, що рівень експресії гена *CTSK* значно підвищений як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченою функцією IRE1 за гіпоксії (+43% і +28%, відповідно). Після цього ми вивчали вплив пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 на експресію гена *CTSK* за умов нормоксії: рівень експресії гена катепсина К знижувався (-15%) у клітинах без функціонально активного ензиму IRE1 у порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.4.6).

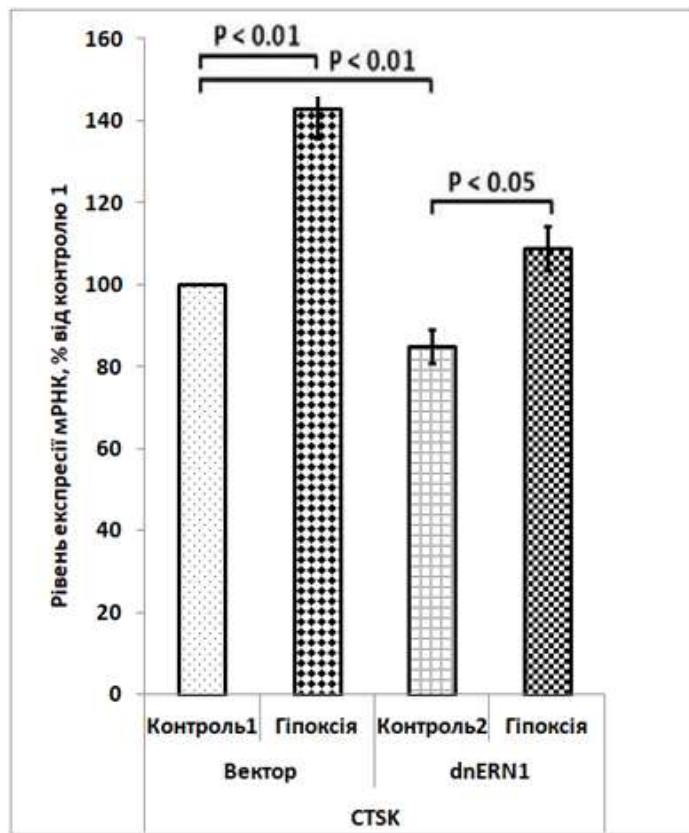


Рис. 3.4.6. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSK* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Показано, що рівень експресії мРНК *CTSL* знижується в обох досліджуваних типах клітин гліоми (із конструкціями pcDNA3.1 та dnIRE1). У контрольних клітинах гліоми рівень експресії гена знижується на 16%, тоді як для клітин із пригніченою активністю ензиму IRE1 - на 26%. Тому інгібування IRE1 у значній мірі знижує вплив гіпоксії на експресію цього гена. Крім того, ми досліджували, як впливатиме пригнічення функцій ензиму IRE1 на експресію гена *CTSL* за умов нормоксії. Показано, що інгібування IRE1 в значній мірі знижує рівень експресії цього гена в порівнянні із контрольними клітинами (-66%) (рис. 3.4.7).

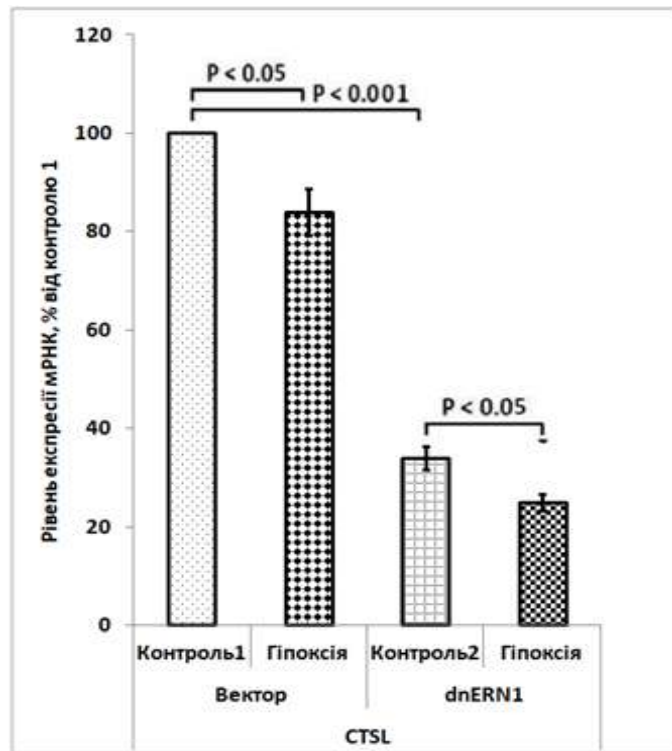


Рис. 3.4.7. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSL* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також ми досліджували особливості впливу гіпоксії на експресію гена *CTSO* у контрольних клітинах гліоми та клітинах із функціонально неактивним IRE1. Показано, що рівень експресії мРНК *CTSO* знижується на 33% у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії, а пригнічення IRE1 знижує рівень експресії мРНК *CTSO* у порівнянні із контрольними клітинами 2 (-31%). Отже, вплив гіпоксії на експресію гена катепсина О значно знижується у клітинах з пригніченим IRE1. Більш того, експресія цього гена сильно зростає за нормоксії внаслідок інгібування IRE1 (+85%) у порівнянні із контрольними клітинами (рис. 3.4.8).

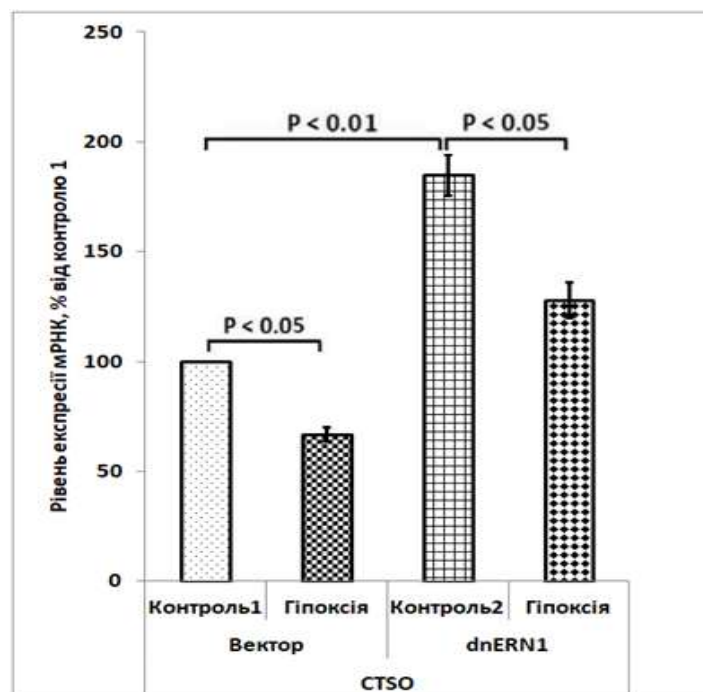


Рис. 3.4.8. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSO* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Дослідження експресії гена катепсина S виявило, що гіпоксія негативно регулює експресію цього гена у контрольних клітинах (-17%), тоді як у клітинах із конструкцією dnIRE1 спостерігалась позитивна регуляція експресії (+86%). Після цього ми вивчали вплив пригнічення функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 на експресію цього гена за нормоксії: рівень експресії мРНК *CTSS* в значній мірі знижується (-93%) у клітинах гліоми із пригніченим IRE1 в порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.4.9).

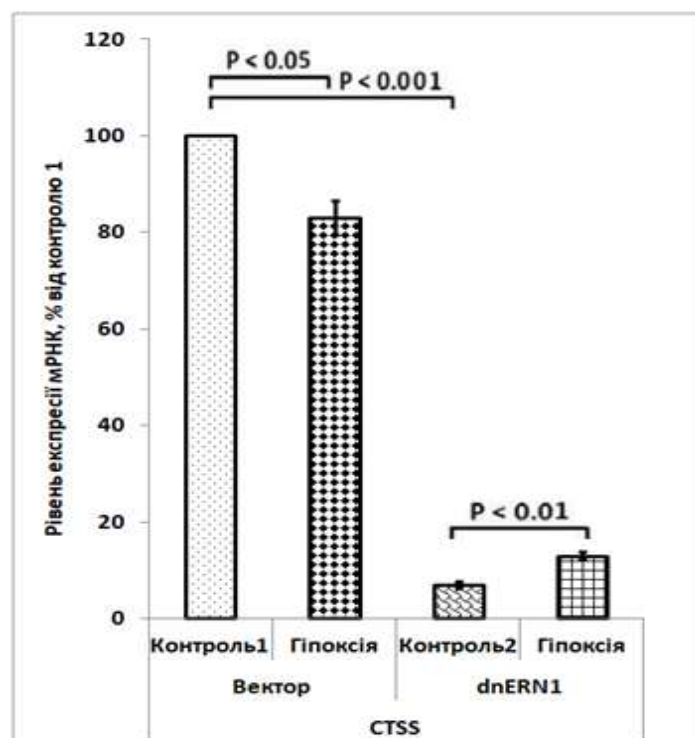


Рис. 3.4.9. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *CTSS* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Встановлено, що експресія гена *STC2* є чутливою до впливу гіпоксії (рис. 3.4.10). Так, у контрольних клітинах гліоми рівень експресії гена *STC2* підвищувався за дії гіпоксії у 7 разів у порівнянні з контрольними клітинами, тоді як для клітин, що містили конструкцію dnIRE1, спостерігалася дещо менша індукція експресії цього гена за умов гіпоксії (у 4.1 рази) (рис. 3.4.10). В той же час експресія гена *FAP* була резистентна до впливу гіпоксії

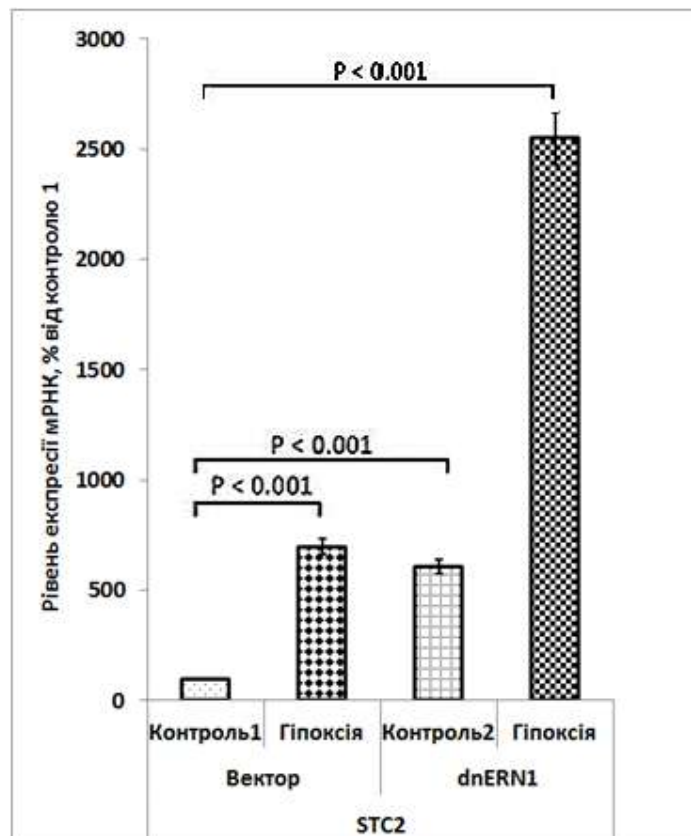


Рис. 3.4.10. Вплив гіпоксії (3% кисню – 16 годин) на рівень експресії гена *STC2* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також дослідили вплив гіпоксії на рівень протеїну HIF-1 $\alpha$  у ядерній фракції контрольних клітин гліоми і клітинах із пригніченими функціями IRE1. У клітинах із dnIRE1 рівень HIF-1 $\alpha$  знижується, тоді як гіпоксія в значній мірі збільшує рівень продукції протеїну в обох типах клітин. Сплайс-варіант транскрипційного фактору XBP1 не можна було детектувати ні в контрольних клітинах гліоми, ні в клітинах із пригніченим IRE1 за умов нормоксії та гіпоксії (рис. 3.4.11).



Рис. 3.4.11. Вплив гіпоксії (Г, 3% кисню – 16 год.) на рівень протеїну HIF-1 $\alpha$  у ядерній фракції контрольних клітин гліоми (Вектор) і у клітинах із пригніченими функціями IRE1 (dnIRE1); К – контрольні клітини, які росли за звичайних умов. У якості контролю кількості проаналізованих протеїнів використовували  $\beta$ -актин ( $\beta$ -actin).



### **3.5. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* і *USP25* у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму IRE1**

Для того, щоб вивчити, чи дефіцит глюкози регулює функції генів, які нас цікавили через IRE1 ланку відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула, ми досліджували ефект дефіциту глюкози на експресію генів, що кодують *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* і *USP25* у двох сублініях клітин гліоми U87 в залежності від пригнічення сигнального ензиму IRE1, який є головною складовою відповіді на незгорнуті протеїни.

Досліджено, що дефіцит глюкози призводить до пригнічення рівня експресії мРНК *USP1* (-27%) у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором). У клітинах без функціонально активного сигнального ензиму IRE1 експресія цього гена негативно регулюється (-22%) за дефіциту глюкози. Таким чином, інгібування функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми U87 суттєво не змінює чутливість експресії гену *USP1* до дефіциту глюкози (рис. 3.5.1).

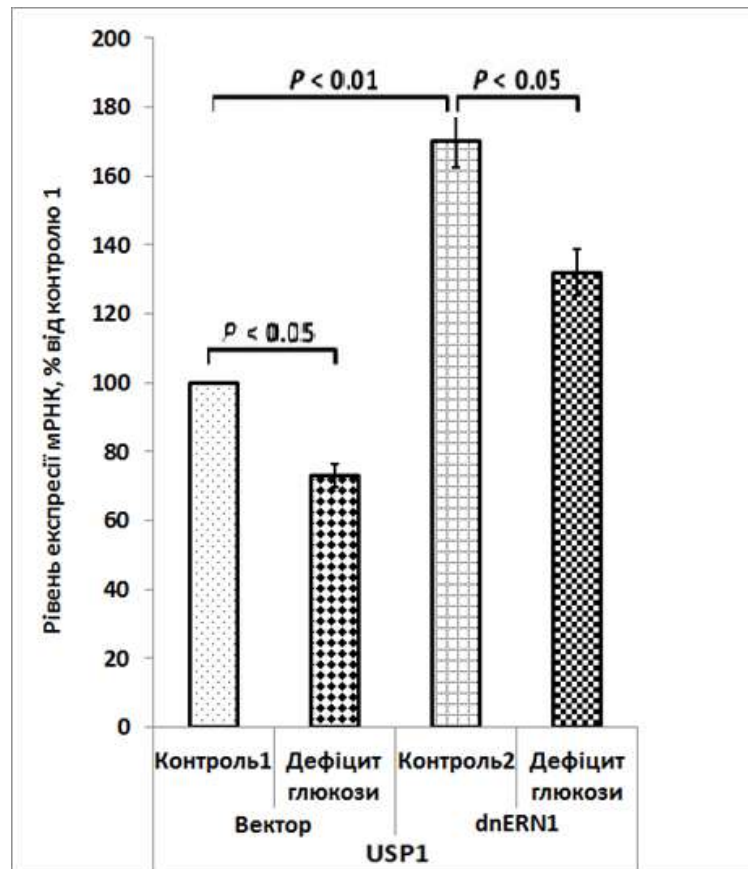


Рис. 3.5.1. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP1* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також ми дізналися, що експресія гена, який кодує *USP4* значно підвищується (+25%) за умов дефіциту глюкози в контрольних клітинах гліоми. У клітинах гліоми, які містили dnIRE1, ефект дефіциту глюкози на експресію мРНК був подібний (+35%), що вказує на позитивну регуляцію експресії цього гена за умов дефіциту глюкози незалежно від функцій IRE1 (рис. 3.5.2).

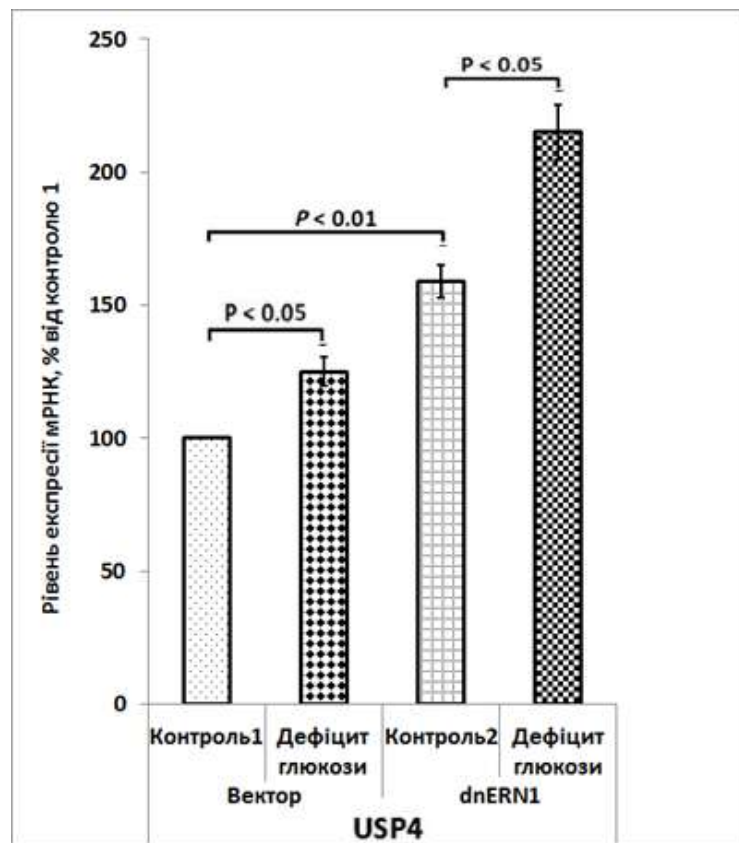


Рис. 3.5.2. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP4* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Виявлено, що дефіцит глюкози в значній мірі знижує (-19%) рівень експресії гена *USP10* у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення сигнального ензиму IRE1 нівелює негативну регуляцію експресії цього гена за умов дефіциту глюкози, вказуючи на те, що негативна регуляція експресії

цього гена, індукована дефіцитом глюкози, залежить від сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1 (рис. 3.5.3).

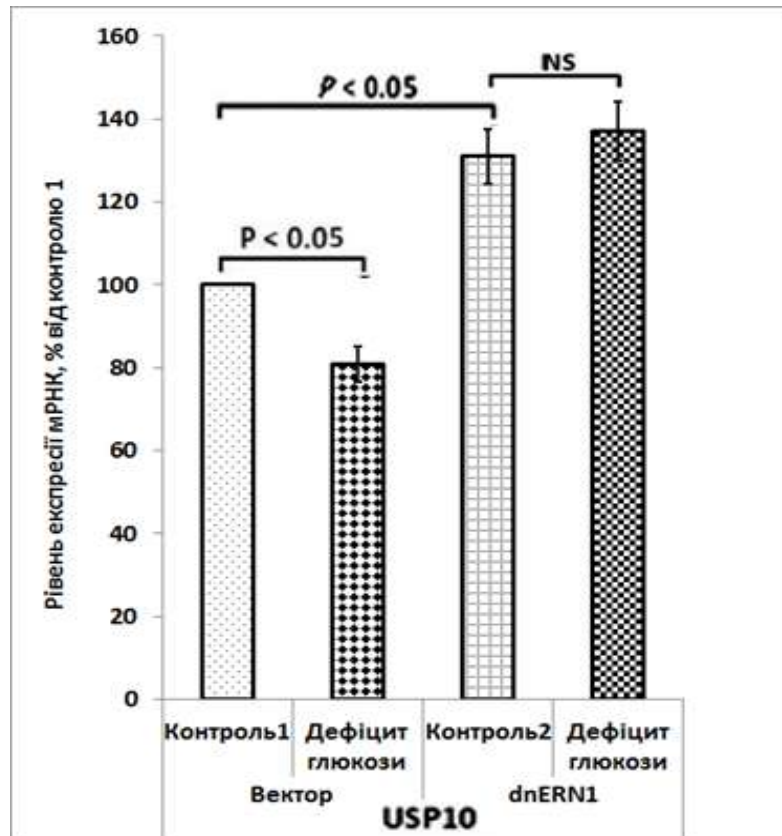


Рис. 3.5.3. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP10* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

У той же час, дефіцит глюкози не призводить до значних змін експресії гена *USP14* як у контрольних клітинах, так і в клітинах без функціональної

активності ензиму IRE1, що вказує на резистентність експресії цього гена до дефіциту глюкози незалежно від сигнального шляху IRE1 (рис. 3.5.4).

