

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ХІТА

Олена Олександрівна

УДК 577.112.7:616

**МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ
ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЗА УМОВ ПРИГНІЧЕННЯ IRE1**

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ /Хіта О.О./

Науковий керівник:

Мінченко Олександр Григорович

член-кореспондент НАН України,

доктор біологічних наук, професор

Київ 2020

АНОТАЦІЯ

Xima O.O. Механізми регуляції експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2020.

Актуальним напрямком сучасних наукових досліджень в області онкології є з'ясування біохімічних та молекулярних механізмів злякисного росту, зокрема на рівні експресії генів. Найбільш злякисними пухлинами головного мозку є гліоми, що характеризуються високоагресивною поведінкою, та важко піддаються терапії. Краще розуміння механізмів, що лежать в основі патогенезу цих пухлин, є дуже важливим для вдосконалення існуючих та створення нових перспективних стратегій анти-пухлинної терапії.

Клітинам злякисних пухлин, у тому числі і гліомним, властиве тотальне репрограмування метаболізму, що дозволяє забезпечити високі біосинтетичні потреби, швидку проліферацію і адаптацію до жорстких умов мікрооточення. Відомо, що виживання та проліферація пухлинних клітин залежить від інтегральної взаємодії численних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, ремоделювання клітинного метаболізму і функціонального стану мітохондрій, а також впливу факторів мікрооточення. Важливими модуляторами пухлинного росту є стрес ендоплазматичного ретикулума (ER) та гіпоксія, що виступають ключовими індукторами ангиогенезу та забезпечують стійкість до апоптозу і таким чином сприяють проліферації та виживанню пухлинних клітин навіть в екстремальних умовах мікрооточення.

Існування тісного взаємозв'язку між виживанням пухлинних клітин та хронічною активацією стресу ER, а також зниження проліферації клітин гліоми за умови пригнічення IRE1-опосередкованого сигнального шляху, свідчить про

важливість та необхідність кращого розуміння механізмів, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми.

Мітохондрії виступають центральною ланкою багатьох метаболічних та сигнальних шляхів, що зазнають ремоделювання в пухлинах та є вирішальними для виживання або загибелі клітини. Порушення функціонування цих органел тісно пов'язані з онкотрансформацією, тому не дивно, що мітохондрії на сьогоднішній день розглядаються в якості фармакологічних мішеней для протипухлинної терапії.

Функціональна активність мітохондрій перебуває під контролем численних протеїнів, що кодується ядром, причому більшість із цих факторів та ензимів є полі-функціональними і відіграють важливу роль у контролі проліферації та апоптозу як у мітохондріях, так і поза ними. Більше того, численні гени протеїнів мітохондріону є мішенями IRE1-залежного транскрипційного репрограмування, що вказує на можливу участь мітохондрій у відповіді на стрес ER.

Саме тому, вивчення ролі сигнального ензиму IRE1, що запускає найбільш консервативний шлях стресу ER, в регулюванні експресії генів ключових протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми є надзвичайно актуальним напрямком сьогодні. Дослідження експресії цих генів за умов пригнічення IRE1, а також в залежності від гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну, необхідне для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії цих генів та їх ролі у злоякісному рості, що може бути корисним для подальших досліджень у напрямку пошуку нових підходів протипухлинної терапії.

Метою дисертаційної роботи було дослідження експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умови пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 для з'ясування можливої ролі цих генів у пригніченні проліферації клітин гліоми через IRE1-залежний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума в залежності від гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози. Для досягнення поставленої мети було необхідно виконати наступні задачі: 1) визначити рівень експресії генів

ензимів трикарбонового циклу мітохондрій у клітинах гліоми лінії U87 із повним пригніченням ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1; 2) вивчити рівень експресії ядерних генів факторів, що контролюють процеси транскрипції, трансляції та біоенергетику в мітохондріях, у клітинах гліоми з пригніченим IRE1; 3) визначити рівень експресії генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси апоптозу, у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сигнального ензиму IRE1; 4) вивчити рівень експресії ядерних генів різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності IRE1, а також за умови індукованого тунікаміцином стресу ендоплазматичного ретикулума в цих клітинах; 5) дослідити вплив гіпоксії на рівень експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1; 6) визначити рівень експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за дефіциту глюкози або глутаміну залежно від функції сигнального ензиму IRE1.