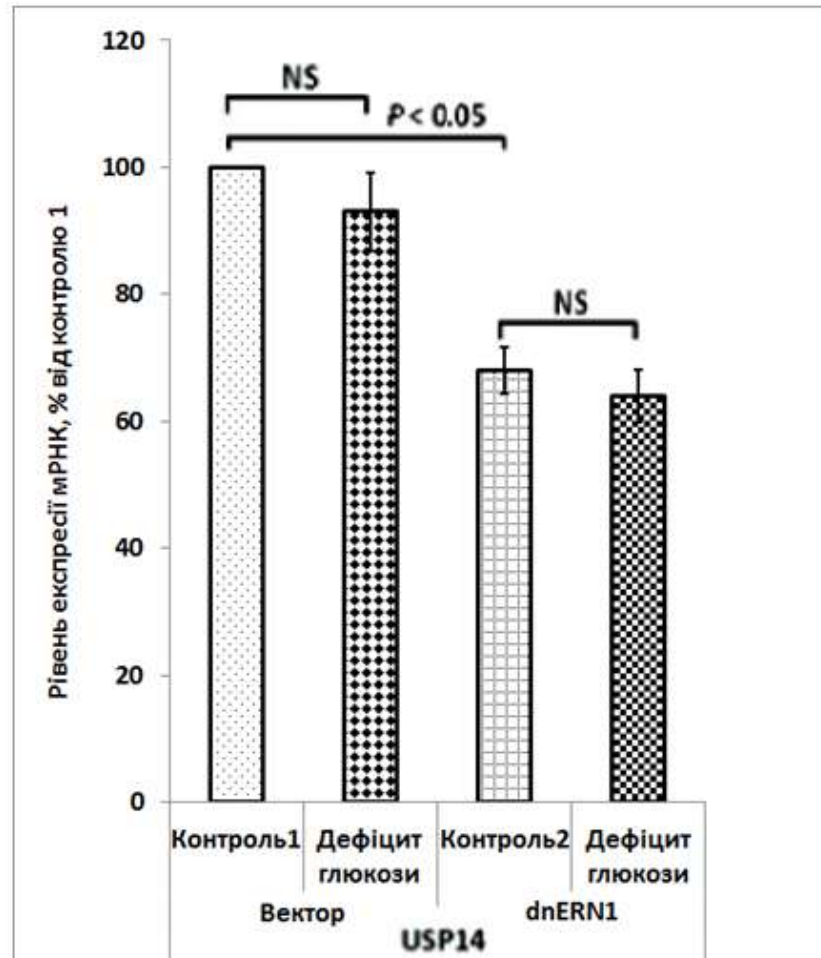


Рис. 3.5.4. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP14* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також досліджували експресію гена *USP22*. Розміщення контрольних клітин гліоми в умови дефіциту глюкози не викликає значних змін у експресії мРНК *USP22* у контрольних клітинах гліоми у порівнянні з клітинами, які росли у середовищі із глюкозою, що вказує на стійкість експресії цього гена до дефіциту глюкози. Однак, у клітинах гліоми, які містили dnIRE1 за дефіциту глюкози відбувалося пригнічення експресії мРНК (-19%), вказуючи на регуляції експресії цього гена дефіцитом глюкози IRE1-залежним шляхом (рис. 3.5.5).

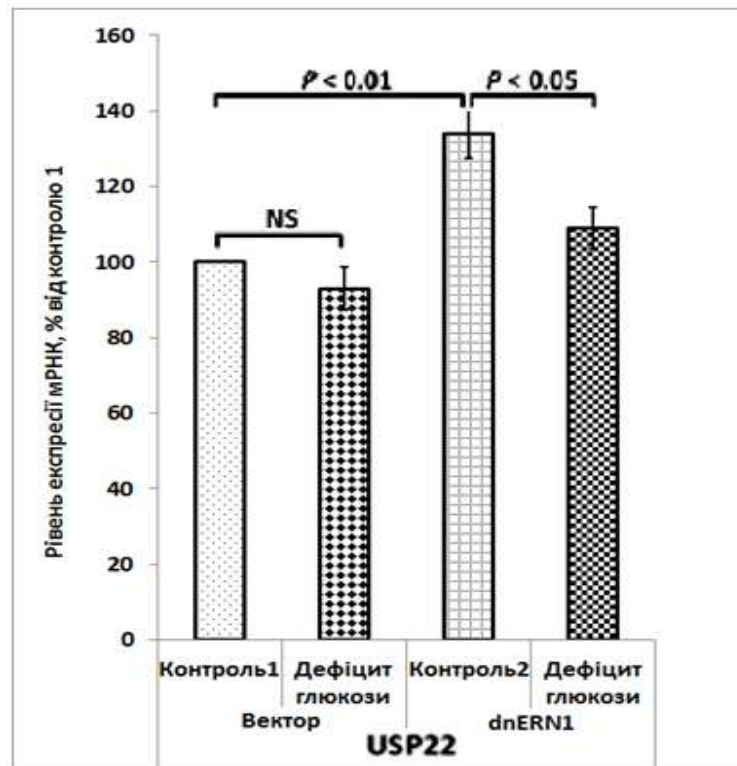


Рис. 3.5.5. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP22* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Встановлено, що дефіцит глюкози значно підвищує рівень експресії мРНК *USP25* як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченими функціями сигнального ензиму IRE1 (+41% і +63%, відповідно), але пригнічення IRE1 підвищує позитивну регуляцію експресії цього гена, вказуючи на те, що позитивна регуляція експресії цього гена, викликана дефіцитом глюкози, є залежною від функцій сигнального ензиму IRE1 (рис. 3.5.6).

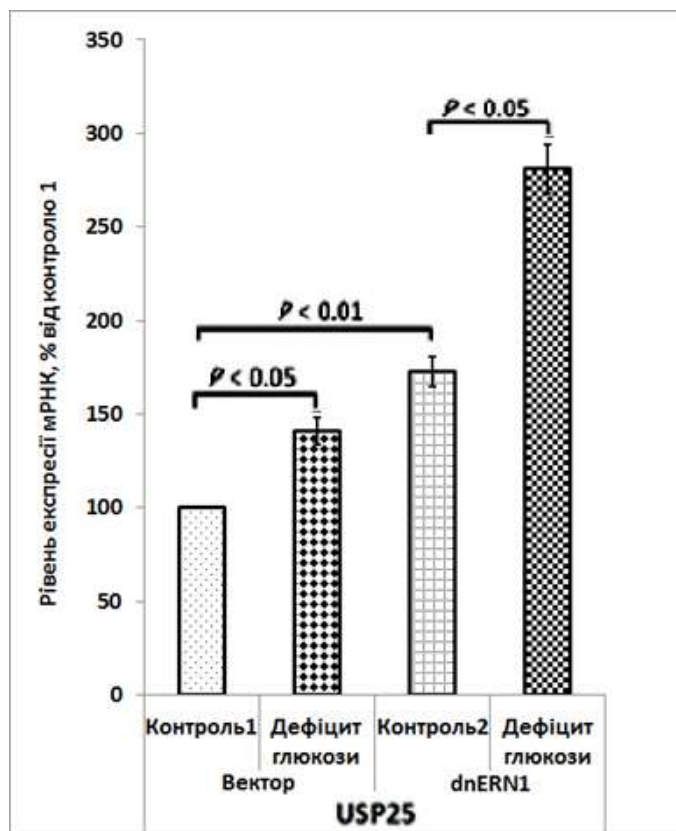


Рис. 3.5.6. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *USP25* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

### **3.6. Вплив дефіциту глюкози на експресію генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* і *HTRA1* у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму IRE1**

Глюкоза є важливим субстратом для гліколізу, який є необхідним для розвитку гліоми та її більш агресивної поведінки. Краща обізнаність щодо відповіді пухлини на умови дефіциту глюкози необхідна для розвитку терапевтичних стратегій клітинної сенсибілізації, що базується на блокаді механізмів виживання.

Для в'яснення впливу дефіциту глюкози на функціонування генів катепсинів, які нас цікавили через IRE1-ланку відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума, ми досліджували вплив дефіциту глюкози на експресію генів, що кодують *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, і *CTSS* в клітинах гліоми лінії U87 відносно інгібування сигнального ензиму IRE1, який є основним компонентом процесу відповіді на не згорнуті протеїни та стресу ендоплазматичного ретикулума.

Було показано, що рівень експресії гена, який кодує катепсин А підвищується (+49%) за умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором) у порівнянні із клітинами, які вирощувалися у середовищі із глюкозою. Клітини гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1 були резистентні до умов дефіциту глюкози, і це вказує на те, що позитивна регуляція цього гена за умов дефіциту глюкози є IRE1-залежною. Отже, пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми U87 конструкцією dnIRE1 знімає чутливість експресії гена *CTSA* до дефіциту глюкози (рис. 3.6.1).



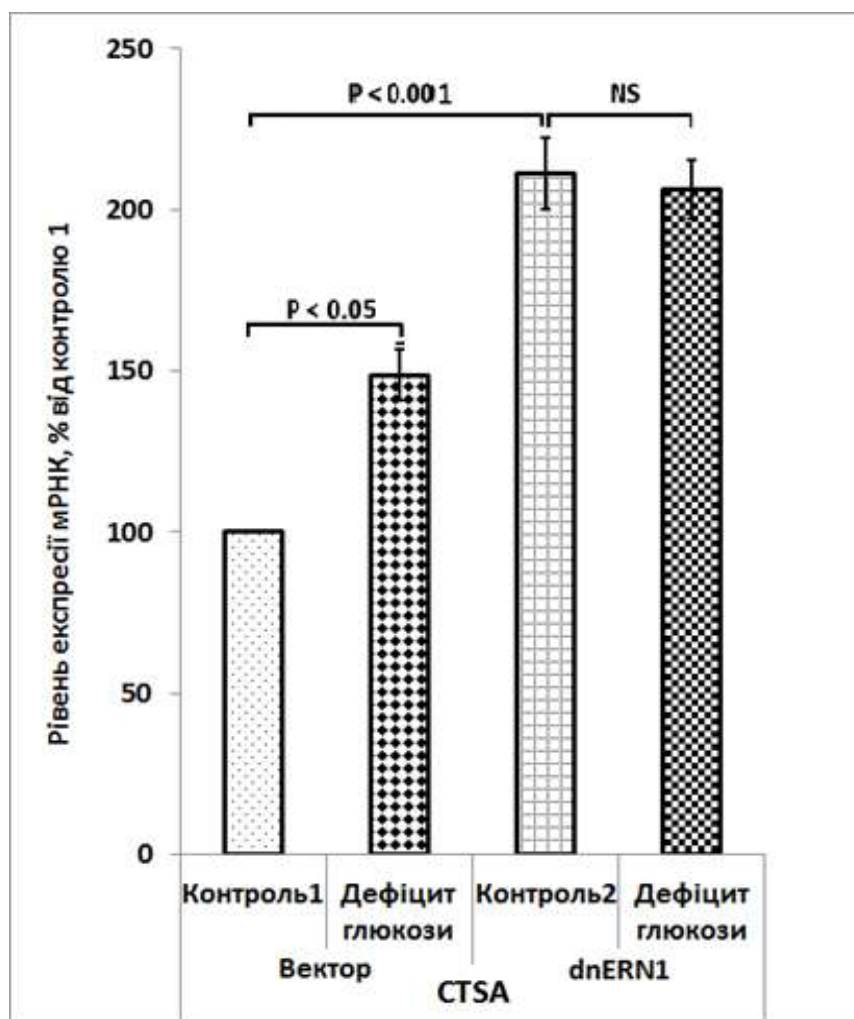


Рис. 3.6.1. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSA* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Дослідили, що дефіцит глюкози призводить невеликої, але статистично значимої позитивної регуляції (+16%) рівня експресії гена *CTSB* у контрольних клітинах гліоми у порівнянні із клітинами, що росли в

середовищі із глюкозою. Але пригнічення сигнального ензиму IRE1 усуває цей ефект, вказуючи на те, що негативна регуляція експресії цього гена, індукована дефіцитом глюкози, залежить від IRE1-сигнального шляху (рис.3.6.2).

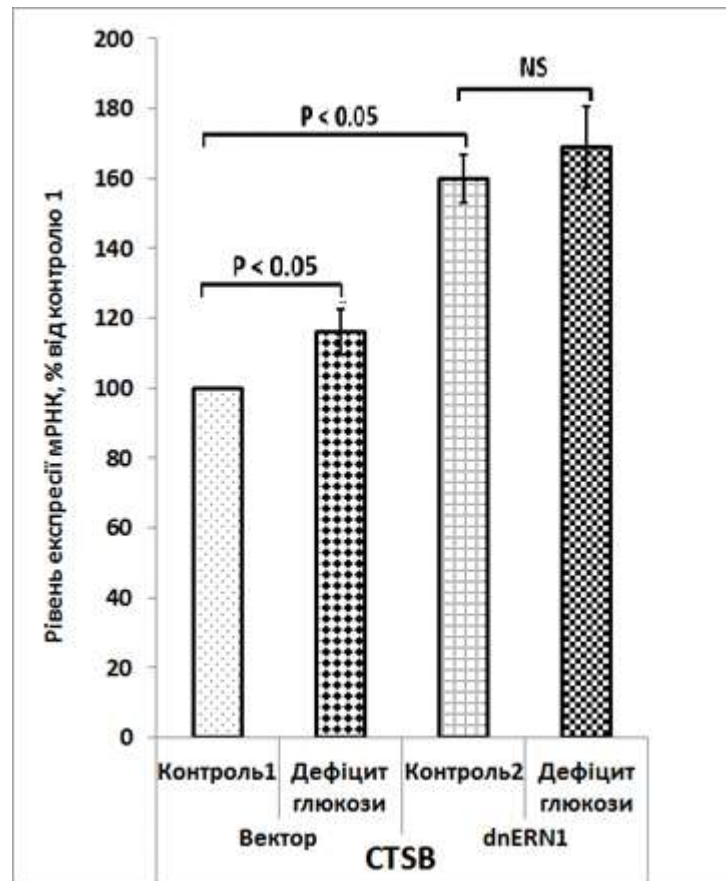


Рис.3.6.2. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSB* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

У той же час, рівень експресії гена катепсина С нечутливий до умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми. Вимкнення функцій сигнального ензиму IRE1 робить експресію цього гена чутливою до дефіциту глюкози (+23%), що свідчить про чутливість експресії гена *CTSC* до дефіциту глюкози в залежності від функціонування IRE1 (рис.3.6.3).

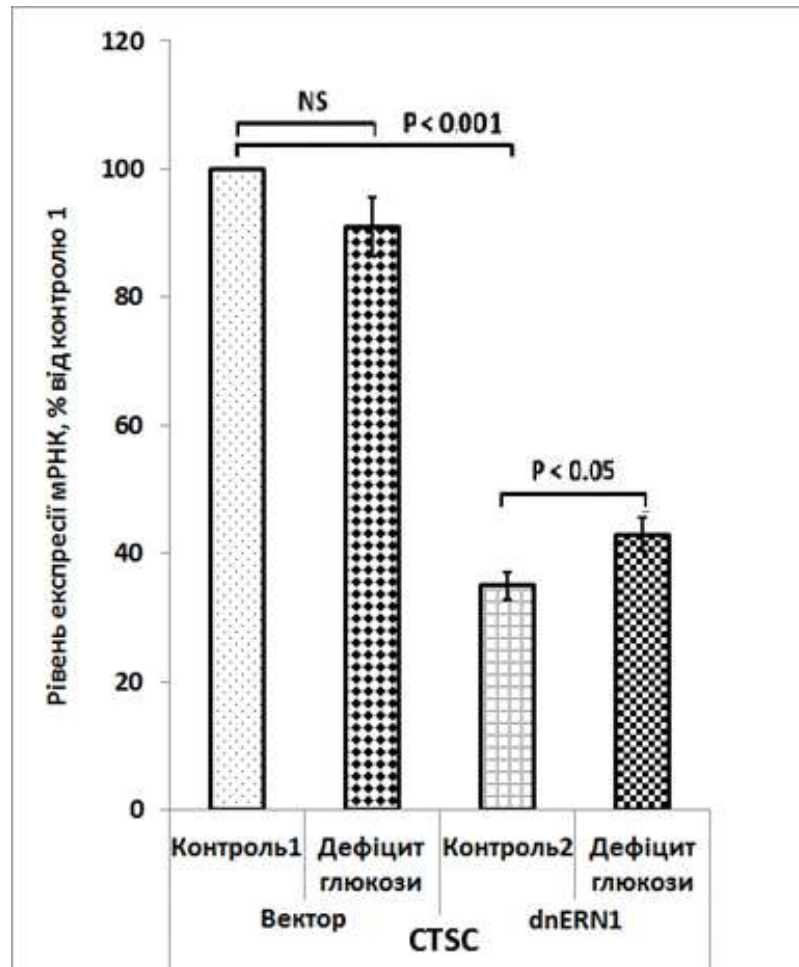


Рис. 3.6.3. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSC* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих доміант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також ми дослідили експресію гена *CTSF*. У контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози рівень експресії мРНК *CTSF* істотно не змінився в порівнянні з клітинами, що росли у середовищі із глюкозою, тому можна сказати, що експресія цього гена резистентна до дефіциту глюкози. Окрім цього, для клітин, які містили dnIRE1 і були поміщені в умови дефіциту глюкози також не змінився рівень експресії мРНК. Отже, регуляція цього гена є IRE1-незалежною (рис. 3.6.4).

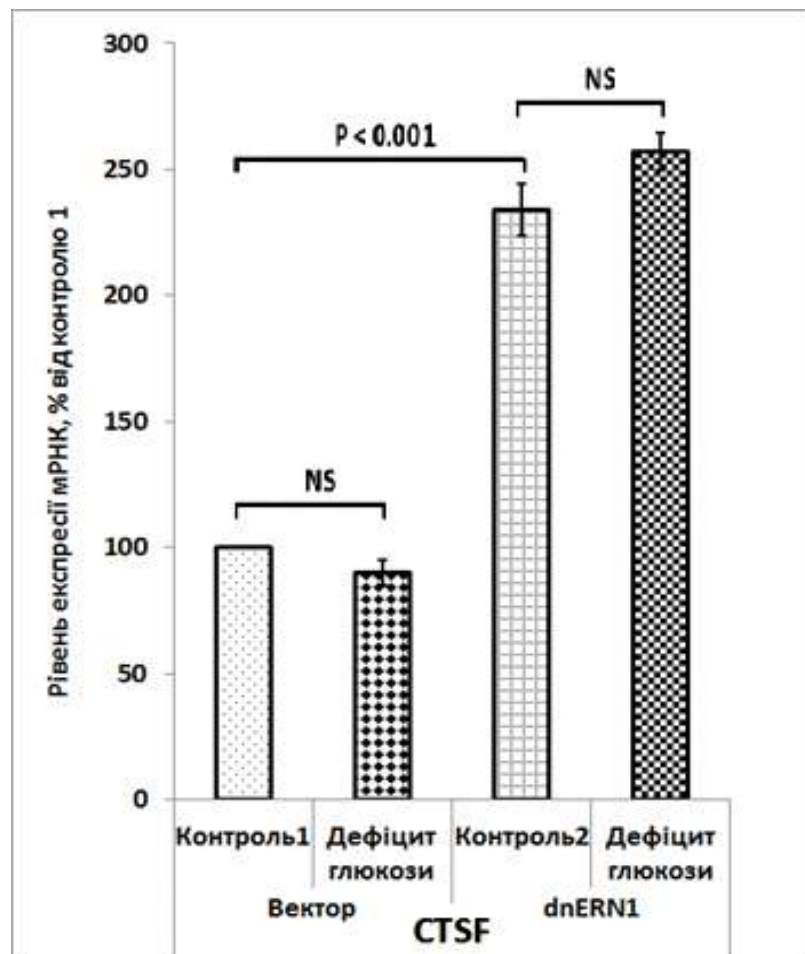


Рис. 3.6.4. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSF* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Встановлено, що рівень експресії мРНК *CTSD* зростає в значній мірі як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченим сигнальним ензимом IRE1 (+60% та +55%, відповідно) за умов дефіциту глюкози, що вказує на те, що позитивна регуляція експресії цього гена дефіцитом глюкози є незалежною від функціонування сигнального ензиму IRE1 (рис.3.6.5).

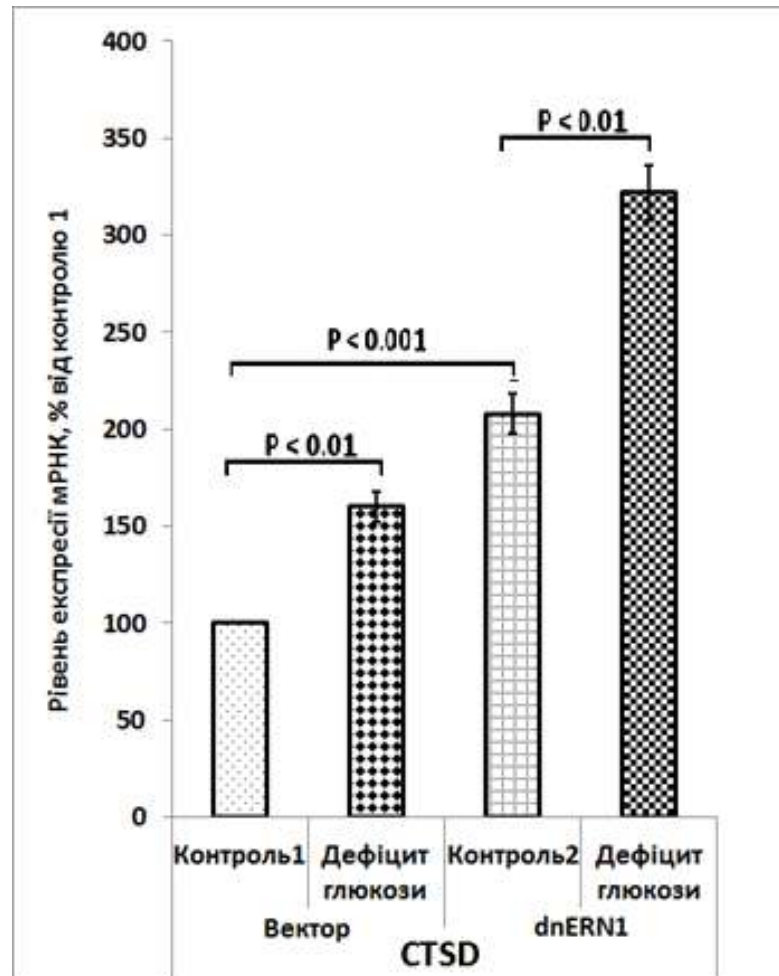


Рис. 3.6.5. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSD* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором рсDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором рсDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Дослідження експресії гену катепсина К показало, що він є надзвичайно чутливим до дефіциту глюкози у клітинах гліоми із функціонально активним IRE1 (+113%), а інгібування IRE1 знижує цей ефект (+47%) (рис. 3.6.6). Таким чином, регуляція експресії гену *CTSK* дефіцитом глюкози є складним процесом і частково залежить від IRE1-сигнального шляху.

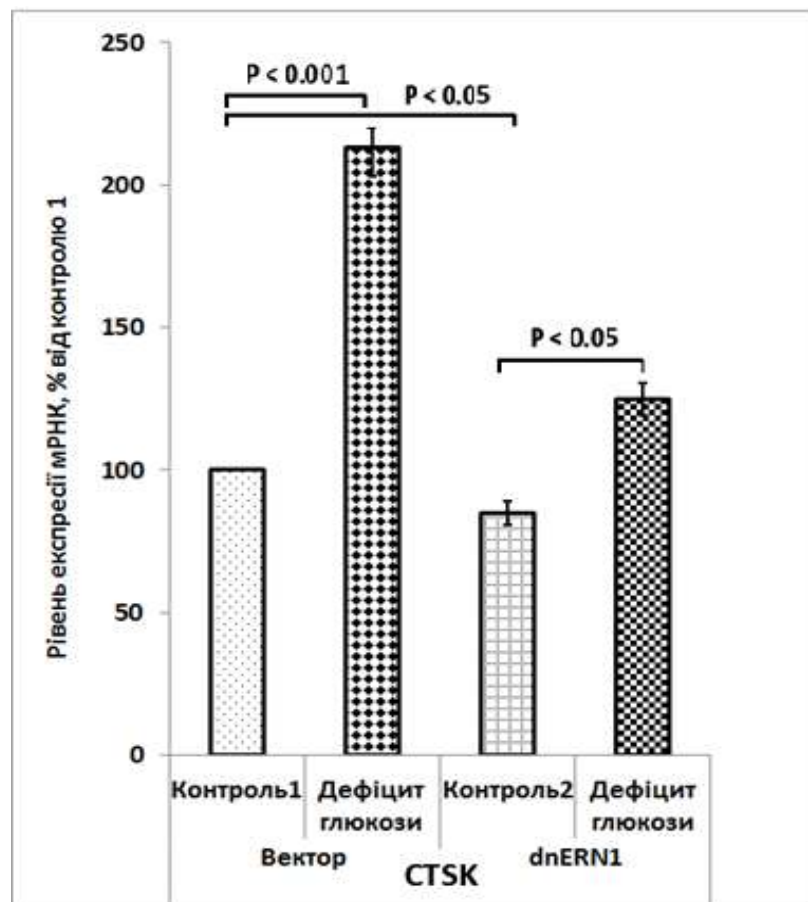


Рис. 3.6.6. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гену *CTSK* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Крім того, ми вивчали вплив дефіциту глюкози на рівень експресії катепсина L як у контрольних клітинах, так і у клітинах із пригніченим IRE1. Дефіцит глюкози призводить до незначної, але статистично важливої позитивної регуляції (+16%) рівня експресії мРНК CTSL у контрольних клітинах гліоми у порівнянні із клітинами, які росли у середовищі із глюкозою, але пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 у значній мірі посилює ефект дефіциту глюкози на експресію цього гена (+74%), вказуючи на те, що регуляція експресії цього гена за умов дефіциту глюкози здійснюється за участі IRE1 (рис.3.6.7).

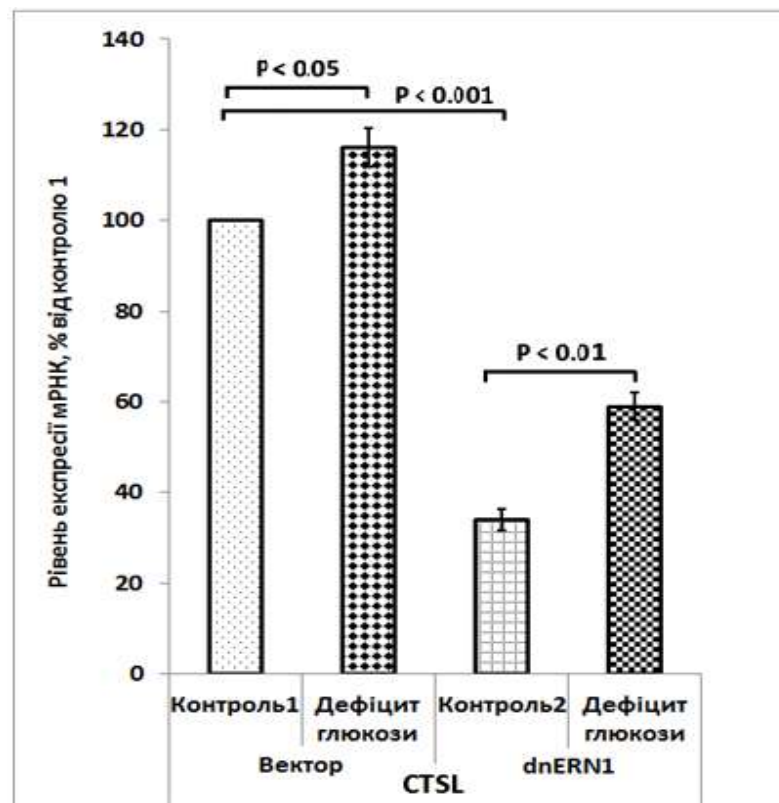


Рис. 3.6.7. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSL* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Також дослідили рівень експресії генів, які кодують катепсину O і S (CTSO і CTSS) і знайшли відмінності у регуляції цих генів дефіцитом глюкози. Було показано, що для контрольних клітин гліоми за умов дефіциту глюкози спостерігалось підвищення рівня експресії мРНК *CTSO* (+24%), тоді як клітини гліоми, які містили dnIRE1 були резистентні до дефіциту глюкози (рис. 3.6.8).

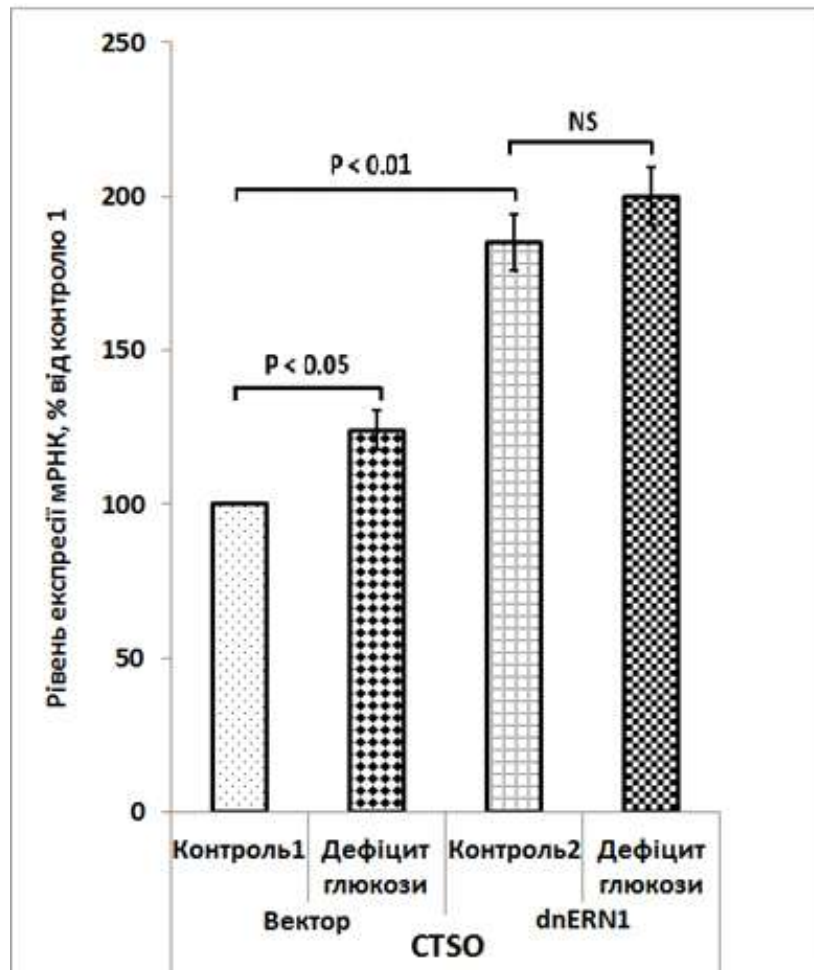


Рис. 3.6.8. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSO* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.



Для гена *CTSS* визначено, що рівень його експресії у контрольних клітинах гліоми не змінювався в значній мірі за нестачі глюкози. У той же час, пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 викликає чутливість експресії гена *CTSS* до дефіциту глюкози, що свідчить про IRE1-залежний характер регуляції експресії цього гена дефіцитом глюкози (рис. 3.6.9).

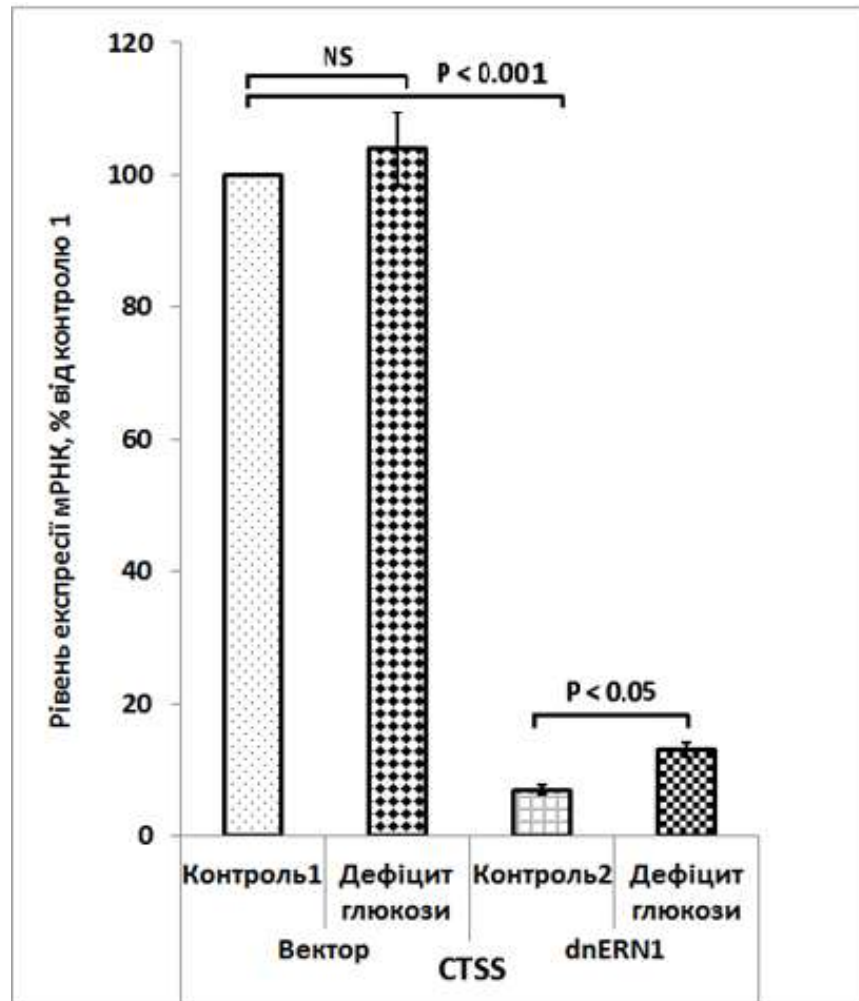


Рис. 3.6.9. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *CTSS* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

Виявлено, що рівень експресії мРНК *HTRA1* не змінюється в значній мірі у контрольних клітинах, а у клітинах із пригніченим сигнальним ензимом IRE1 за умов дефіциту глюкози відбувається незначне, але статистично важливе зниження рівня експресії цього гена (рис. 3.6.10).

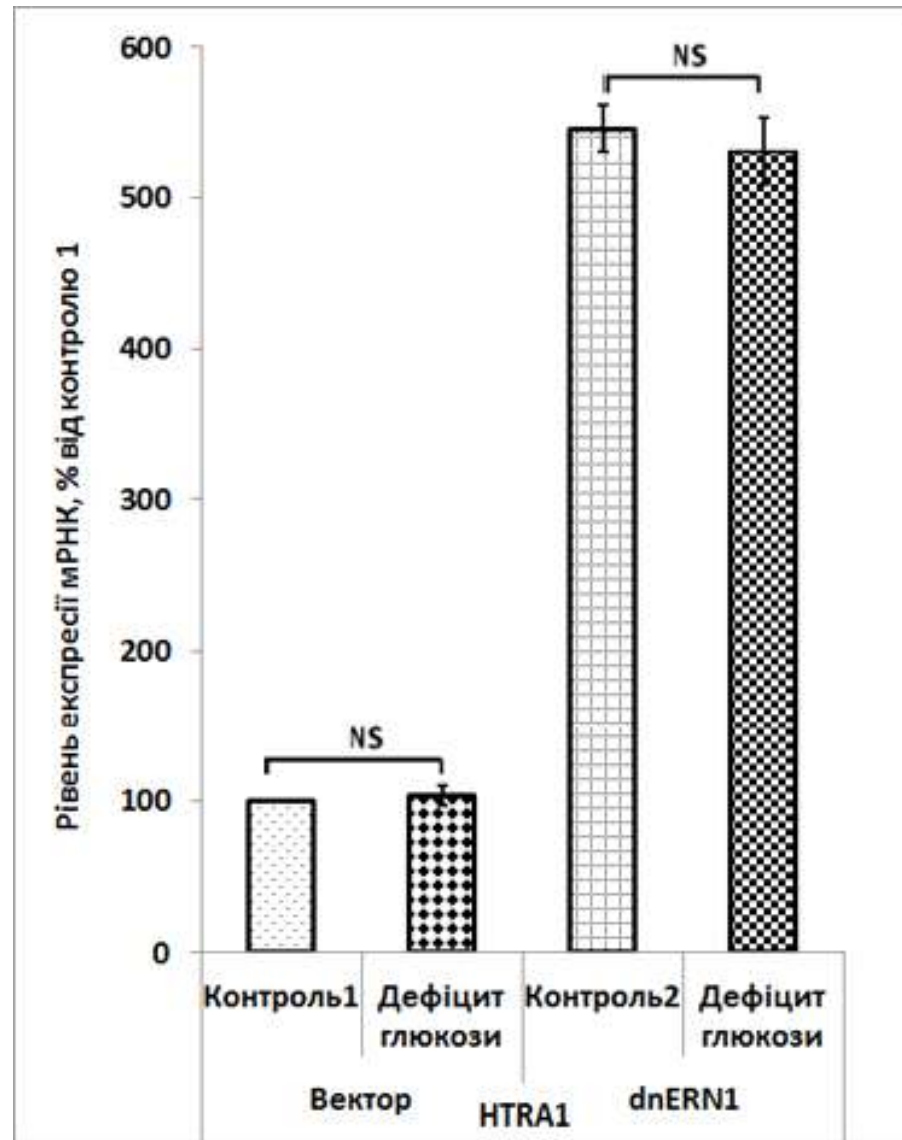


Рис. 3.6.10. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК гена *HTRA1* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ . Контроль 1 – клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфіковані dnERN1.