Дослідження рівня експресії мРНК функціонально різних протеїнів мітохондріону здійснювали у клітинах гліоми лінії U87 з повним або частковим пригніченням функціональної активності ензиму IRE1 методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Вперше було показано, що пригнічення функціональної активності сигнального ензиму IRE1 призводить до істотного зниження експресії генів ключових ензимів циклу трикарбонових кислот та факторів, які регулюють функцію геному мітохондрій і біоенергетику цих органел, в той час як експресія генів *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* і *FAM162A*, навпаки, зростає у клітинах гліоми.

Виявлено різні механізми стрес-залежної регуляції експресії генів протеїнів мітохондріону, що можуть опосередковуватись як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активностями IRE1, а у випадку генів *GOT2*, *NNT*, *FAM162A* і *TRADD* – обома ензиматичними активностями IRE1. Методом

біоінформаційного аналізу в промоторних послідовностях більшості досліджених генів було ідентифіковано специфічні регуляторні послідовності CCACG/CGTGG, що розпізнаються транскрипційним фактором ХВР1. Такі результати вказують на можливу роль фактору ХВР1 у транскрипційній регуляції експресії цих генів. Більше того, у 3'-кінцевій нетранслюємій ділянці мРНК *ME2*, *POLG*, *TSM*, *TRADD* та *ATG7* було знайдено сайти зв'язування із мікроРНК miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588. Оскільки у клітинах гліоми з пригніченням IRE1 зниження експресії генів *ME2*, *POLG*, *TSM*, *TRADD* та *ATG7* супроводжувалося одночасним посиленням експресії miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 та -588, можна стверджувати про можливість регуляції експресії цих генів і на пост-транскрипційному рівні.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором росту пухлин. Крім того, методом біоінформаційного аналізу було виявлено регуляторні елементи, що розпізнаються транскрипційним фактором HIF, ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, у промоторних ділянках більшості ядерних генів протеїнів мітохондріону, причому частина таких сайтів одночасно містила у своїй структурі сайти зв'язування із фактором ХВР1. Отримані результати розкривають можливі механізми залежності гіпоксичної регуляції від функціональної активності IRE1, а також демонструють механізм комплексної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами.

Показано, що блокада активності IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 модифікувала вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію більшості досліджених генів, а це свідчить про IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму клітин і лежить в основі пригнічення проліферації пухлинних клітин, опосередкованому активністю IRE1.

Виявлено диференційний характер змін експресії ядерних генів, які кодують локалізовані у мітохондріях фактори та ензими, у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1, що переконливо свідчить про функціональне репрограмування мітохондрій, за якого спостерігається зниження процесів транскрипції, трансляції та циклу трикарбонних кислот з одночасною активацією різноманітних шляхів апоптозу та пригніченням активності онкогенів.

Отримані в цій роботі результати розкривають молекулярні механізми пригнічення росту гліом, опосередкованого інгібуванням IRE1, та можуть бути використані для пошуку нових перспективних протипухлинних препаратів.

Ключові слова: гліома, експресія генів, пригнічення IRE1, стрес ендоплазматичного ретикулума, протеїни мітохондрій, репрограмування мітохондрій, гіпоксія, дефіцит глюкози, дефіцит глутаміну.

ANNOTATION

Khita O.O. Mechanisms of expression regulation of nuclear genes encoded mitochondrial proteins in U87 glioma cells under IRE1 inhibition.

Dissertation for the degree of doctor of philosophy, in specialty 091 - "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The actual direction of current research in the field of oncology is the elucidation of biochemical and molecular mechanisms of tumor growth, in particular at the level of gene expression. The most malignant brain tumors are gliomas, characterized by highly aggressive behavior and difficult to treat. A better understanding of the mechanisms underlying the pathogenesis of these tumors is very important for improving existing and developing new promising anti-cancer therapy strategies.

Cancer cells are characterized by total metabolism reprogramming, which allows to provide high biosynthetic needs, rapid proliferation and adaptation to stress microenvironmental conditions. It is known that survival and proliferation of tumor cells depends on integral interaction of numerous intracellular signaling pathways, remodeling of cellular metabolism and mitochondrial functional status, as well as the influence of microenvironment factors. Important regulators of tumor growth are endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia, which are key inducers of angiogenesis and provide resistance to apoptosis thus promoting tumor cell proliferation and survival even in extreme microenvironmental conditions.

The tight relationship between tumor cell survival and chronic activation of ER stress, as well as the reduction of glioma cell proliferation by blockade of the IRE1-mediated signaling pathway, demonstrates the importance of a better understanding of the mechanisms by which IRE1 control cell proliferation.

Mitochondria are the central hub of numerous metabolic and signaling pathways that undergo remodeling in tumors and are crucial for cell survival or death. Disorders of these organelles are closely linked to oncotransformation, so it is not surprising that mitochondria are now regarded as pharmacological targets for anticancer therapy.