### **3.7. Експресія генів специфічних до убіквітину протеаз, катепсинів та *HTRA1* за умови дефіциту глютаміну у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму IRE1**

Глутамін є однією із найважливіших амінокислот в організмі і відіграє надзвичайно важливу роль у метаболізмі. Після транспортування до клітин глютамін діє як попередник синтезу багатьох амінокислот, протеїнів, нуклеотидів та інших біологічно важливих молекул, а також забезпечує утворення  $\text{NADPH}^+$  і GSH (глутатіон), підтримуючи гомеостаз клітин. Таким чином, глютамін відіграє надзвичайно важливу роль у процесах росту та розмноження клітин. Глутамін привернув увагу дослідників через те, що його кількість в значній мірі збільшується і активно використовується у більшості пухлинних клітин різних типів у порівнянні з нормальними тканинами. Було доведено, що пригнічення обміну глютаміну є ефективним підходом для сповільнення рівня росту пухлинних клітин, тоді як додавання глютаміну може індукувати або блокувати апоптоз в залежності від типу клітини.

Щоб визначити, чи дефіцит глютаміну регулює експресію генів, які нас цікавлять через ланку відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума IRE1 ми дослідили вплив умов дефіциту глютаміну на експресію генів, що кодують протеазу HTRA1/PRSS11, а також низку специфічних до убіквітину протеаз та катепсинів у двох сублініях клітин гліоми лінії U87, які відрізнялися функціональною активністю IRE1, основного компонента відповіді на незгорнуті протеїни.

Для контрольних клітин гліоми (трансфікованих порожнім вектором) за умов дефіциту глутаміну спостерігалось незначне, але статистично важливе зниження експресії мРНК *USP1* (-13%) у порівнянні з контрольними клітинами гліоми. У той же час, рівень експресії інших генів *USP* не мав значних змін у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну, але для *USP25* рівень експресії підвищився на 22% у порівнянні із контрольними клітинами гліоми (рис. 3.7.1).

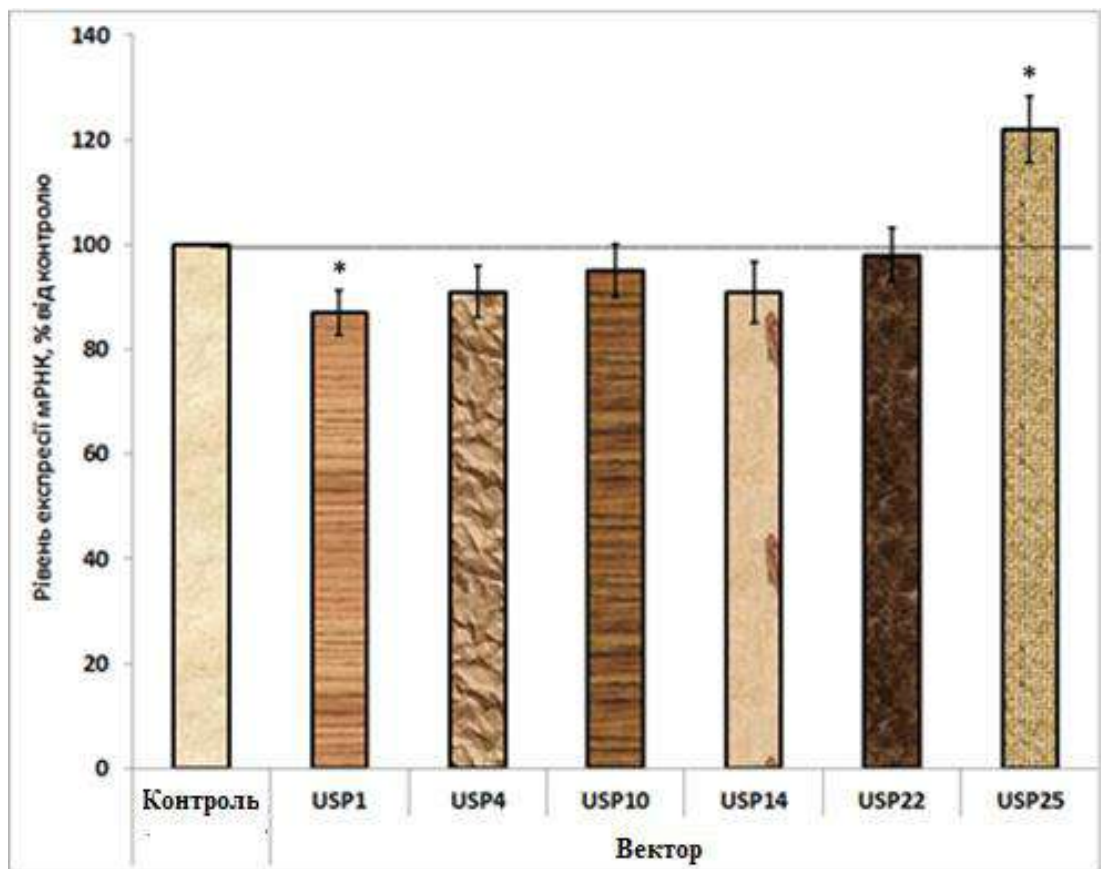


Рис. 3.7.1. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* у клітинах гліоми U87, трансфікованих конструкцією pcDNA3.1 (Вектор). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і представляли як відсоток по відношенню до контролю (контролі для обох типів клітин прийняті за 100%).

У клітинах із пригніченою функціональною активністю IRE1 за умов дефіциту глутаміну рівень експресії генів *USP1*, *USP4* та *USP14* знизився (-32%, -20% та -14%, відповідно). Для генів *USP10* та *USP22* рівень експресії не мав значних змін у клітинах гліоми без функціональної активності IRE1 за умов дефіциту глутаміну у порівнянні із контрольними клітинами гліоми, тоді як для гена *USP25* рівень експресії збільшився на 17% (рис.3.7.2).

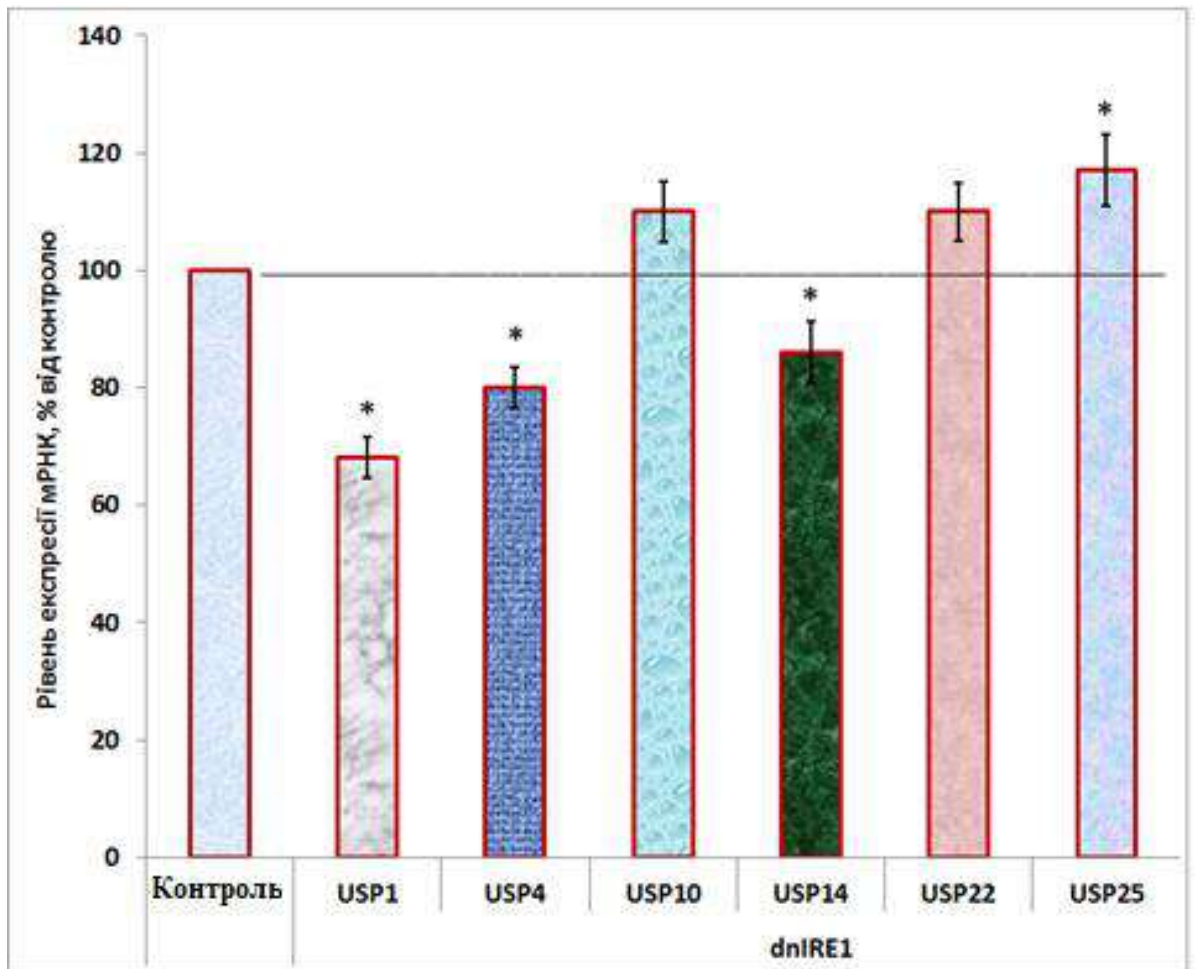


Рис. 3.7.2. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* у клітинах гліоми U87, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і представляли як відсоток по відношенню до контролю (контролі для обох типів клітин прийняті за 100%).

Досліджено, що у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором) за дефіциту глутаміну відбувається позитивна регуляція експресії мРНК *CTSD*, *CTSF*, *CTSO* і *CTSS* (+64%, +34%, +18% і +27%, відповідно) у порівнянні із контрольними клітинами, а для генів *CTSC* та *CTSK* – негативна регуляція експресії (-26% і -15%, відповідно). Необхідно зазначити, що експресія генів *CTSA*, *CTSB* і *CTSL* була резистентною до впливу дефіциту глутаміну у контрольних клітинах гліоми (рис. 3.7.3).

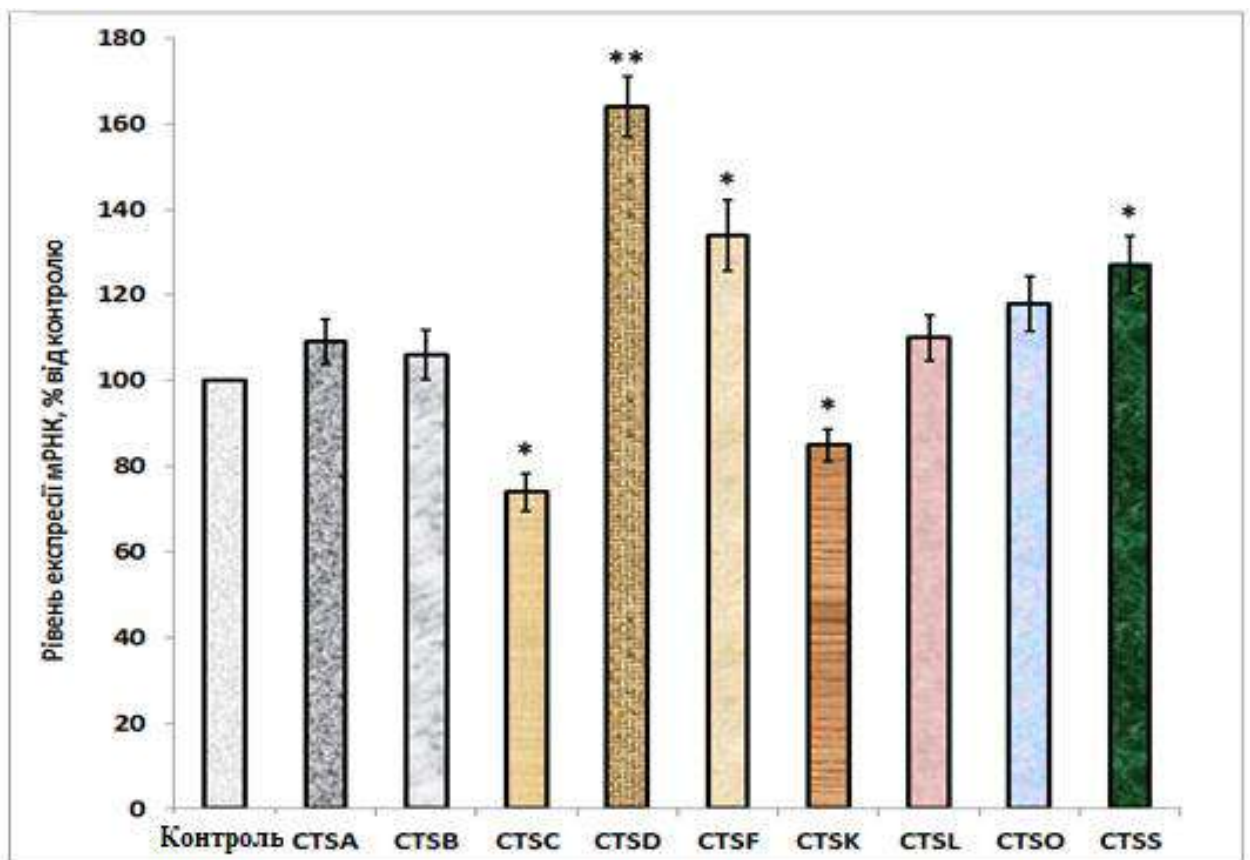


Рис. 3.7.3. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO* та *CTSS* у клітинах гліоми U87, трансфікованих конструкцією рсDNA3.1 (Вектор). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, нормалізували по експресії β-актину і представляли як відсоток по відношенню до контролю (контролі для обох типів клітин прийняті за 100%).

Вияснено, що інгібування функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до значного підвищення рівня експресії генів *CTSD*, *CTSF* і *CTSS* (+38%, +40% і +55%, відповідно) у порівнянні із контрольними клітинами, що містили конструкцію dnIRE1. У той же час, для гена *CTSO* дефіцит глутаміну не спричинив значних змін експресії у клітинах без функціонально-активного IRE1. Для генів *CTSC* та *CTSK* рівень експресії мРНК знижується (-31% та -19%, відповідно) у порівнянні із клітинами, що росли в середовищі із глутаміном. Пригнічення функцій IRE1 конструкцією dnIRE1 вводить чутливість гена *CTSL* до дефіциту глутаміну (+35%) (рис. 3.7.4).

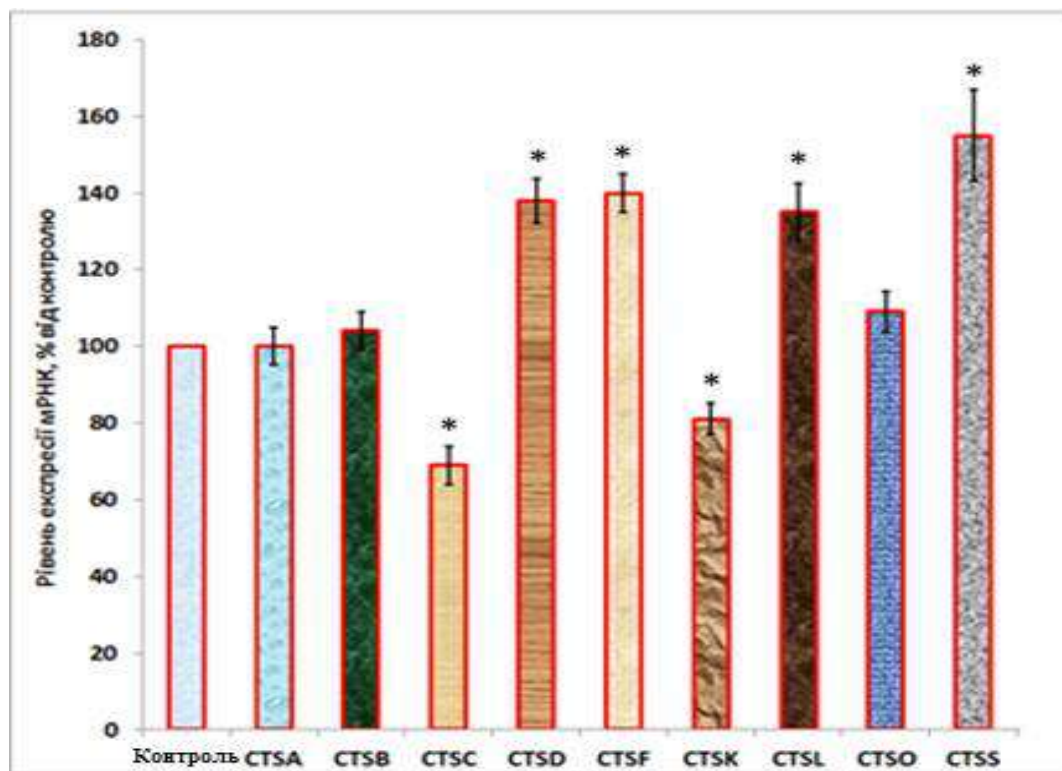


Рис. 3.7.4. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* у клітинах гліоми U87, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, нормалізували по експресії  $\beta$ -актину і представляли як відсоток по відношенню до контролю (контролі для обох типів клітин прийняті за 100%).

Результати досліджень рівня експресії гена *HTRA1* за умов дефіциту глутаміну в залежності від активності IRE1 показано на рис. 3.7.5. Виявлено, що за умов дефіциту глутаміну рівень експресії гена *HTRA1* знижувався на 19 % у контрольних клітинах, тоді як вимкнення сигнального ензиму IRE1 нівелювало цей ефект і не призводило до змін рівня експресії цього гена.

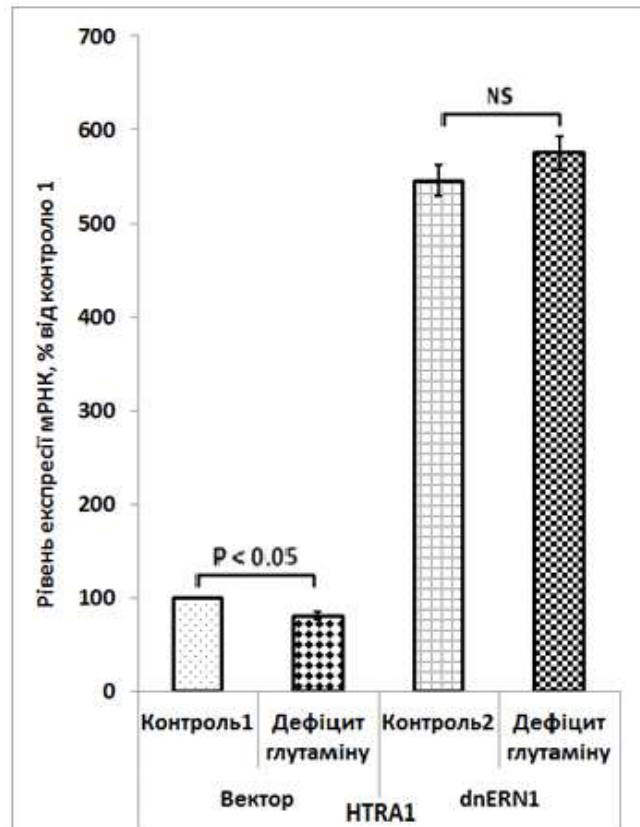


Рис. 3.7.5. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК гена *HTRA1* у клітинах гліоми U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфікованих домінант-негативною конструкцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Рівень експресії визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі і нормалізували по експресії  $\beta$ -актину;  $n = 4$ .

Отже, у цьому розділі висвітлено основні результати щодо змін рівня експресії досліджуваних генів протеаз у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну у середовищі в залежності від IRE1.



## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### 4.1. Роль IRE1-залежного стресу ендоплазматичного ретикулула у регуляції експресії генів протеаз

Протеази є важливою частиною численних регуляторних каскадів клітин і виконують важливу роль біорегуляторів біохімічних процесів як у нормі, так і за різних патологічних станів. У численних літературних даних показано, що вони беруть активну участь у розвитку пухлинних захворювань, причому стрес ендоплазматичного ретикулула відіграє важливу роль у забезпеченні цього процесу. IRE1 є основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулула, який залучений до регуляції функцій великої кількості генів, що беруть активну участь у прогресуванні пухлинних захворювань. Але точні молекулярні механізми IRE1-опосередкованої регуляції активності ключових генів протеаз, які приймають участь у прогресії пухлинних клітин, а саме гліом, досі залишаються невідомими. Тому для дослідження впливу пригнічення сигнального ензиму IRE1 на рівень експресії низки протеаз, а також на процеси проліферації та апоптозу, ми використовували сублінію клітин гліоми U87, яка експресувала домінант-негативний мутант IRE1 (dnIRE1) без ендорибонуклеазної та кіназної активностей і порівнювали із клітинами, що містили функціональний IRE1 для в'яснення ролі пригнічення сигнального ензиму IRE1 у експресії досліджуваних протеаз [163, 164].

Результати досліджень показують, що пригнічення кіназної та ендорибонуклеазної активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до збільшення рівня експресії

більшості генів убіквітин-специфічних протеаз (табл. 4.1.1), які є деубіквітинуючими ензимами і приймають участь у регуляції клітинної проліферації, апоптозу та метастазування.

Таблиця 4.1.1.

Вплив виключення ензиму IRE1 на експресію генів специфічних до убіквітину протеаз

<b>Гени</b>	<b>dnIRE1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми U87</b>	<b>IRE1+міРНК у порівнянні з контрольними клітинами гліоми U87</b>
<i>USP1</i>	+ 70%	+ 47%
<i>USP4</i>	+ 59%	+ 42%
<i>USP10</i>	+ 31%	+ 18%
<i>USP14</i>	- 32%	- 22%
<i>USP22</i>	+ 34%	+ 15%
<i>USP25</i>	+ 73%	+ 42%

Зміни експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25*, які спостерігалися у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1 асоціюються зі сповільненням проліферації клітин із конструкцією dnIRE1. Це підтверджує той факт, що стрес ендоплазматичного ретикулула є необхідною умовою для злоякісного пухлинного росту і клітинного виживання [165-166]. Ці результати перевірені застосуванням альтернативних підходів, таких як використання міРНК, специфічних до IRE1. Зокрема, інгібування мРНК IRE1

специфічними мiPHK у клітинах гліоми лінії U87 призвело до зміни експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25*, яка була подібною до результатів, отриманих із використанням конструкції dnIRE1 (Таблиця 4.1.1). Тим не менш, рівень пригнічення IRE1 після використання мiPHK, які специфічні до цього ензиму, був нижчим у порівнянні із результатами, отриманими у ході проведення дослідів із конструкцією dnIRE1. Це можна пояснити тим, що dnIRE1 ефективніше (більше ніж 95%) інгібує функції IRE1 [166].

Так як рівень експресії мPHK генів *USP1* та *USP14* у клітинах гліоми з пригніченими функціями IRE1 збільшувався найбільш виражено з-поміж усіх досліджуваних генів убiквітин-специфічних протеаз, було досліджено рівень продукції їх протеїнів. Рівень експресії генів цих протеаз узгоджується із рівнями продукції відповідних протеїнів, що було підтверджено вестерн-блот аналізом.

Таким чином, підвищення рівня експресії може впливати на пригнічення клітинної проліферації та росту гліом, так як існують дані [167] про те, що зниження рівня *USP1* у пухлинних клітинах легень може відігравати важливу роль у прогресії пухлин легень через *USP1-PHLPP1-Akt* сигнальну вісь. Інша убiквітин-специфічна протеаза, *USP4*, має різноманітні функції. Експресія цього гена у клітинах гліоми підвищується за умов пригнічення IRE1, і підвищений рівень *USP4* може бути відповідальним за TNF $\alpha$ -індукований апоптоз через деубiквітинацію RIP1 (серин-треонінова кіназа 1, що взаємодіє з рецептором) [168]. Тому спостережені нами зміни рівня експресії гена *USP4* корелюють зі сповільненням клітинної проліферації у клітинах, які містили конструкцію dnIRE1. У той же час, існують дані про те, що надекспресія *USP4* може стимулювати прогресію певних типів пухлинних клітин (169).

Також ми показали, що рівень експресії гена *USP10* позитивно регулюється у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1. Відомо, що *USP10*

пригнічує проліферацію та ріст пухлинних клітин через стабілізацію протеїну p53 та підвищення його активності [170], протидіючи с-Мус транскрипційній активації через стабілізацію SIRT6 для пригнічення формування пухлини. Дані про те, що пригнічення IRE1 через надекспресію dnIRE1 підвищує рівень експресії гена *USP10* добре узгоджуються із функціональною роллю цього деубіквітинуючого ензиму [171]. Більш того, ці результати узагоджуються із отриманими нами попередніми даними про те, що пригнічення IRE1 позитивно регулює експресію гена *TP53* [163].

Окрім цього, показано, що експресія гена *USP14* значно знижується у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1, тому негативна регуляція експресії цього гена потенційно залучена до пригнічення проліферації клітин гліоми та пухлинного росту, так як USP14 стимулює прогресію пухлин через регуляцію клітинної проліферації та апоптозу злоякісних клітин за карциноми печінки [172-173].

Пригнічення IRE1 позитивно регулює експресію гена *USP22* у клітинах гліоми. Ці результати узгоджуються із даними про те, що USP22 інгібує інвазивну здатність пухлинних клітин товстої кишки шляхом пригнічення сигнального трансдуктора і активатора транскрипції 3/матричної металопротеїнази 9 [174]. У той же час, відомо, що USP22 індукує епітеліально-мезенхімальний перехід, який відіграє важливу роль у міграції та інвазії пухлинних клітин. Тим не менш, цей деубіквітинуючий ензим залучений до процесу пухлинної прогресії як регулятор клітинного циклу і може прибирати убіквітин із гістонів, регулюючи тим самим транскрипцію генів [175]. Більш того, мітоген-активуюча протеїнкіназа p38, яка відіграє важливу роль у стрес-залежній транскрипції і регуляції клітинного циклу, пригнічує транскрипцію *USP22* у клітинах HeLa [164].

Також показано, що пригнічення IRE1 призводить до позитивної регуляції експресії гена *USP25* у клітинах гліоми, знижуючи цим рівень проліферації, але одночасно і збільшуючи інвазивність та метастазування

[176]. Наші результати узгоджуються із даними про те, що мiPHK-200с, яка залучена до процесу онкогенезу і проявляє пригнічувальний ефект на розвиток пухлинних клітин легень людини, інгібує інвазію та метастазування цих клітин шляхом пригнічення експресії *USP25*. У той же час, експресія цього гена також необхідна для ERAD не згорнутих протеїнів: *USP25* протидіє убiквітинації субстратів ERAD завдяки убiквітинлігазі *HRD1*, яка запобігає їх деградації у протеосомі.

Окрім цього, нами було досліджено зміну рівень експресії низки генів катепсинів у клітинах гліоми лінії U87 за умови пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

Було виявлено, що вимкнення функцій сенсорно сигнального ензиму IRE1 призводить до значної позитивної регуляції експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSO* та *HTRA1*. У той же час, для генів *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* і *CTSS* рівень експресії знижувався після пригнічення IRE1 (табл. 4.1.2).

Таблиця 4.1.2.

Вплив пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 на експресію генів катепсинів та *HTRA1*

Гени	<i>CTSA</i>	<i>CTSB</i>	<i>CTSC</i>	<i>CTSD</i>	<i>CTSF</i>	<i>CTSK</i>	<i>CTSL</i>	<i>CTSO</i>	<i>CTSS</i>	<i>HTRA1</i>
<b>dnIRE1</b>	+110%	+60%	-65%	+105%	+135%	-17%	-66%	+85%	-94%	+450%

Отримані результати вказують на те, що пригнічення функцій сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 змінює рівень експресії досліджуваних протеаз по-різному, але усі вони є чутливими до функціонального стану IRE1. Це означає, що регуляція експресії цих генів залежить від ензиматичної активності IRE1.

Після цього було проведено дослідження впливу гіпоксії, яка є одним із основних факторів стресу ендоплазматичного ретикулула і невід'ємною умовою, необхідною для росту пухлинних клітин, на експресію генів протеаз за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

#### **4.2. Гіпоксична регуляція експресії генів протеаз за умови пригнічення функцій ензиму IRE1**

Гіпоксія є характерною рисою більшості злоякісних пухлин і тісно пов'язана не лише з ростом пухлин, а і з метастазуванням та резистентністю до лікування. Це один із обов'язкових факторів злоякісного росту, оскільки виражено активує процеси проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу і пентозо-фосфатного циклу, через що пухлинні клітини характеризуються посиленням гліколізом та високим рівнем лактату і пірувату, що корелює зі збільшеним рівнем експресії ензимів гліколізу та переносників глюкози завдяки механізмам, опосередкованим транскрипційним фактором HIF (фактор, що індукується за гіпоксії). Стрес ендоплазматичного ретикулула є одним із центральних облігатних факторів росту злоякісних пухлин, оскільки він забезпечує такі зміни в метаболізмі клітин, які направлені на активацію ростових та прозапальних процесів, активує ангіогенез, а також толерантність до гіпоксії, причому як стрес ендоплазматичного ретикулула, так і прозапальні процеси поширюються від пухлинних до мієлоїдних клітин.

У цьому досліді ми вивчали гіпоксичну регуляцію експресії низки генів протеаз для вивчення їх можливої взаємодії із IRE1-опосередкованим

стресом ендоплазматичного ретикулула. Показано, що гіпоксія впливає на експресію більшості генів убіквітин-специфічних протеаз (табл. 4.2.1).

Таблиця 4.2.1.

Вплив гіпоксії на експресію генів протеаз за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Гіпоксія у порівнянні із контролем	Гіпоксія + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>USP1</i>	+70%	-36%	-33%
<i>USP4</i>	+60%	Без змін	Без змін
<i>USP10</i>	+33%	-34%	-24%
<i>USP14</i>	-32%	-21%	-25%
<i>USP22</i>	+35%	Без змін	-17%
<i>USP25</i>	+75%	+18%	+25%

Більше того, пригнічення IRE1 модифікує ефект гіпоксії на експресію генів *USP10* та *USP22*, і це вказує на участь сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1 у їх гіпоксичній регуляції. Саме тому гіпоксія, виступаючи важливим фактором росту пухлин, пригнічує експресію генів *USP1* та *USP10* на відміну від пригнічення IRE1. Тим не менш, вплив гіпоксії на експресію гена *USP1* не залежить від функціонального стану IRE1. У той же час, чутливість експресії гена *USP10* до гіпоксії знижується у клітинах із dnIRE1.

Також ми показали, що експресія генів *USP4* та *USP22* у контрольних клітинах гліоми є резистентною до гіпоксії, але пригнічення IRE1 призводить до негативної регуляції експресії гена *USP22* за гіпоксії.

Крім цього, дослідили вплив гіпоксії на рівень продукції протеїнів USP1 та USP14 у контрольних клітинах гліоми та клітинах із пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму IRE1 за допомогою методу Вестерн-блоту. Як показано на рис.3.4.12, гіпоксія знижує рівень продукції цих протеїнів у обох типах клітин гліоми, і ці зміни за умов гіпоксії узгоджуються із змінами рівеньв мРНК відповідних даним протеїнам генів.

Отже, гіпоксія впливає на експресію більшості досліджуваних генів специфічним чином по відношенню до кожного з них, причому гіпоксична регуляція деяких генів залежить від функціонального стану IRE1 і має проліферативний ефект. Раніше було показано, що пригнічення IRE1 в значній мірі пригнічує експресію гена *EPAS1* у клітинах гліоми, який контролює специфічну групу чутливих до гіпоксії генів [177]. Функціональна роль гіпоксичної регуляції досліджуваних генів досі не ясна до кінця, тому що існує ряд регуляторних механізмів їх експресії, які й визначають генно-специфічний характер цієї регуляції. Експресія більшість досліджених нами генів залежать як від стресу ендоплазматичного ретикулума, так і від гіпоксії, а також можливо беруть участь у регуляції апоптозу та клітинної проліферації. Але механізми та функціональне значення активації чи пригнічення їх експресії гіпоксією є різними і потребує подальшого дослідження. Зміни експресії досліджуваних генів частково узгоджуються зі зниженням рівня проліферації клітин гліоми, які містять конструкцію dnIRE1, і це вказує на перспективність цього підходу для розробки заходів протипухлинної терапії.

Крім цього, було показано, що гіпоксія в значній мірі впливає на експресію більшості досліджуваних генів катепсинів у клітинах гліоми лінії U87, і пригнічення функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 модифікує



вплив гіпоксії на експресію цих генів специфічним чином для кожного із них, як і для раніше досліджених генів, які відповідають за стрес ендоплазматичного ретикулула (табл. 4.2.2).

Таблиця 4.2.2.

Вплив гіпоксії на експресію генів катепсинів, *HTRA1* та *STC2* за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Гіпоксія у порівнянні із контролем	Гіпоксія + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>CTSA</i>	+111%	+33%	Без змін
<i>CTSB</i>	+60%	+25%	+45%
<i>CTSC</i>	-66%	-53%	-54%
<i>CTSD</i>	+208%	+46%	-17%
<i>CTSF</i>	+134%	+52%	+19%
<i>CTSK</i>	-15%	+43%	+28%
<i>CTSL</i>	-66	-16	-26
<i>CTSO</i>	+85%	-33%	-31%
<i>CTSS</i>	-93%	-17%	+86%
<i>STC2</i>	+600%	+700%	+410%
<i>HTRA1</i>	+450%	Без змін	+10%

Рівень експресія генів катепсина А і катепсина В, які відіграють важливу роль за розвитку онкологічних захворювань [178] зростає у контрольних клітинах за гіпоксії, але вимкнення функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 робить ген катепсина А нечутливим до гіпоксії, а для катепсина В – підвищує чутливість. Можливим є те, що регуляція експресії цих генів гіпоксією опосередкована IRE1, і блокування його функцій змінює чутливість експресії генів *CTSA* і *CTSB* до гіпоксії, що узгоджується із функціональною роллю цих протеаз, а також із пригніченням проліферації клітин гліоми [179]. Надекспресія *CTSA* асоціюється із відповіддю на оксидативний стрес клітин і залучена до процесу розвитку пухлин та метастазування через деградацію екстрацелюлярного матриксу [180].

Гіпоксія також індукує рівень експресії генів, *CTSD*, *CTSF* і *CTSK* у контрольних клітинах гліоми, а для генів *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS* – знижує у цьому типі клітин гліоми. У той же час, пригнічення функцій IRE1 здійснює зворотній ефект на чутливість експресії цих генів до гіпоксії. Можливо, що усі ці катепсини залучені до протікання патологічних процесів і більшість із них беруть участь у процесах пухлинної інвазії та метастазування [181]. Майже ідентична субстратна специфічність була визначена для катепсинів К, L і S, але більшість катепсини виконують специфічні функції і по різному змінюють свою активність за умов гіпоксії.

Цікаво відмітити, що для експресії гена *STC2* за умов гіпоксії спостерігалася значна позитивна регуляція, але лише для клітин без функціонально-активного IRE1. За умов гіпоксії рівень експресії цього гена зростав у контрольних клітинах гліоми у порівнянні із клітинами з пригніченими функціями IRE1. Так як *STC2* захищає *IGFBP4* від деградації завдяки протеолітичному інгібуванню ріст-стимулюючої металопротеази, позитивна регуляція експресії цього багато функціонального гена у клітинах гліоми після пригнічення IRE1 може бути залучена до пригнічення

проліферації цих клітин гліоми. Для гена *HTRA1* не відбувається значних змін рівня експресії у контрольних клітинах гліоми, тоді як за умов вимкнення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 спостерігалось незначне, але статистично важливе збільшення рівня експресії.

Наші результати демонструють, що вплив гіпоксії на рівень експресії генів усіх досліджуваних протеаз залежить від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, тому що його пригнічення в значній мірі змінює гіпоксичну регуляцію експресії цих генів: нівелює вплив гіпоксії на ген *CTSA*, вводить зворотні зміни для генів *CTSD* і *CTSS*, знижує чутливість – для генів *CTSF* і *CTSK*, і підвищує чутливість для генів *STC2*, *CTSB* і *CTSL*. Усі досліджені гени реагують на гіпоксію IRE1-залежним чином і потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, метастазування і апоптозу через різні сигнальні шляхи. Узагальнені результати зміни рівеньв експресії представлені на рис. 4.2.1.

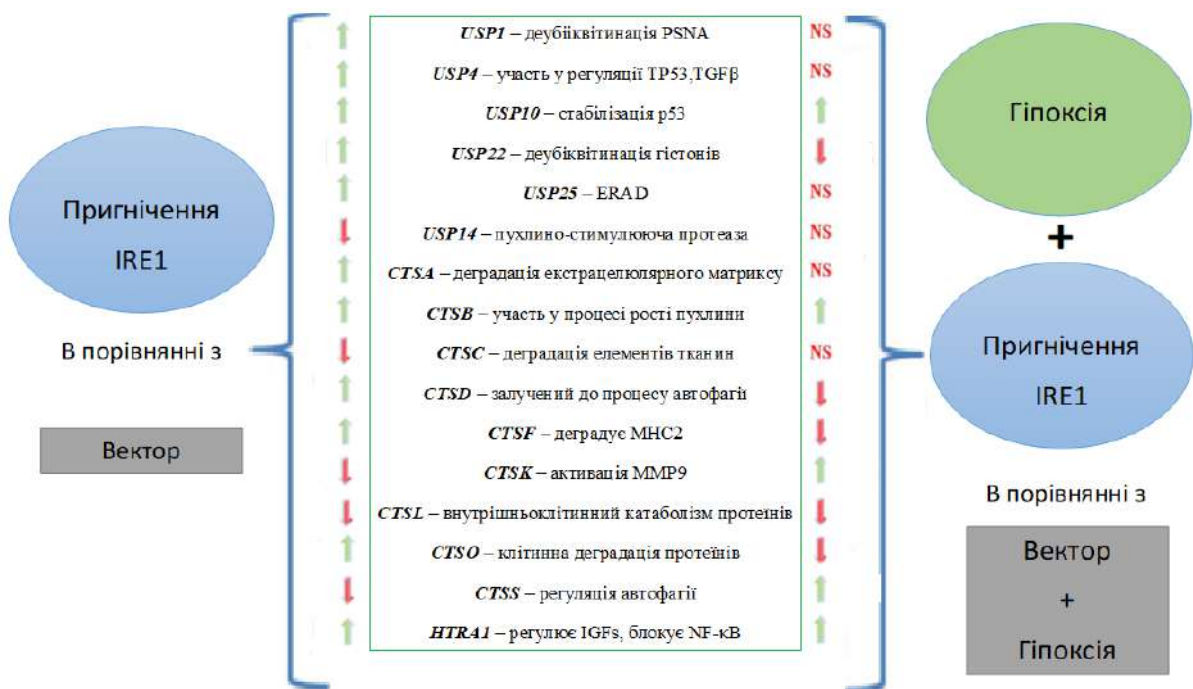


Рис. 4.2.1. Схематичне зображення впливу гіпоксії на зміну рівня експресії генів протеаз за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Наступним етапом даної роботи було дослідити, як зміниться рівень експресії генів протеаз за дефіциту глутаміну в залежності від функціонального стану IRE1.