The functional activity of mitochondria is controlled by numerous nuclear-encoded proteins and most of these enzymes and factors are multi-functional and play an important role in controlling cell proliferation and apoptosis both inside and outside the mitochondria. Moreover, numerous genes of mitochondrial proteins are targets of IRE1-dependent transcriptional reprogramming, suggesting the possible involvement of mitochondria in response to ER stress.

That's why studying the role of the IRE1 signaling enzyme, which triggers the most conservative pathway of ER stress, in regulating of the expression of key mitochondrial protein genes in glioma cells is an extremely important. The study of the expression of these genes under IRE1 inhibition, as well as depending on hypoxia and glucose or glutamine deficiency, is necessary to elucidate the molecular mechanisms of regulation of the expression of these genes and their role in tumor

growth, which may be useful for the search for new ones anti-tumor therapy approaches.

The aim of this study was to investigate the expression level of nuclear genes encoded functionally different mitochondrial proteins in U87 glioma cells under IRE1 suppression as well as depending on hypoxia and glucose or glutamine deficiency, to elucidate the possible role of these genes in IRE1-mediated inhibition of glioma cell proliferation. To achieve this goal, it was necessary to perform the following tasks: 1) to evaluate the expression level of genes encoded tricarboxylic cycle enzymes in U87 glioma cells with full inhibition of IRE1; 2) to study the expression level of nuclear genes encoded factors responsible for control of transcription, translation and bioenergetics in mitochondria, in glioma cells with IRE1 blockade; 3) to determine the expression level of genes of mitochondrial factors which control apoptotic pathways in glioma cells under inhibition of IRE1 enzyme; 4) to study the expression level of genes of mitochondrial proteins in glioma cells with inhibition of only endoribonuclease activity of IRE1, as well as under the condition of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in these cells; 5) to study the effect of hypoxia on the expression level of nuclear genes of mitochondrial proteins in glioma cells, depending on the functional activity of the signaling enzyme IRE1; 6) to evaluate the expression level of nuclear genes of mitochondrion proteins in glioma cells under glucose or glutamine deprivation, depending on the function of the signaling enzyme IRE1.

The mRNA expression level of mitochondrial proteins was measured by quantitative polymerase chain reaction methods in U87 glioma cells with complete or partial inhibition of IRE1 functional activity.

For the first time it have been shown that inhibition of IRE1-mediated ER stress signalling pathway leads to suppression of the expression of genes encoded key enzymes of the tricarboxylic acid cycle and factors that regulate mitochondrial genome function and bioenergetics of these organelles, while the expression level of *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* and *FAM162A*, in contrast, is up-regulated.

It has been identified different mechanisms of stress-dependent regulation of mitochondrial protein gene expression that can be mediated by protein kinase or endoribonuclease of IRE1, and in the case of *GOT2*, *NNT*, *FAM162A* and *TRADD* genes by both enzymatic activities. Furthermore, specific regulatory CCACG / CGTGG sequences that recognized by XBP1 transcription factor were identified in the promoter sequences of most studied genes by bioinformatic assay. These results indicate a possible role of XBP1 in the transcriptional regulation of expression of these genes. Moreover, miRNA-binding sites for miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 and -588 were found in the 3'-terminal untranslated region of mRNAs *ME2*, *POLG*, *TSM*, *TRADD* and *ATG7*. Since in glioma cells with inhibition of IRE1, the decrease of expression level of *ME2*, *POLG*, *TSM*, *TRADD* and *ATG7* genes was accompanied by a simultaneous increase of the expression of miR-182-5p, -203-3p, -507-3p, -381, -361-3p, -107 and -588, it can be argued for the regulation of these gene expressions at the post-transcriptional level.

It has been shown that inhibition of IRE1 differentially modifies the effect of hypoxia, an important tumor growth factor, on the expression level of most studied genes. In addition, using bioinformatic analysis was revealed specific regulatory elements that can be recognized by HIF, a key regulator of the cellular response to hypoxia, in the promoter regions of most mitochondrial protein genes, and part of these sites simultaneously contained sites for XBP1. The obtained results reveal the mechanisms of the dependence of hypoxic regulation on the functional activity of IRE1 and demonstrate the mechanism of cooperative regulation of the expression of part of these genes by recognition of specific binding sites by different transcription factors.

The IRE1 blockade was found to modify the effect of glucose and glutamine deficiency on the expression of most studied genes in U87 glioma cells that indicate IRE1-mediated regulation of cell metabolism and underlie suppression of tumor proliferation by IRE1.

Differential changes of the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial enzymes and factors in glioma cells under inhibition of IRE1 clearly

demonstrate the phenomenon of ER stress-dependent functional reprogramming of mitochondria under these experimental conditions.

The obtained results revealed the molecular mechanisms of glioma growth mediated by IRE1 inhibition and can be used to find new promising anticancer agents.

Keywords: glioma, gene expression, IRE1 inhibition, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial proteins, reprogramming of mitochondria, hypoxia, glucose deprivation, glutamine deprivation.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3, Issue 1. – P. 1 – 15.. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена TRADD, обробка даних та участь у написанні статті*). **Web of Science**

2. Hypoxic regulation of the expressions of proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of IRE1 signaling / Minchenko O. H., Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 1. – P. 11 – 21. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ENDOG, POLG, MTIF і TSFM, обробка даних та участь в оформленні статті*). **Scopus і PubMed**

3. IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells / Tsymbal D. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 26 – 37. (*Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ENDOG, POLG, MTIF та TSFM, обробка даних та участь в оформленні статті*).

4. IRE-1 α regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**,

Halkin O. V., Ratushna O. O., Tsymbal D. O., Minchenko O. H. // Endoplasm. Reticul. Stress Dis. – 2016. – Vol. 3. – P. 50 – 62. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена ATG7, обробка даних*). **Web of Science**

5. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells / Minchenko O. H., Kryvdiuk I. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Danilovskyi S. V., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 2. – P. 25 – 34. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена AIFM1, обробка даних*). **Scopus i PubMed**

6. Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 3. – P. 54 – 65. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

7. IRE1 knockdown modifies the glutamine and glucose deprivation effect on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Biotechnologia Acta. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 37 – 47. (*Особистий внесок здобувача – проведено дослідження експресії генів ME2, MDH2, GOT2, IDH2, SDHB та SDHD, обробку даних та оформлення статті*).

8. Inhibition of IRE1 affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2016. – Vol. 50, Issue 3. – P. 127 – 136. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT, обробка даних та оформлення статті*). **Scopus i PubMed**

9. Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition / Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2017. Vol. 51,

Issue 1. – P. 8 – 19. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена FAM162A, обробка даних і участь у написанні статті*). **Scopus i PubMed**

10. ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and LONP1 genes expression in U87 glioma cells / Minchenko O. H., **Riabovol O. O.**, Halkin O. V., Minchenko D. O., Ratushna O. O // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, № 2. – P. 55 – 69. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

11. Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation / Halkin O. V., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Telychko V. V., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, №5. – P. 52 – 61. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена ATG7, обробка даних та участь у написанні статті*). **Scopus**

12. IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma cells / Halkin O. V., **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Kuznetsova A. Y., Ratushna O. O., Minchenko O. H. // Biotechnologia Acta. – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 34 – 43. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена LONP1 та обробка даних*).

13. Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsymbal D. O., Minchenko D. O., Lebid-Biletska K. M., Sliusar M. Y., Rudnytska O. V., Minchenko O. H. // Endocr. Regul. – 2019. Vol. 53, Issue 4. – P. 237-249. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів NR3C1 та NNT за умов дефіциту глюкози та обробка даних*). **Scopus**

14. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму IRE1 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, № 4. – P.116.

15. Гіпоксична регуляція експресії генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 / **Рябовол О. О.**, Галкін О. В., Ратушна О. О. // «Шевченківська весна: Біологія – 2016». Матеріали XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених КНУ ім. Тараса Шевченка. – Київ. – 2016. – С. 172-173.

16. IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway as an important factor of glioma growth / Tsybal D. O., **Riabovol O. O.** // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 р., Київ, Україна – Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 88, №5. – P. 123.

17. Endoplasmic reticulum stress as a key factor of genome reprogramming in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Luzina O. Y., Minchenko O. H. // International VACTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases. Karolinska Institutet, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), January 16-17, 2017, Stockholm, Sweden. – P. 5.

18. Експресія ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 за умов дефіциту глюкози / **Рябовол О. О.**, Ратушна О. О., Мінченко О. Г. // “Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances”. Збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених. – Київ, Україна – Паливода А.В.– 2017. – С. 77-78.

19. IRE1 mediated regulation of the expression of a subset of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Minchenko D. O., Ratushna O. O. // Joint Meeting 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June 2017, Kyiv – Ukr. Biochem. J. – 2017. – Vol. 89, № 4. – P. 89.

20. Inhibition of IRE1 signaling affects the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related proteins in U87 glioma cells /

Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // Materials of a mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” held on May 11, 2017 during the VACTRAIN summer school in Kyiv, Ukraine – Exp Oncol. – 2017. – Vol. 39, № 2. – P. 7.