#### **4.3. Вплив дефіциту глутаміну на регуляцію експресії генів протеаз за умов пригнічення IRE1**

У цій серії експериментів ми вивчали вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії генів досліджуваних протеаз в залежності від функціонального стану сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1.

Показано, що експресія генів специфічних до убіквітину протеаз *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22* та *USP25* є нечутливою до дефіциту глутаміну у контрольних клітинах гліоми (трансфікованих порожнім вектором), так як він не змінював рівень експресії досліджуваних генів (Табл. 4.3.1). У контрольних клітинах гліоми дефіцит глутаміну впливав лише на експресію генів *USP1* та *USP25*. Можливим є те, що резистентність більшості досліджуваних специфічних до убіквітину протеаз до дефіциту глутаміну пов'язана з важливими біологічними функціями, які виконують ці ензими для забезпечення протікання метаболічних процесів, клітинної проліферації та виживання [182]. Пригнічення функцій сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 збільшує вплив дефіциту глутаміну на експресію гена *USP1* і вводить чутливість до цих умов для генів *USP4* та *USP14*. Зниження рівня експресії мРНК *USP1*, *USP4* та *USP14* за умов дефіциту глутаміну добре узгоджується із функціональною роллю цих ензимів та пригніченням проліферації клітин гліоми, тому що існують дані про те, що *USP1* пригнічує ріст гліобластом, а *USP4* та *USP14* беруть участь у регуляції клітинної проліферації та апоптозу (183).

Таблиця 4.3.1

Вплив дефіциту глутаміну на експресію генів USP за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глутаміну у порівнянні із контролем	Дефіцит глутаміну + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>USP1</i>	+70%	-13%	-32%
<i>USP4</i>	+60%	Без змін	-20%
<i>USP10</i>	+33%	Без змін	Без змін
<i>USP14</i>	-32%	Без змін	-14%
<i>USP22</i>	+35%	Без змін	Без змін
<i>USP25</i>	+75%	+22%	+17%

Таким чином, пригнічення функцій IRE1 змінює чутливість експресії генів *USP1*, *USP4* та *USP14* до дефіциту глутаміну у клітинах гліоми лінії U87. Пригнічення експресії гена *USP1* дефіцитом глутаміну є більш значущим для клітин гліоми трансфікованих конструкцією dnIRE1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми. Більше того, експресія генів *USP4* та *USP14*, які є резистентними до дефіциту глутаміну у контрольних клітинах гліоми, збільшувалася після інгібування функцій сигнального ензиму IRE1. У той же час, пригнічення IRE1 не змінює чутливість експресії генів *USP10* та *USP25* до умов дефіциту глутаміну у цих клітинах гліоми.

Окрім цього, було виявлено, що пригнічення функцій ензиму IRE1 у клітинах гліоми U87 змінює вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *HTRA1*, *CTSD*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS*, а для генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSF* та *CTSK*

зберігається чутливість експресії до цих експериментальних умов (табл. 4.3.2).

Таблиця 4.3.2

Вплив дефіциту глутаміну на експресію генів катепсинів та *HTRA1* за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глутаміну у порівнянні із контролем	Дефіцит глутаміну + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>CTSA</i>	+111%	Без змін	Без змін
<i>CTSB</i>	+60%	Без змін	Без змін
<i>CTSC</i>	-66%	-26%	-31%
<i>CTSD</i>	+208%	+64%	+38%
<i>CTSF</i>	+134%	+34%	+40%
<i>CTSK</i>	-15%	-15%	-19%
<i>CTSL</i>	-66	Без змін	+35%
<i>CTSO</i>	+85%	+18%	Без змін
<i>CTSS</i>	-93%	+27%	+55%
<i>HTRA1</i>	+450%	-19%	+6%

Вимкнення функцій IRE1 у клітинах гліоми в значній мірі посилює вплив гіпоксії на експресію гена *CTSS*, але робить нечутливим до гіпоксії експресію генів *HTRA1* і *CTSO*. Експресія мРНК *CTSL* була нечутливою до відсутності глутаміну у поживному середовищі у контрольних клітинах із функціонально активним IRE1, але після інгібування ензиматичних

активностей IRE1 експресія цього гена стала залежною від дефіциту глутаміну, вказуючи на те, що позитивна регуляція експресії цього гена нестачею глутаміну є IRE1-залежною. Чутливість експресії гена *CTSD* до дефіциту глутаміну також є IRE1-залежною, так як пригнічення IRE1 знижує вплив нестачі глутаміну на експресію цього гена. Крім того, ми виявили, що експресія генів, які кодують катепсин А та катепсин В є нечутливими до умов дефіциту глутаміну у клітинах гліоми із конструкцією dnIRE1.

Отже, більшість досліджуваних генів чутливі до дефіциту глутаміну IRE1-залежним чином і потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, метастазування та апоптозу через різні сигнальні шляхи. Отримані дані узагальнені на рисунку 4.3.1.

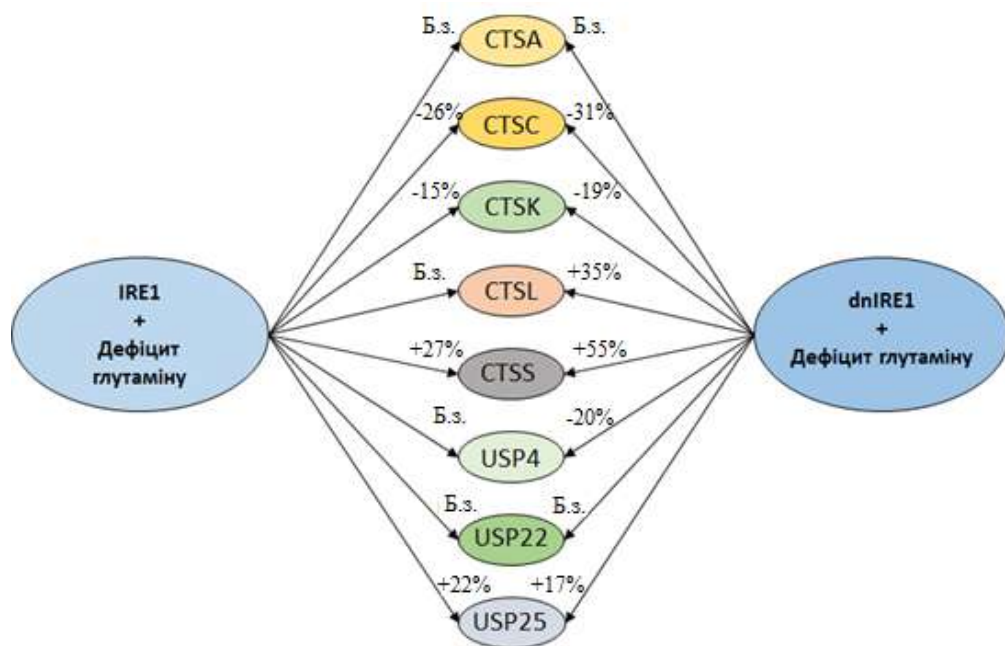


Рис. 4.3.1. Схематичне зображення впливу дефіциту глутаміну на рівень експресії генів протеаз за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

Наступним кроком було в'яснити, як впливає дефіцит глюкози на експресію генів, які нас цікавили, в залежності від активності сигнального ензиму IRE1.

#### **4.4. Роль дефіциту глюкози у регуляції експресії генів протеаз за умови вимкнення ензиматичних функцій сигнального ензиму IRE1**

У цій серії дослідів ми досліджували вплив дефіциту глюкози, яка є важливим фактором, необхідним для росту пухлинних клітин, на експресію генів протеаз за умови вимкнення обох ензиматичних функцій IRE1. Показано, що дефіцит глюкози впливає на експресію більшості генів, які кодують убіквітин-специфічні протеази IRE1-залежним шляхом, і ці гени можливо залучені до регуляції клітинної проліферації, апоптозу та метастазування (табл. 4.4.1).

За нестачі глюкози рівень експресії *USP10* позитивно регулюється у клітинах гліоми за умов пригнічення функцій IRE1, у той час як експресія гена *USP1* не залежить від функціональної активності IRE1.

Також ми виявили, що експресія гена *USP14* у значній мірі негативно регулюється у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнальних функцій ензиму IRE1 і, таким чином, має сприяти пригніченню проліферації клітин гліоми і росту пухлини, тому що *USP14* сприяє прогресії через регуляцію клітинної проліферації і апоптозу пухлинних клітин карциноми печінки [183].

Існують дані про те, що *USP22* індукує епітеліально-мезенхімальний перехід, який відіграє важливу роль у міграції та інвазії пухлинних клітин. Тим не менш, відомо, що цей деубіквітинуючий ензим залучений у процес прогресії пухлинних клітин як регулятор клітинного циклу і може прибирати



убіквітин із гістонів, тим самим регулюючи транскрипцію генів [184]. Таким чином, ці дані узгоджуються із нашими результатами про те, що вимкнення функцій IRE1 позитивно регулює рівень мРНК *USP22* за відсутності глюкози.

Крім того, дефіцит глюкози так само як і пригнічення IRE1 призводить до позитивної регуляції експресії гена *USP25* у клітинах гліоми, які мають знижений рівень проліферації, але збільшений темп інвазії і метастазування. Крім того, пригнічення функцій IRE1 збільшує чутливість експресії цього гена до дефіциту глюкози.

Таблиця 4.4.1.

Вплив дефіциту глюкози на експресію генів USP за умови виключення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глюкози у порівнянні із контролем	Дефіцит глюкози + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>USP1</i>	+70%	-27%	-22%
<i>USP4</i>	+60%	+25%	+35%
<i>USP10</i>	+33%	-19%	Без змін
<i>USP14</i>	-32%	Без змін	Без змін
<i>USP22</i>	+35%	Без змін	Без змін
<i>USP25</i>	+75%	+41%	+63%

Отже, наші результати демонструють, що більшість досліджуваних генів є чутливими як до дефіциту глюкози IRE1-залежним чином, так і до стресу ендоплазматичного ретикулума і можливо беруть участь у регуляції апоптозу та клітинного циклу, але точні молекулярні механізми та функціональне значення активації чи пригнічення їх експресії як через інгібування IRE1, так і через дефіцит глюкози є різними і потребують подальшого дослідження.

В наступній серії дослідів показано, що вплив дефіциту глюкози на експресію більшості генів, які кодують катепсини і протеазу HTRA1, є переважно IRE1-залежним, і ці гени потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, апоптозу і метастазування.

Експресія катепсинів А та В, які відіграють важливі ролі у процесах онкогенезу та автофагії [185] зростає у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози, але пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 прибирає чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози. Можливо, що регуляція експресії генів *CTSA* і *CTSB* дефіцитом глюкози опосередкована IRE1 і блокування функцій цього сигнального ензиму знижує чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози.

Дефіцит глюкози також індукує експресію генів *CTSD*, *CTSK*, *CTSL* і *CTSO* у контрольних клітинах гліоми, але експресія *CTSC*, *CTSF* та *CTSS* є нечутливою до дефіциту глюкози. У той же час, пригнічення IRE1 має різний вплив на чутливість експресії цих генів до дефіциту глюкози. Можливим є те, що усі ці катепсини залучені до процесів пухлинної інвазії та метастазування [186]. Більше того, була визначена подібна субстратна специфічність для катепсинів К, L і S, але майже усі катепсини здійснюють специфічні функції та по різному реагують на дефіцит глюкози [187]. Узагальнені дані по змінам експресії досліджуваних генів представлені у таблиці 4.4.2.

Таблиця 4.4.2.

Вплив дефіциту глюкози на експресію генів катепсинів та *HTRA1* за умови вимкнення сенсорно-сигнального ензиму IRE1

Гени	dnIRE1 у порівнянні з контролем	Дефіцит глюкози у порівнянні із контролем	Дефіцит глюкози + dnIRE1 у порівнянні із dnIRE1
<i>CTSA</i>	+111%	+49%	Без змін
<i>CTSB</i>	+60%	+16%	Без змін
<i>CTSC</i>	-66%	Без змін	+23%
<i>CTSD</i>	+208%	+60%	+55%
<i>CTSF</i>	+134%	Без змін	Без змін
<i>CTSK</i>	-15%	+113%	+47%
<i>CTSL</i>	-66	+16%	+74%
<i>CTSO</i>	+85%	+24	Без змін
<i>CTSS</i>	-93%	Без змін	+50%
<i>HTRA1</i>	+450%	Без змін	-3%

Наші результати демонструють, що більшість досліджуваних генів є чутливими до дефіциту глюкози в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1 і потенційно залучені до регуляції клітинної проліферації, метастазування та апоптозу через різноманітні сигнальні шляхи, а зміни експресії досліджуваних генів частково узгоджуються зі сповільненням рівня проліферації клітин гліоми, які містили dnIRE1 (рис.4.4.1.).

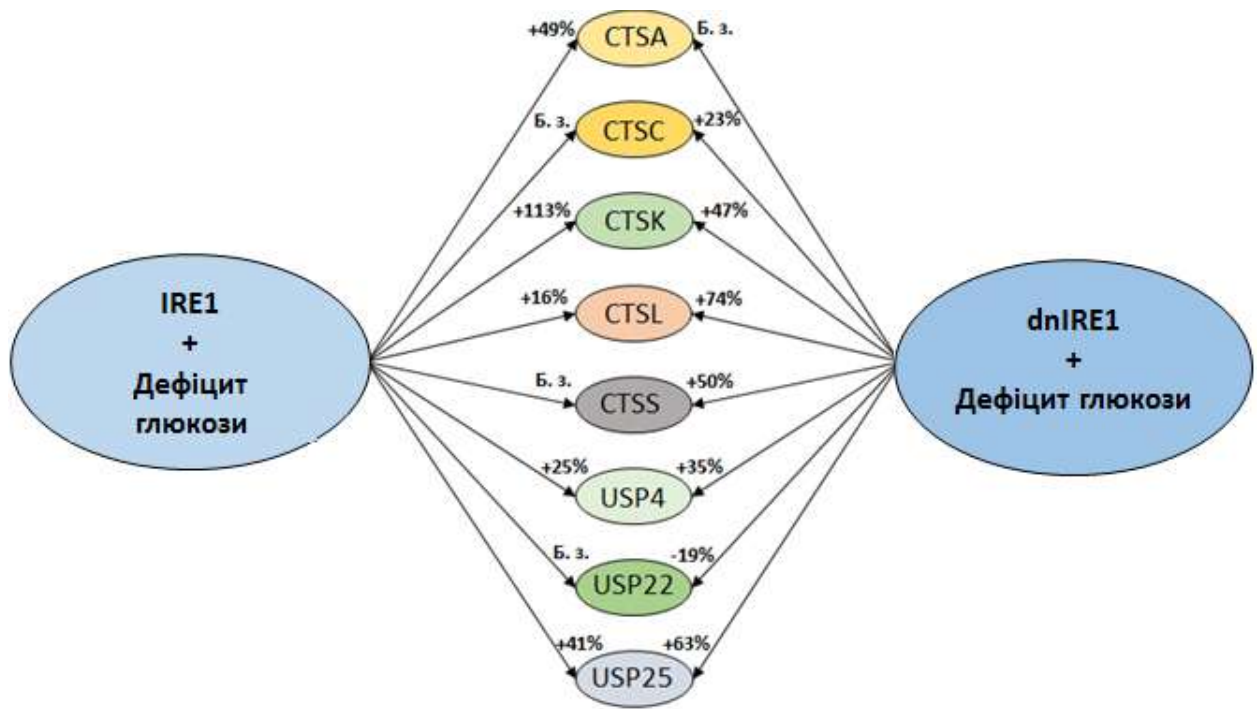


Рис. 4.4.1. Схематичне зображення впливу дефіциту глюкози на рівень експресії генів протеаз за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

У ході проведення досліджень було отримано дані, які свідчать про те, що сенсорно-сигнальний ензим стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 значною мірою впливає на експресію генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS* та *STC2*.

Злоякісні гліоми є високоагресивними пухлинами із дуже поганою прогнозованістю і на даний час немає засобів для їх ефективного лікування. Помірна ефективність стандартних клінічних підходів підкреслює необхідність нових терапевтичних стратегій. Стрес ендоплазматичного ретикулума відповідальний за підсилення проліферації пухлинних клітин, і вимкнення функцій IRE1 домінант-негативною конструкцією IRE1 (dnIRE) здійснює значний антипроліферативний ефект на ріст гліоми. Швидкий ріст твердих пухлин створює зміни у мікросередовищі, що призводять до гіпоксії, дефіциту поживних речовин і ацидозу, спричиняючи неоваскуляризацію, виживання і проліферацію клітин. Активація стресу ендоплазматичного ретикулума є обов'язковою для росту пухлин, так як він полегшує адаптації до стресових умов середовища клітини. IRE1 є найбільш еволюційно консервативним сенсорно-сигнальним ензимом, який відповідає за згортання протеїнів завдяки високочутливій програмі, метою якої зняття стресу або направлення клітини на апоптоз, якщо стрес став занадто великим, що робить IRE1 ключовим регулятором життя та смерті клітин.

У даній роботі було продемонстровано, що за умов пригнічення обох ензиматичних функцій сенсорно-сигнального ензиму IRE1 рівень експресії генів *USP14*, *CTSC*, *CTSK*, *CTSL* та *CTSS* – знижується, тоді як для всіх інших генів спостерігалось збільшення рівня експресії їх мРНК, що вказує на IRE1-залежну регуляцію їх експресії.

Крім того, була встановлена залежність варіювання рівеньв експресії генів *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP14*, *USP22*, *USP25*, *CTSA*, *CTSB*, *CTSC*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *CTSS*, *HTRA1* та *STC2* за умов дефіциту глутаміну та глюкози, а також гіпоксії, які є основними компонентами стресу ендоплазматичного ретикулума, від активності основного сенсорно-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума – IRE1.

Виявлено, що зміни рівня експресії досліджених генів, які спостерігалися за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87, можуть бути використані з метою пригнічення росту пухлинних клітин. Таким чином, отримані в результаті виконання даної роботи дані можуть стати вагомим внеском у розуміння механізмів опосередкованого IRE1 контролю росту злоякісних пухлин, зокрема гліом, та ідентифікації нових перспективних мішеней для розробки нових стратегій протипухлинної терапії.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз і експериментальне рішення актуальної наукової задачі щодо ролі експресії деяких генів протеаз у зниженні проліферативного потенціалу клітин гліоми, опосередкованому пригніченням сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1, а також залежності їх експресії від гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози, що необхідно для розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі IRE1-опосередкованого контролю проліферації пухлинних клітин і можуть сприяти ідентифікації нових потенційних генів-мішеней для розробки протипухлинних препаратів.

1. Встановлено, що пригнічення активності сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводить до посилення рівня експресії генів протеаз, специфічних до убіквітину: *USP1*, *USP4*, *USP10*, *USP22* та *USP25*.

2. Показано, що за пригнічення активності IRE1 збільшувався рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSF* і *CTSO*, тоді як генів *CTSC*, *CTSL*, *CTSK* та *CTSS* – знижувався.

3. Встановлено, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *USP1*, *USP10*, *USP14*, *CTSC*, *CTSL*, *CTSO* і *CTSS* у контрольних клітинах гліоми, а інших генів – підвищує, причому пригнічення IRE1 знімало ефект гіпоксії на експресію гена *CTSA*, послаблювало експресію генів *USP1*, *USP10*, *CTSF* та *CTSK* і посилювало експресію генів *USP25*, *CTSB* та *CTSL*.