21. Involvement of ubiquitin specific peptidases as well as IGFBP4, STC2, and GSA7/ATG7 proteins in IRE1 mediated control of glioma cell proliferation / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Tsybmal D. O., Minchenko O. H. // FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, From Conceptual Knowledge to Clinical Applications, 18-24 June 2017, Figueira da Foz, Portugal – Book of Abstracts. Figueira da Foz, Portugal. – 2017. – P. 67.

22. Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань / Мінченко О. Г., Ратушна О. О., **Рябовол О. О.**, Мінченко Д. О., Лузіна О. Я. // IV Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017: Збірник тез. – Дніпро. – 2017. – С. 70-72.

23. Inhibition of IRE1-dependent endoplasmic reticulum stress signalling reprograms gene expressions in cancer cells / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. // IUBMB SEOUL 2018, Young Scientist Program, June 2-4, Yonsei University, Seoul, Korea. Book of abstracts. – Seoul. – 2018. P. 19.006.

24. IRE1 knockdown leads to suppression of glioblastoma growth / Ratushna O. O., Minchenko D. O., **Riabovol O. O.** // FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 144.

25. Metabolic reprogramming of mitochondria in IRE1 knockdown U87 glioma cells / **Riabovol O. O.**, Tsybmal D. O., Minchenko O. H. // FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference – Yong Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, 3-5 September 2018, Kyiv, Ukraine – Ukr. Biochem. J. – 2018. – Vol. 90, Special Issue. – P. 145.

26. **Riabovol O. O.**, Minchenko O. H. Mitochondrion as an important component of integral reprogramming cancer cells metabolism and surviving. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 80.

27. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young Scientists Conference “Fundamental Medicine: Integrated Approaches to Cancer Therapy. Kyiv, February 4 – 5, 2019. Oncology. – 2019.- V. 21, N 1. – P. 81.

28. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Minchenko O.H. Molecular mechanisms of hypoxic regulation of proliferation related gene expressions in glioma cells. Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J. – 2019. – V. 91, N 2. – P. 86.

29. Sliusar M.Y., **Riabovol O.O.**, Lebid-Biletska K.M., Minchenko D.O. Molecular mechanisms of dependence of hypoxic regulation on endoplasmic reticulum stress. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 134.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	30
1.1. Роль мітохондрій у регуляції процесів проліферації в злоякісних пухлинах.....	30
1.2. Значення генів ядра і мітохондрій у біогенезі та функціонуванні мітохондрій	34
1.3. Роль гіпоксії в рості злоякісних пухлин та механізми гіпоксичної регуляції експресії генів	41
1.4. Значення метаболізму глутаміну і глюкози в контролі процесів проліферації та функціонуванні мітохондрій у пухлинних клітинах	45
1.5. Молекулярні основи синтезу і транспорту протеїнів до різних структур мітохондрій	48
1.6. Сенсорно-сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума та їх роль у роль у рості злоякісних пухлин.....	52
1.7. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції процесів проліферації та репрограмуванні мітохондрій.....	57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	60
2.1. Матеріали та умови проведення експериментів	60
2.2. Методи досліджень.....	61
2.2.1. Виділення РНК із клітин гліоми.....	61
2.2.2. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції	62

2.2.3. Ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції	62
2.2.4. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі	64
2.2.5. Отримання протеїнових екстрактів та вестерн-блот аналіз протеїнів.....	64
2.3. Аналіз результатів та їх статистична обробка	66

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 67

3.1. Експресія ядерних генів мітохондріальних ензимів трикарбонового циклу в клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1..	67
3.2. Вплив гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну на експресію ядерних генів мітохондріальних ензимів трикарбонового циклу в клітинах гліоми з пригніченою функцією IRE1	77
3.3. Експресія ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси транскрипції, трансляції та біоенергетику в мітохондріях, у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1 за гіпоксії в залежності від функції сигнального ензиму IRE1.....	91
3.4. Вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси транскрипції і трансляції в мітохондріях, у клітинах гліоми в залежності від функції IRE1.....	112
3.5. Експресія ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси апоптозу, в клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1, а також за умов гіпоксії в залежності від функціонування IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.....	116

3.6. Експресія ядерних генів факторів мітохондрій, що контролюють процеси апоптозу, в клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції IRE1.....	127
---	-----

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ131

4.1. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії ядерних генів локалізованих у мітохондріях протеїнів.....	131
--	-----

4.2. Гіпоксична регуляція експресії генів локалізованих в мітохондріях протеїнів в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1.....	137
--	-----

4.3. Залежність експресії генів локалізованих у мітохондріях протеїнів від дефіциту глутаміну та глюкози контролюється сигнальним ензимом IRE1.....	142
---	-----

4.4. Можлива роль мітохондрій в опосередкованому IRE1 репрограмуванні клітин гліоми	145
---	-----

ВИСНОВКИ.....	148
----------------------	------------

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	150
--	------------

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF4	– activating transcription factor 4 (активуючий транскрипційний фактор 4)
ATF6	– activating transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)
AIFM1	– apoptosis inducing factor mitochondria associated 1 (апоптоз-індукуючий фактор 1, асоційований з мітохондріями)
ATG7	– autophagy related 7 (протеїн 7, асоційований з автофагією)
CDK	– cyclin-dependent kinase (циклін-залежна кінза)
CHOP	– C/EBP homologous protein, (протеїн гомологічний C/EBP)
ENDO G	– endonuclease G (ендорибонуклеаза G)
ERAD	– endoplasmic reticulum associated degradation (деградація, асоційована з ендоплазматичним ретикуломом)
FAM162A	– family with sequence similarity 162 member A (член A родини протеїнів з гомологією послідовності 162)
GADD34	– growth arrest and DNA-damage-inducible 34 (індукований арештом росту та пошкодженням ДНК 34)
GOT2	– glutamate oxaloacetate transaminases (глутамат-оксалоацетат трансаміназа)
GRP78	– 78 kDa glucose-regulated protein (78 кДа протеїн, що регулюється глюкозою, відомий ще як БіР та HSPA5)
dnIRE1	– dominant negative IRE1 (генетично модифікований варіант сигнального ензиму IRE1 без протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності та сублінія клітин гліоми лінії U87, що його експресує)
HIF	– hypoxia inducible factor (фактор, що індукується гіпоксією)
IDH2	– isocitrate dehydrogenase (NADP ⁺) 2, mitochondrial (NADP ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа мітохондрій)

- IRE1/ERN1 – inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ензим, залежний від інозитулу 1 / сигналінг від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1)
- LONP1 – Lon peptidase 1, mitochondrial (Lon-пептидаза мітохондрій)
- MAM – mitochondrion-associated ER membrane (мембрани ER, асоційовані з мітохондріями)
- MDH2 – malate dehydrogenase 2 (малатдегідрогеназа 2)
- MIA – mitochondrial intermembrane space import and assembly (машинерія імпорту та збірки протеїнів міжмембранного простору мітохондрій)
- ME2 – malic enzyme 2 (NAD(P)⁺-залежний малік-ензим 2)
- MTIF2 – mitochondrial translational initiation factor 2 (фактор ініціації трансляції 2 мітохондрій)
- mTOR – mechanistic target of rapamycin (механістична мішень рапаміцину)
- MYC – myelocytomatosis viral oncogene homolog (гомолог вірусного онкогена мієлоцитоматозу)
- NADH – nicotinamide adenine dinucleotide (нікотинамідаденіндинуклеотид)
- NNT – nicotinamide nucleotide transhydrogenase, (нікотинаміднуклеотидтрансгідрогеназа)
- TP53 – tumor protein p53 (пухлинний протеїн p53)
- PERK – PRK-like endoplasmic reticulum kinase (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума)
- POLG – DNA Polymerase Gamma, Catalytic Subunit (каталітична субодиниця ДНК-полімерази гамма)
- RIDD – regulated IRE1-dependent decay (IRE1-залежна деградація)
- SDHB – succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (залізо-

	сірчана субодиниця В сукцинатдегідрогеназного комплексу)
SDHD	– succinate dehydrogenase complex subunit D (субодиниця D сукцинатдегідрогеназного комплексу)
TIM	– translocase of the inner membrane of the mitochondria (транслоказа внутрішньої мембрани мітохондрій)
TRADD	– TNFRSF1A associated via death domain (протеїн, асоційований із TNFRSF1A через домен смерті)
TOM	– translocase of the outer membrane of the mitochondria (транслоказа зовнішньої мембрани мітохондрій)
VEGF	– vascular endothelial growth factor (ендотеліальний фактор росту судин)
XBP1	– X-box binding protein 1 (протеїн 1, що зв'язується з X-боксом)
UPR	– unfolded protein response (відповідь на не згорнуті протеїни)
ER	– ендоплазматичний ретикулум;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ЦТК	– цикл трикарбонових кислот.

ВСТУП

Актуальність теми. Вивчення біохімічних та молекулярних механізмів регуляції патологічних станів організму на рівні експресії генів є надзвичайно важливим напрямком сьогодення. Онкопатологія посідає друге місце за рівнем захворюваності і смертності в світі, причому ці показники постійно зростають, а ефективного лікування практично немає.