4. Показано, що за умов дефіциту глюкози рівень експресії генів *CTSA*, *CTSB*, *CTSD*, *CTSK*, *CTSL*, *CTSO*, *USP4* та *USP25* збільшувався, а генів *USP1* та *USP10* знижувався у контрольних (трансфікованих порожнім вектором) клітинах гліоми, а пригнічення активності IRE1 по-різному змінювало ефект дефіциту глюкози на рівень експресії більшості досліджених генів.

5. Встановлено, що у контрольних клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну рівень експресії генів *USP1*, *HTRA1*, *CTSC* і *CTSK* знижувався, а

генів *USP25*, *CTSD*, *CTSF*, *CTSO*, *CTSS* підвищувався і що пригнічення сигнального ензиму IRE1 по-різному змінювало чутливість експресії генів більшості протеаз до дефіциту глутаміну.



**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Trusevych E. H. Proteases and their receptors as mediators of inflammation-associated colon cancer / E. H. Trusevych, W. K. MacNaughton // *Curr. Pharm. Des.* – 2015. – Vol. 21, N 21. – P. 2983 – 2992.
2. Lai Z.W. The emerging role of the peptidome in biomarker discovery and degradome profiling / Z.W. Lai, A. Petrera, O. Schilling // *Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 396, N 3. – P. 185 – 192.
3. Ahmad A. Metastasis: Other Side of the Coin / A. Ahmad, S. Komai // *Front. Oncol.* – 2015. – Vol. 4, N 5. – P. 163.
4. A biotechnology perspective of fungal proteases / M. L. Bittencourt, C. C. Caprara, R. P. de Almeida, [et al.] // *Braz. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46, N 2. – P. 337 – 346.
5. Hartman A. M. Structure-Based optimization of inhibitors of the aspartic protease endothiapepsin / A. M. Hartman, A. K. Hirsch // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16, N 8. – P. 19184 – 19194.
6. Zhou J. I. Evolutionary history of cathepsin L (L-like) family genes in vertebrates / J. I. Zhou, Y. Y. Zhang, Q. Y. Li, Z. H. Cai // *Int. J. Biol. Sci.* – 2015. – Vol. 11, N 9. – P. 1016 – 1025.
7. McGlinchey R. P. Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein / R. P. McGlinchey, J. C. Lee // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112, N 30. – P. 9322 – 9327.
8. Fonović M. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation / M. Fonović, B. Turk // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1840, N 8. – P. 2560 – 2570.
9. Kolhatkar V. Dendritic hexadecapeptide as a cathepsin B degradable carrier for delivery of HSP90 inhibitor / V. Kolhatkar, J. Suárez, R. Kolhatkar // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25, N 17. – P. – 3744 – 3747.

10. Cystatin B as a potential diagnostic biomarker in ovarian clear cell carcinoma / A. Takaya, W. X. Peng, K. Ishino, [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2015. – Vol. 46, N 4. – P. – 1573 – 1581.
11. Expression of cysteine protease cathepsin L is increased in endometrial cancer and correlates with expression of growth regulatory genes / M. Skrzypczak, A. Springwald, C. Lattrich, [et al.] // *Cancer Invest.* – 2012. – Vol. 30, N 5. – P. – 398 – 403.
12. Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer / D. Dian, S. Heublein, I. Wiest, [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2014. – Vol. 29, N 4. – P. 433 – 438.
13. A prognostic model for triple-negative breast cancer patients based on node status, cathepsin-D and Ki-67 index / L. Huang, Z. Liu, S. Chen, [et al.] // *PLoS. One.* – 2013. – Vol. 10, N 8. – P. 12.
14. Proteomic profiling of N-linked glycoproteins identifies ConA-binding procathepsin D as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma / Y. J. Qi, D. G. Ward, Q. M. Wang, [et al.] // *Proteomics.* – 2014. – Vol. 14, N 2. – P. 186 – 195.
15. Lipinska B. Sequence analysis and regulation of the htrA gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription / B. Lipinska, S. Sharma, C. Georgopoulos // *Nucleic. Acids. Res.* – 1988. – Vol. 16, N. 21. – P. 10053 – 10067.
16. Strauch K. L. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins / K. L. Strauch, J. Beckwith // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1988. – Vol. 85, N. 5. – P. 1576 – 1580.
17. Lipinska B. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase / B. Lipinska, M. Zylicz, C. Georgopoulos // *J. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 17, N 2. – P. 1791 – 1797.
18. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine / T. Krojer, M. Garrido-Franco, R. Huber, [et al.] // *Nature.* – 2002. – Vol. 4, N. 16. – P. 455 – 459.

19. Spiess C. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein / C. Spiess, A. Beil, M. Ehrmann // *Cell*. – 1999. – Vol. 9, N 7. P – 339-347.
20. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage / S. I. Hu, M. Carozza, M. Klein, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 27, N 3. – P. 34406 – 34412.
21. Zumbrunn J. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins / J. Zumbrunn, B. Trueb // *FEBS. Lett.* – 1996. – Vol. 39, N 8. – P. 187 – 192.
22. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia / L. Faccio, C. Fusco, A. Chen, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, N 4. – P. 2581 – 2588.
23. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response / C. W. Gray, R. V. Ward, [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, N 18. – P. 5699 – 5710.
24. Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2 / G. Y. Nie, A. Hampton, Y. Li, [et al.] // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 371, N 1. – P. 39 – 48.
25. Serine peptidase HTRA3 is closely associated with human placental development and is elevated in pregnancy serum / G. Nie, Y. Li, K. Hale, [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2006. - Vol. 74, N 2. – P. 366 – 374.
26. Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia / A. Inagaki, H. Nishizawa, S. Ota, [et al.] // *Placenta*. – 2012. – Vol. 33, N 11. – P. 919 – 926.
27. . High-temperature requirement protein A4 (HtrA4) suppresses the fusogenic activity of syncytin-1 and promotes trophoblast invasion / L. G. Wang,

M. L. Cheong, Y. S. Lee, [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2012. – Vol.32, N 16. – P. 3707 – 3717.

28. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins / C. Oka, R. Tsujimoto, M. Kajikawa, [et al.] // *Development.* – 2004. – Vol. 131, N 5. – P. 1041 – 1053.

29. Minchenko D. O. Expression of insulin-like growth factor binding protein genes and its hypoxic regulation in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress / D. O. Minchenko, A. P. Kharkova, L. L. Karbovskyi, O. H. Minchenko // *Endocr. Regul.* – 2015. – Vol. 49. – N. 2. – P.73 – 83.

30. Belefond D. Methylation induced gene silencing of HtrA3 in smoking-related lung cancer / D. Belefond, Z. Liu, R. Rattan // *Clin. Cancer. Res.* – 2010. – Vol. 16, N 2. – P. 398 – 409.

31. Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer / M. A. Bowden, L. A. Di Nezza-Cossens, T. Jobling, [et al.] // *Gynecol Oncol.* – 2006. – Vol. 103, N 1. – P. 253 – 260.

32. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer / J. Chien, J. Staub, S. I. Hu, [et al.] // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, N 8. – P. 1636 – 1644.

33. Elevated expression of serine protease HtrA1 in preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion / F. Ajayi, N. Kongoasa, T. Gaffey, [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 199, N 5. – P. 557.

34. Chien J. HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer / J. Chien, M. Campioni, V. Shridhar, A. Baldi // *Curr. Cancer. Drug. Targets.* – 2009. – Vol. 9, N 4. – P. 451 – 468.

35. Singh H. Inhibition of HTRA3 stimulates trophoblast invasion during human placental development / H. Singh, S. I. Makino, Y. Endo, G. Nie // *Placenta.* – 2010. – Vol. 31, N 12. – P. 1085 – 1092.

36. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells / A. Baldi, A. De Luca, M. Morini, [et al.] // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21, N 43. – P. 6684 – 6688.
37. Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization / V. Shridhar, A. Sen, J. Chien, [et al.] // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62, N 1. – P. 262 – 270.
38. Prediction of epigenetically regulated genes in breast cancer cell lines / L. A. Loss, A. Sadanandam, S. Durinck, [et al.] // *B.M.C. Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 4, N. 11. – P. 305.
39. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2 / S. M. Srinivasula, S. Gupta, P. Datta, [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 2003. – Vol. 278, N 34. – P. 31469 – 31472.
40. Omi/HtrA2 promotes cell death by binding and degrading the anti-apoptotic protein ped/pea-15 / A. Trencia, F. Fiory, M. A. Maitan, [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 2004. – Vol. 279, N 45. – P. – 46566 – 46572.
41. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis / Q. H. Yang, R. Church-Hajduk, J. Ren, [et al.] // *Genes Dev*. – 2003. – Vol. 17, N 12. – P. 1487 – 1496.
42. A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation / G. Y. Nie, Y. Li, H. Minoura, [et al.] // *Mol. Hum. Reprod*. – 2003. – Vol. 9, N 5. – P. 279 – 290.
43. Belefrod D. High temperature requirement A3 (HtrA3) promotes etoposide- and cisplatin-induced cytotoxicity in lung cancer cell lines / D. Belefrod, R. Rattan, J. Chien, V. Shridhar // *J. Biol. Chem*. – 2010. – Vol. 285, N 16. – P. 12011 – 12027.
44. Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer / J. Narkiewicz, D. Klasa-Mazurkiewicz, D. Zurawa-Janicka, [et al.] // *Clin. Biochem*. – 2008. – N. 41. – P. 561 – 569.

45. Nie G. Y. Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2 / G. Y. Nie // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 371, N 1. – P. 39–48.
46. Clausen T. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate / T. Clausen, C. Southan, M. Ehrmann // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 10, N 3. – P. 443–455.
47. The identification of novel ovarian proteases through the use of genomic and bioinformatic methodologies / K. Miyakoshi, M. J. Murphy, R. R. Yeoman, [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2006. – Vol. 75, N 6. – P. 823–835.
48. Expression and localization of the serine proteases high-temperature requirement factor A1, serine protease 23, and serine protease 35 in the mouse ovary / P. Wahlberg, A. Nylander, N. Ahlskog, [et al.] // *Endocrinology.* – 2008. – Vol. 149, N 10. – P. 5070 – 5077.
49. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing / J. C. Simpson, R. Wellenreuther, A. Poustka, [et al.] // *EMBO Rep.* – 2000. – Vol. 1, N. 3. – P. 287 – 292.
50. Generegulation in an MCF-7 cell line that naturally expresses an estrogen receptor unable to directly bind DNA / B. T. Pentecost, L. M. Bradley, J. F. Gierthy, [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2005. – Vol. 238, N 1-2. – P. 9–25.
51. Global analysis of ligand sensitivity of estrogen inducible and suppressible genes in MCF7/BUS breast cancer cells by DNA microarray / K. R. Coser, J. Chesnes, J. Hur, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2003. – Vol. 100, N 24. – P. 13994 – 13999.
52. Estrogens decrease gamma-ray-induced senescence and maintain cell cycle progression in breast cancer cells independently of p53 / R. A. Toillon, N. Magne, I. Laios, [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2007. – Vol. 67, N 4. – P. 1187 – 1200.

53. U94 alters FN1 and ANGPTL4 gene expression and inhibits tumorigenesis of prostate cancer cell line PC3 / E. T. Ifon, A. L. Pang, W. Johnson, [et al.] // *Cancer. Cell Int.* – 2005. – N. 5. – P. 19.
54. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications / B. Jarzab, M. Wiench, K. Fijarewicz [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 4. – P. 1587 – 1597.
55. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses / S. Jones, X. Zhang, D. W. Parsons, [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 321, N 5897. – P. 1801 – 1806.
56. Lippman M. E. An expression signature of estrogen-regulated genes predicts disease-free survival in tamoxifen-treated patients better than progesterone receptor status / M. E. Lippman, J. M. Rae, A. M. Chinnaiyan // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2008. – Vol. 1. – N. 19. – P. 77 – 90.
57. Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets / W. J. Rettig, P. G. Chesa, H. R. Beresford, [et al.] // *Cancer Res.* – 1986. – Vol. 46, N 12. – P. 6406 – 6412.
58. Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors / W. J. Rettig, S. L. Su, S. R. Fortunato, [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 1994. – N. 58. – P. 385 – 392.
59. Mouse fibroblast-activation protein–conserved Fap gene organization and biochemical function as a serine protease / J. Niedermeyer, B. Enenkel, J. E. Park, [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 254, N 3. – P. 650 – 654
60. Chen W. T., Kelly T. Seprase complexes in cellular invasiveness. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2003. – Vol. 22, N 1. – P. 259 – 269.
61. Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma / L. A. Goldstein, G. Ghersi, M. L. Piñeiro-Sánchez, [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – Vol. 1361, N 1. – P. 11 – 19.
62. Goodman J. D. Seprase, a membrane-bound protease, alleviates the serum growth requirement of human breast cancer cells / J. D. Goodman, T. L. Rozypal, T. Kelly // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2003. – Vol. 20, N 5. – P. 459 – 470.

63. TGFbeta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM / H. Chen, W. W. Yang, Q. T. Wen, [et al.] // *Exp. Mol. Pathol.* – 2009. – Vol. 87, N 3. – P. 189 – 194.

64. Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model / Y. Wen, C. T. Wang, T. T. Ma, [et al.] // *Cancer Sci.* – 2010. – Vol. 101, N 11. – P. 2325 – 2332.

65. Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model / J. D. Cheng, R. L. Dunbrack, M. Valianou, [et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, N 16. – P. 4767 – 4772.

66. O'Brien P. Seprase: an overview of an important matrix serine protease / P. O'Brien, B. F. Connor // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1784, N 9. – P. 1130 – 1145.

67. FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor / T. Ramirez-Montagut, N. E. Blachere, E. V. Sviderskaya, [et al.] // *Oncogene.* - 2004. – N. 23. – P. 5435 – 5446.

68. Tsujimoto H. Differential gene expression in tumorigenic and nontumorigenic HeLa x normal human fibroblast hybrid cells / H. Tsujimoto, S. Nishizuka, J. L. Redpath, E. J. Stanbridge // *Mol. Carcinog.* – 1999. – Vol. 26, N 4. – P. 298 – 304.

69. Stromal expression of fibroblast activation protein/ seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast / N. Ariga, E. Sato, N. Ohuchi, [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 95, N 1. – P. 67 – 72;

70. A subpopulationm of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer / R. Pang, W. L. Law, A. C. Chu, [et al.] // *Cell. Stem. Cell.* – 2010. – Vol. 6, N. 6. – P. 603 – 615.

71. CD26/DPPIV expression and 8-azaguanine response in T-acute lymphoblastic leukaemia cell lines in culture / M. Dourado, A. B. Sarmiento, S. V. Pereira, [et al.] // *Pathophysiology.* – 2007. – Vol. 14, N 1. – P. 3 – 10.



72. CD26/dipeptidyl peptidase IV regulates prostate cancer metastasis by degrading SDF-1/CXCL12 / Y. X. Sun, E. A. Pedersen, Y. Shiozawa, [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis*. – 2008. – N. 25. – P. 765 – 776.
73. Wesley U. V. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway / U. V. Wesley, M. McGroarty, A. Homoyouni // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, N 4. – P. 1325 – 1334.
74. Lefort E. C. The dietary flavonoid apigenin enhances the activities of the anti-metastatic protein CD26 on human colon carcinoma cells / E. C. Lefort, J. Blay // *Clin. Exp. Metastasis*. – 2011. – Vol. 28, N 4. – P. 337 – 349.
75. Carl-McGrath S. Ectopeptidases in tumour biology: a review / S. Carl-McGrath, U. Lendeckel, M. Ebert, C. Röcken // *Histol. Histopathol*. – 2006. – Vol. 21. – N. 12. – P. 1339 – 1353.
76. Pro B. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer / B. Pro, N. H. Dang // *Histol. Histopathol*. – 2004. – Vol. 19, N 4. – P. 1345 – 1351.
77. Cordero O. J. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients / O. J. Cordero, F. J. Salgado, M. Nogueira // *Cancer Immunol. Immunother*. – 2009. – Vol. 58, N 11. – P. 1723 – 1747.
78. Preoperative serum CD26 levels: diagnostic efficiency and predictive value for colorectal cancer / O. J. Cordero, D. Ayude, M. Nogueira, [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2000. – Vol. 83, N 9. – P. 1139 – 1146.
79. Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection / O. J. Cordero, M. Imbernon, L. D. Chiara, [et al.] // *World J. Clin. Oncol*. – 2011. – Vol. 2. – N. 6. – P. 245 – 261.
80. Postoperative serum levels of sCD26 for surveillance in colorectal cancer patients / L. De Chiara, A. M. Rodríguez-Piñeiro, O. J. Cordero, [et al.] // *PLoS. One*. – 2014. – Vol. 9, N. 9. – P. 3 – 9.
81. Distinct gene expression-defined classes of gastrointestinal stromal tumor / U. Yamaguchi, R. Nakayama, K. Honda, [et al.] // *J. Clin. Oncol*. – 2008. – Vol. 26, N 25. – P. 4100 – 4108.

82. Dipeptidyl peptidase 4 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via induction of PIN1 gene expression / H. J. Choi, J. Y. Kim, S. C. Lim, [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172. – N 21. – P. 5096 – 5109.
83. Kessler B. M. PTMs in conversation: activity and function of deubiquitinating enzymes regulated via post-translational modifications / B. M. Kessler, M. J. Edelman // *Cell Biochem. Biophys.* – 2011. – Vol. 60, N 1. – P. 21 – 38.
84. Satija Y. K. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer / Y. K. Satija, A. Bhardwaj, S. Das // *Int. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 133, N 12. – P. 2759 – 2768.
85. Li J. miRNA-200c inhibits invasion and metastasis of human non-small cell lung cancer by directly targeting ubiquitin specific peptidase 25 / J. Li, Q. Tan, M. Yan // *Mol Cancer.* – 2014. – Vol. 13, N 1. – P 66.
86. Mojsa B. Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein / B. Mojsa, I. Lassot, S. Desagher // *Cells.* – 2014. – Vol. 3, N 2. – P. 418 – 437.
87. Zhang J., Zhang X., Xie F., Zhang Z., van Dam H., Zhang L., Zhou F. The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination / J. Zhang, X. Zhang, F. Xie, [et al.] // *Protein Cell.* – 2014. – Vol. 5, N 7. – P. 503 – 517.
88. MicroRNA-191 promotes pancreatic cancer progression by targeting USP10 / H. Liu, X. F. Xu, Y. Zhao, [et al.] // *Tumour. Biol.* – 2014. – Vol. 35, N 12. – P. 12157 – 12163.
89. USP7 is a suppressor of PCNA ubiquitination and oxidative-stress-induced mutagenesis in human cells / S. Kashiwaba, R. Kanao, Y. Masuda, [et al.] // *Cell Rep.* – 2015. – N. – 13. – P. 2072 – 2080.
90. USP1 regulates AKT phosphorylation by modulating the stability of PHLPP1 in lung cancer cells / Z. Zhiqiang, Y. Qinghui, Z. Yongqiang, [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 138, N 7. – P. 1231 – 1238.

91. USP1 targeting impedes GBM growth by inhibiting stem cell maintenance and radioresistance / J. K. Lee, N. Chang, Y. Yoon, [et al.] // *Neuro. Oncol.* – 2016. – Vol. 18, N 1. – P. 37 – 47.

92. Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1 / M. A. Villamil, Q. Liang, J. Chen, [et al.] // *Biochemistry.* – 2012. – Vol. 51, N 45. – P. 9112 – 9123.