Найбільш злоякісними пухлинами є гліоми, що охоплюють групу пухлин головного мозку нейроепітеліального походження, яка включає олігодендрогліоми, астроцити, епендимому та гліобластоми [1]. Саме гліобластома (астроцитома IV ступеня) є найбільш поширеною первинною пухлиною головного мозку з високоагресивною поведінкою, що важко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю виживання пацієнтів. У порівнянні з досягненнями в області терапії інших солідних пухлин, упродовж кількох десятиліть не вдалось досягнути помітного прогресу у зниженні смертності пацієнтів із гліобластомою. Наразі, стандартне лікування гліоми включає хірургічне видалення пухлини з подальшою променевою та хемотерапією, спрямованою на пригнічення клітинного росту (наприклад, препарат Temozolomide) [2] і ангиогенезу (Bevacizumab) [3], є недостатнім для видалення всіх інфільтруючих клітин пухлини і лише 10 % пацієнтів з таким діагнозом живуть більше трьох років [4]. Саме тому, краще розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі патогенезу цих пухлин є вкрай необхідним для покращення існуючих та створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

Характерною рисою пухлинних клітин, в тому числі і гліомних, є тотальне репрограмування метаболізму, спрямоване на забезпечення біоенергетичних та біосинтетичних потреб [5, 6]. Більше того, клітини пухлин перебувають під постійним впливом внутрішньоклітинних (нестабільність геному, підвищене метаболічне навантаження або експресія онкогенів) та позаклітинних стресових чинників (гіпоксія, оксидативний стрес або дефіцит поживних речовин), що призводить до порушення протеостазу [7].

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є спеціалізованим компартментом, що контролює біогенез секреторних і трансмембранних протеїнів та є особливо чутливим до змін клітинного гомеостазу. Накопичення незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума призводить до активації систем стресу ЕР та запуску адаптивних внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни» [7, 8].

При дослідженні молекулярних механізмів пухлиногенезу та пошуку засобів цілеспрямованої терапії великі сподівання покладались на індивідуальні протеїни-мішені, але останнім часом прийнято вважати, що виживання та проліферація пухлинних клітин залежить від складної взаємодії багаточисленних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, перебудови енергетичного метаболізму цих клітин, функції мітохондрій, а також взаємодії з мікрооточенням [9]. Разом із гіпоксією, стрес ЕР є ключовим модулятором злякисного росту, оскільки індукує ангиогенез та сприяє розвитку резистентності до апоптозу, що є необхідними умовами для посиленої проліферації і виживання пухлинних клітин навіть в жорстких умовах мікрооточення [10-13].

Сенсорний протеїн IRE1 (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1) володіє кіназною та ендорибонуклеазною активностями (ЕС: 2.7.11.1 та 3.1.26.-) і запускає найбільш консервативний сигнальний шлях стресу ЕР. Оскільки конститутивна активація сенсорно-сигнальних шляхів стресу ЕР є облігатним фактором виживання пухлинних клітин, а пригнічення IRE1-залежних сигнальних каскадів призводить до зниження проліферації клітин гліоми, то на сьогоднішній день інгібітори сенсорно-сигнального ензиму IRE1 розглядаються як потенційні протипухлинні препарати, а молекулярні механізми, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми привертають особливу увагу [14-17].

Мітохондрії виступають центральною ланкою багатьох метаболічних та сигнальних шляхів, що зазнають ремоделювання у пухлинах та є вирішальними

для виживання або загибелі клітини. Геномні, функціональні та структурні порушення мітохондрій нерозривно пов'язані із розвитком злоякісних новоутворень, тому не дивно, що ці органели розглядають в якості фармакологічних мішеней для протипухлинної терапії [18, 19]. Функціональна активність цих органел перебуває під контролем біля 1500 протеїнів, що кодуються ядром, причому більшість із цих ензимів та факторів є мультифункціональними і залучені у контроль проліферації та апоптозу. Численні гени, що кодують мітохондріальні протеїни, також є цільовими мішенями для IRE1-опосередкованого транскрипційного репрограмування, що вказує на участь мітохондрій у відповіді на стрес ER [20].

У зв'язку з цим, дуже актуальною проблемою сьогодення є вивчення ролі IRE1 у регулюванні експресії генів, що кодують ключові протеїни мітохондрій і забезпечують протікання основних функцій цих органел, у клітинах гліоми. Дослідження експресії цих генів за умов інгібування IRE1, а також за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну, необхідні для з'ясування молекулярних механізмів регуляції експресії даних генів та їх ролі у злоякісному рості. Це може бути важливим підґрунтям для подальших досліджень у пошуку потенційних генів-мішеней і розробки нових підходів до боротьби з пухлинами центральної нервової системи, зокрема гліобластомами.