93. Garcia-Santisteban I. Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex / I. Garcia-Santisteban, K. Zorroza and Rodriguez J.A. // *PLoS. ONE.* – 2012. – Vol. 7, N 6. – 38 – 48.

94. USP4 inhibits p53 and NF- $\kappa$ B through deubiquitinating and stabilizing HDAC2 / Z. Li , Q. Hao, J. Luo, [et al.] // *Oncogene.* – 2015. – doi: 10.1038/onc.2015.349. [Epub ahead of print].

95. Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer / S. I. Yun, H. H. Kim, Yoon J.H., [et al.] // *Mol. Oncol.* – 2015. – Vol. 9, N. 9. – P. 1834 – 1851.

96. The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination / J. Zhang, X. Zhang, F. Xie, [et al.] // *Protein Cell.* – 2014. – Vol. 5, N 7. – P. 503 – 517.

97. MicroRNA-191 promotes pancreatic cancer progression by targeting USP10 / H. Liu, X. Xu., Y. Zhao, [et al.] // *Tumour. Biol.* – 2014. – Vol. 35, N 12. – P. 12157 – 12163.

98. USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation / Z. Lin, H. Yang, C. Tan, [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 5, N 6. – P. 1639 – 1649.

99. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53 / J. Yuan, K. Luo, L. Zhang, [et al.] // *Cell.* – 2010. – Vol. 140. – N. 3. – P. 384 – 396.

100. Sun X. X. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme / X. X. Sun, K. B. Challagundla, M. S. Dai // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 24. – N. 17. – P. 7444 – 7455.

101. High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma / Tang B., Tang F., Li B., [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 14. – P. 12654 – 12667.

102. The deubiquitinating enzyme activity of USP22 is necessary for regulating HeLa cell growth / Y. L. Liu, J. Zheng, L. J. Tang, [et al.] // *Gene.* – 2015. – Vol. 572, N 1. – P. 49 – 56.

103. Ubiquitin-specific peptidase 22 inhibits colon cancer cell invasion by suppressing the signal transducer and activator of transcription 3/matrix metalloproteinase 9 pathway / N. Ao, Y. Liu, X. Bian, [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 12, N 2. – P. 2107 – 2113.

104. Ubiquitin-specific protease 25 functions in endoplasmic reticulum-associated degradation / J. R. Blount, A. A. Burr, A. Denuc, [et al.] // *PLoS. One.* – 2012. – Vol. 7, N 5. – P. 42.

105. Huang G. USP14 activation promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma / G. Huang, L. Li, W. Zhou // *Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 34, N 6. – P. 2917 – 2924.

106. Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer / Y. Wang, J. Wang, J. Zhong, [et al.] // *Med. Oncol.* – 2015. – Vol. 32, N 1. – P. 379.

107. Phosphorylation and activation of ubiquitin-specific protease-14 by Akt regulates the ubiquitin-proteasome system / D. Xu, B. Shan, B. H. Lee, [et al.] // *Elife.* – 2015. – N. 4. – doi: 10.7554/eLife.10510. [Epub ahead of print].

108. D'Arcy P. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy / P. D'Arcy, X. Wang, S. Linder // *Pharmacol. Ther.* – 2015. – Vol. 14, N 7. – P. 32 – 54.

109. BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response

to DNA damage / A. R. Schoenfeld, S. Apgar, G. Dolios, [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, N 17. – P. 7444 – 7455.

110. Roy R. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection / R. Roy, J. Chun and S. N. Powell // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – Vol. 12, N 1. – P. 68 – 78.

111. Njiaju U. O. Genetic determinants of breast cancer risk: a review of current literature and issues pertaining to clinical application / U. O.Njiaju, O. I. Olopade // *Breast J.* – 2012. – Vol. 18, N 5. – P. 436 – 442.

112. Sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition identifies ubiquitin-specific peptidase 11 (USP11) as a regulator of DNA double-strand break repair / T. D. Wiltshire, C. A. Lovejoy, T. Wang, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 19. – P. 14565 – 14571.

113. Al-Salihi M. A. USP11 augments TGF-beta signalling by deubiquitylating ALK5 / M. A. Al-Salihi, L. Herhaus, T. Macartney, G. P. Sapkota // *Open Biol.* – 2012. – Vol. 2, N 6. – P. 120.

114. Hortobagyi G. N. USP-11 as a predictive and prognostic factor following neoadjuvant therapy in women with breast cancer / G. N. Hortobagyi, Y. Wu, F. Symmans, B. Arun // *Cancer J.* – 2013. – Vol. 19, N 1. – P. 10 – 17.

115. USP32 is an active, membrane-bound ubiquitin protease overexpressed in breast cancers / S. Akhavantabasi, H. B. Akman, A. Sapmaz, [et al.] // *Mamm. Genome.* – 2010. – Vol. 21, N 7. – P. 388 – 397.

116. Chakrabarti A. A review of the Mammalian Unfolded Protein Response / A. Chakrabarti, A. W. Chen and J. Varner // *Biotechnol. Bioengineer.* – 2011. – Vol. 108, N 12. – P. 2777 – 2793.

117. Moenner M. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer / M. Moenner, O. Pluquet, M. Bouchecareilh, E. Chevet // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, N 22. – P. 10631 – 10634.

118. Minchenko D. O. Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRA D, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation / D. O.

Minchenko, A. P. Kharkova, O. V. Hubenia, O. H. Minchenko // *Endocr. Regul.* – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 15 – 26.

119. Effect of glutamine or glucose deprivation on the expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in glioma cell line U87 and its subline with suppressed activity of signaling enzyme of endoplasmic reticulum-nuclei-1 / D. O. Minchenko, O. V. Hubenya, B. M. Terletsy, [et al.] // *Ukr. Bioch. J.* – 2011. – Vol. 83, N 1. – P. 18 – 29.

120. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line / D. O. Minchenko, L. L. Karbovskiy, S. V. Danilovskiy, [et al.] // *Am. J. Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 21 – 31.

121. Zhang K. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum / K. Zhang, R. J. Kaufman // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 25. – P. 25935 – 25938.

122. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth / M. Bi, C. Naczki, M. Koritzinsky, [et al.] // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, N 19. – P. 3470 – 3481.

123. Aragon T., van Anken E., Pincus D. et al. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites / T. Aragon, E. van Anken, D. Pincus, [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 736 – 740.

124. Fels D.R. The PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth / D. R. Fels, C. Koumenis // *Cancer Biology & Therapy.* – 2006. – Vol. 5, N 7. – P. 723 – 728.

125. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 / A. V. Korennykh, P. F. Egea, A. A. Korostelev, [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 736 – 740.

126. Wang S. The impact of the unfolded protein response on human disease / S. Wang, R. J. Kaufman // *J. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 197, N 7. – P. 857 – 867.

127. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks / D. Acosta-Alvear, Y. Zhou, A. Blais, [et al.] // *Molecular Cell*. – 2007. – Vol. 27, N 1. – P. 53 – 66.

128. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells / J. Hollien, J. H. Lin, H. Li, [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 186, N 3. – P. 323 – 331.

129. Bouche-careilh M. Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1 $\alpha$  modulate IRE1 $\alpha$  activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress / M. Bouche-careilh, A. Higa, S. Fribourg, M. Moenner // *FASEB J.* – 2011. – Vol. 25, N 9. – P. 3115 – 3129.

130. Мінченко О. Г. Стрес ендоплазматичного ретикулула, його сенсорно-сигнальні системи та роль у регуляції експресії генів за злякисного росту і гіпоксії / О. Г. Мінченко, А. П. Харьковська, Т. В. Бакалець, І. Кривдюк // *Укр. біохім. журн.* - 2013. – Т. 85, № 5. – Ст. 5-16.

131. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2( $\alpha$ )-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2 / A. Saito, K. Ochiai, S. Kondo, [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, N 6. — P. 4809 – 4818.

132. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats / Y. Chen , D. Gui , J. Chen , [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2014. – Vol. 33, N 6. – P. 1975 – 1987.

133. Wang Q. Resistant starch prevents tumorigenesis of dimethylhydrazine-induced colon tumors via regulation of an ER stress-mediated mitochondrial apoptosis pathway / Q. Wang, P. Wang, Z. Xiao // *Int. J. Mol. Med.* – 2018. – Vol. 41, N 4. – P. 1887 – 1898.

134. Chakrabarti A. A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response / A. Chakrabarti, A. W. Chen., J. Varner // *Biotechnol. Bioengineer.* – 2011. – Vol. 108, N 12. – P. 2777 – 2793.

135. Wang S. The impact of the unfolded protein response on human disease / S. Wang, R. J. Kaufman // *J. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 197, N 7. – P. 857 – 867.
136. Brahimi-Horn M. C. Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway / M. C. Brahimi-Horn, E. Berra, J. gur Pouyss // *Trends in Cellular Biology.* – 2001. – Vol. 11, N 11 – P. 32 – 36.
137. Bertout J. A. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer / J. A. Bertout, S. A. Patel, M. C. Simon // *Nature Reviews Cancer.* – 2008. – Vol. 8, N 12. – P. 967 – 975.
138. Brahimi-Horn M.C. Hypoxia and cancer / M. C. Brahimi-Horn, Chiche J., J. gur Pouyss // *Journal of Molecular Medicine.* – 2007. – Vol. 85, N 12. – P. 1301 – 1307.
139. Greijer A. E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) / A. E. Greijer, P. van der Groep, D. Kemming // *Journal of Pathology.* – 2005. – Vol. 206, N 3. – P. 291 – 304.
140. Lee J. W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions / J. W. Lee, S. H. Bae, J. W. Jeong // *Experimental and Molecular Medicine.* – 2004. – Vol. 36. – N. 1. – P. 1 – 12.
141. Ke Q. Hypoxia-inducible-factor-1 (HIF-1)  $\alpha$  / Q. Ke, M. Costa // *Molecular Pharmacology.* – 2006. – Vol. 70. – N. 5. – P. 1469 – 1480.
142. Koh M. Y. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go / M. Y. Koh, S T. Pivak-Kroizman, R. G. Powis // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2008. – Vol. 33. – N 11. – P. 526 – 533.
143. Chun Y. S. A new HIF-1 $\alpha$  variant induced by zinc ion suppresses HIF-1-mediated hypoxic responses / Y. S. Chun, E. Choi, E. J. Yeo // *Journal of Cell Science.* – 2001. – Vol. 114, N 22. – P. 4051 – 4061.
144. Chun Y.S. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$  gene / Y. S. Chun, E. Choi, T. Y. Kim // *Biochemical Journal.* – 2002. – Vol. 362, N 1. – P. 71 – 79.



145. Phorbol ester stimulates the nonhypoxic induction of a novel hypoxia-inducible-factor 1alpha isoform: implications for tumor promotion / Y. S. Chun, K. H. Lee, E. Choi, [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, N24. – P. 8700 – 8707.

146. Kang F. W. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma / F. W. Kang, Y. Gao, L. Que // *Exp. Ther. Med.* – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. 112 – 118.

147. Agani F. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer / F. Agani, B. H. Jiang // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2013. – Vol. 13, N 3. – P. 245 – 251.

148. Minchenko D.O. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown / D. O. Minchenko, K. I. Kubajchuk, O. V. Hubenia // *Advances in Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 198 – 206.

149. Kappler M. The real face of HIF1 $\alpha$  in the tumor process / M. Kappler, H. Taubert, J. Schubert // *Cell Cycle*. – 2012. – Vol. 11, N 21. P. 3932 –3936.

150. Stoeltzing O. Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation / O. Stoeltzing, M. F. McCarty, J. S. Wey // *Journal of National Cancer Institute*. – 2004. – Vol. 96, N 12. – P. 946 – 956.

151. Rankin E.B. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis / E. B. Rankin, A. J. Giaccia // *Cell Death and Differentiation*. – 2008. – Vol. 15, N 4. – P. 678 – 685.

152. Chen Y. Over-Expression of Semaphorin4D, Hypoxia-Inducible Factor-1alpha; and Vascular Endothelial Growth Factor Is Related to Poor Prognosis in Ovarian Epithelial Cancer / Y. Chen, .L. Zhang, Y. Pan // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13, N 10. – P. 13264 – 13274

153. Bertout J. A. HIF2alpha inhibition promotes p53 pathway activity, tumor cell death, and radiation responses / J. A. Bertout, A. J. Majmundar, J. D.

Gordan // Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. – 2009. – Vol. 106, N 34. – P. 14391 – 14396.

154. Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour / N. C. Denko // Nat. Rev. Cancer. – 2008. — Vol. 8, N 9. — P. 705 – 713.

155. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme / A. Wolf, S. Agnihotri, J. Micallef., [et al.] // J. Exp. Medicine. – 2011. – Vol. 208, N 2. – P. 313 – 326.

156. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect / A. G. Minchenko, I. Leshchinsky, I. Opentanova, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 8. – P. 6183 – 6187.

157. Bartrons R. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect / R. Bartrons, J. Caro // J. Bioenerg. Biomembr. – 2007. – Vol. 39, N 3. – P. 223 – 229.

158. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation / O. H. Minchenko, I. L. Opentanova, D. O. Minchenko, [et al.] // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 576, N 1. – P. 14 – 20.

159. Minchenko O.H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors / O. H. Minchenko, A. Ochiai, I. L. Opentanova, [et al.] // Biochimie. – 2005. – Vol. 87, N 11. – P. 1005 – 1010.

160. Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis / J. Chesney // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2006. – Vol. 9, N 5. – P. 535 – 539.

161. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells / J. Zou, P. Li, F. Lu, [et al.] // J. Hematol. Oncol. – 2013. – Vol. 6, N 1. – P. 3.

162. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor / G. Auf, A. Jabouille, M. Delugin, [et al.] // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 5, N 13. – P. 597.

163. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells / D. O. Minchenko, S. V. Danilovskyi, I. V. Kryvdiuk, [et al.] // *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.* – 2014. – Vol. 1, N 1. – P. 18-26.

164. USP22 promotes tumor progression and induces epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma / J. Hu, D. Yang, H. Zhang, [et al.] // *Lung Cancer*. – 2015. – Vol. 88, N 3. – P. 239 – 245.

165. p38 mitogen-activated protein kinase inhibits USP22 transcription in HeLa cells / J. Xiong, Z. Gong, X. Zhou, [et al.] // *Biomed. Rep.* – 2015. – Vol. 2, N 3. – P. 461 – 467.

166. Inhibition of the endoribonuclease of ERN1 signaling enzyme affects the expression of proliferation-related genes in U87 glioma cells / O. H. Minchenko, D. O. Tsymbal, M. Moenner, [et al.] // *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.* – 2015. – Vol. 50, N 3. – P. 127 – 136.

167. USP1 regulates AKT phosphorylation by modulating the stability of PHLPP1 in lung cancer cells / Z. Zhiqiang, Y. Qinghui, Z. Yongqiang, [et al.] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 138, N 1. – P. 231 – 238.

168. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma / X. Hou, L. Wang, L. Zhang, [et al.] // *FEBS Lett.* – 2013. – Vol. – 5, N 87. – P. 311 – 316.

169. Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/ $\beta$ -catenin signaling in colorectal cancer / S. I. Yun, H. H. Kim, J. H. Yoon, [et al.] // *Mol. Oncol.* – 2015. – Vol. 9, N 18. – P. 34 – 51.

170. MicroRNA-191 promotes pancreatic cancer progression by targeting USP10 / H. Liu, X. F. Xu, Y. Zhao, [et al.] // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35, N 12. – P. 157 – 163.

171. USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation / Z. Lin, H. Yang, C. Tan, [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 5, N 16. – P. 39 – 49.

172. Proteome-wide analysis of USP14 substrates revealed its role in hepatosteatosis via stabilization of FASN / B. Liu, S. Jiang, M. Li, [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – Vol. 9, N 1. – P. 4770.

173. Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer / Y. Wang, J. Wang, J. Zhong, [et al.] // *Med. Oncol.* – 2015. – Vol. 3, N 2. – P. 37 – 39.

174. Ubiquitin-specific peptidase 22 inhibits colon cancer cell invasion by suppressing the signal transducer and activator of transcription 3/matrix metalloproteinase 9 pathway / N. Ao, Y. Liu, X. Bian, [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 12, N 2. – P. 107 – 113.

175. High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma / B. Tang, F. Tang, B. Li, [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 12. – P. 654 – 667.

176. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of TP53, MDM2, USP7 and PERP gene expressions in U87 glioma cells / S. V. Danilovskyi, D. O. Minchenko, L. L. Karbovskyi, [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – Vol. 86, N 4. – P. 90 – 102.

177. Inhibition of ERN1 signaling enzyme affects hypoxic regulation of the expression of E2F8, EPAS1, HOXC6, ATF3, TBX3 and FOXF1 genes in U87 glioma cells / O. H. Minchenko, D. O. Tsybal, D. O. Minchenko, [et al.] // *Ukr. Biochem. J.* – 2015. – Vol. 87, N 2. – P. 76 – 87.

178. Timur Z. K. Lysosomal cathepsin A plays a significant role in the processing of endogenous bioactive peptides / Z. K. Timur, S. Akyildiz Demir, V. Seyrantepe // *Front. Mol. Biosci.* – 2016. – doi: 10.3389/fmolb.2016.00068.

179. Proteomic profiling of cardiomyocyte-specific cathepsin A overexpression links cathepsin A to the oxidative stress response / A. Petrera, U. Kern, D. Linz, [et al.] // *J. Proteome Res.* – 2016. – Vol. 15, N 9. – P. 3188 – 3195.

180. Haznedaroglu I. C. Local bone marrow renin-angiotensin system in the genesis of leukemia and other malignancies / I. C. Haznedaroglu, U. Y. Malkan // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2016. – Vol. 20, N 19. – P. 4089 – 4111.

181. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promotes cancer invasion by modulating cathepsin D via early growth response (EGR)-1 / Y. J. Park, E. K. Kim, J. Y. Bae, [et al.] // *Cancer Lett.* – 2016. – Vol. 370, N 2. – P. 222 – 231.

182. USP7 is a suppressor of PCNA ubiquitination and oxidative-stress-induced mutagenesis in human cells / S. Kashiwaba, R. Kanao, Y. Masuda, [et al.] // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 13, N 10. – P. 2072 – 2080.

183. Ubiquitin-specific protease 14 (USP14) regulates cellular proliferation and apoptosis in epithelial ovarian cancer / Y. Wang, J. Wang., J. Zhong, [et al.] // *Med. Oncol.* – 2015. – Vol. 32, N 1. – P. 379 – 386.

184. The deubiquitinating enzyme activity of USP22 is necessary for regulating HeLa cell growth / Y. L. Liu, J. Zheng, L. J. Tang, [et al.] // *Gene.* – 2015. – Vol. 57, N 2. – P. 49 – 56.

185. Man S. M. Regulation of lysosomal dynamics and autophagy by CTSB/ cathepsin B / S. M. Man, T. D. Kanneganti // *Autophagy.* – 2016. – Vol. 12, N 12. – P. 2504 – 2504.

186. Cystatin C as a p53-inducible apoptotic mediator that regulates cathepsin L activity / J. Mori, C. Tanikawa, Y. Funauchi, [et al.] // *Cancer Sci.* – 2016. – Vol. 107, N 3. – P. 298 – 306.

187. Cathepsin L in tumor angiogenesis and its therapeutic intervention by the small molecule inhibitor KGP94 / D. R. Sudhan, M. B. Rabaglino, C. E. Wood, [et al.] // *Clin. Exp. Metastasis.* – 2016. – Vol. 33, N 5. – P. 461 – 473.