Мета і завдання роботи: вивчення експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умови пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 для з'ясування можливої ролі цих генів у пригніченні проліферації клітин гліоми через IRE1-залежний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума в залежності від гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Визначити рівень експресії генів ензимів трикарбонового циклу мітохондрій у клітинах гліоми лінії U87 із повним пригніченням ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

2. Вивчити рівень експресії ядерних генів факторів, що контролюють процеси транскрипції, трансляції та біоенергетику в мітохондріях, у клітинах гліоми з пригніченим IRE1.

3. Визначити рівень експресії генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси апоптозу, у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сигнального ензиму IRE1.

4. Вивчити рівень експресії ядерних генів різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності IRE1, а також за умови індукованого тунікаміцином стресу ендоплазматичного ретикулума в цих клітинах.

5. Дослідити вплив гіпоксії на рівень експресії ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1.

6. Визначити рівень експресії генів ядерних генів функціонально різних мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за дефіциту глюкози або глутаміну залежно від функції сигнального ензиму IRE1.

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми IRE1-залежної регуляції експресії ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SHDB*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *TSMF*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT*, *FAM162A*, *LONP1*, *AIFM1*, *TRADD* та *ATG7* людини.

Предмет дослідження: рівень експресії ядерних генів мітохондріальних ензимів та факторів у клітинах гліоми лінії U87 з повним або частковим пригніченням функціональної активності IRE1, а також за умов гіпоксії і дефіциту глюкози або глутаміну у середовищі та їх можлива роль у пригніченні проліферації клітин гліоми через IRE1-залежний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума.

Методи дослідження: у цій дисертаційній роботі були використані сучасні методи біохімії та молекулярної біології: виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, визначення концентрації та якості зразків РНК спектрофотометричним методом, синтез комплементарних ДНК за допомогою

зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичні методи аналізу нуклеїнових кислот та протеїнів, метод імуноблотингу, біоінформаційний аналіз та статистична обробка отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було встановлено, що у клітинах гліоми лінії U87 експресія ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SHDB*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT*, *FAM162A*, *LONP1*, *AIFM1*, *TRADD* та *ATG7*, які кодують функціонально різні протеїни мітохондрій, є залежною від стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме від функціонування сенсорно-сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на не згорнуті протеїни, причому ця залежність має гено-специфічний характер. Показано, що стрес-залежна регуляція цих генів може здійснюватися як через протеїнкіназу, так і ендорибонуклеазну активність IRE1, а у деяких випадках за участі й інших систем стресу ендоплазматичного ретикулума. Виявлено, що експресія більшості досліджених генів є залежною від гіпоксії, а пригнічення функціональної активності IRE1 переважно модифікує ефект гіпоксії на експресію цих генів. Продемонстровано наявність різної чутливості експресії досліджених генів мітохондріальних протеїнів до умов дефіциту глюкози або глутаміну у клітинах гліоми, а також її залежність від функціональної активності IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Встановлено диференційний характер змін експресії ядерних генів, які кодують мітохондріальні фактори та ензими, у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю IRE1, що свідчить про функціональне репрограмування мітохондрій за цих експериментальних умов.

Практичне значення отриманих результатів полягає у з'ясуванні молекулярних механізмів, що лежать в основі зниження інтенсивності проліферації клітин гліоми, опосередкованого пригніченням сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни і що необхідно для створення нових протипухлинних препаратів системної терапії гліом, зокрема на основі ідентифікованих нами потенційних генів-

мішеней *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *NNT*, з урахуванням чутливості експресії цих генів до важливих факторів пухлинного мікрооточення: гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну. Отримані результати були використані у лекціях по спецкурсу “Конструювання генів” для магістрів КНУ імені Тараса Шевченка, а також в курсі лекцій для аспірантів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2016 – 2019 р.р. Дисертантом було самостійно проведено аналіз літературних даних за темою роботи та виконано експериментальні дослідження по вивченню у клітинах гліоми експресії ядерних генів мітохондріальних ензимів та факторів, залучених у регуляцію важливих клітинних процесів (біоенергетику, проліферацію та апоптоз), за умов пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну у середовищі. Автором було виконано статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню експресії певних генів проводились за участі наукових співробітників Харькової А. П., Мінченка Д. О. і Ратушної О. О. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Мінченка О. Г.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2016–2019 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.) та „Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів” № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.), підрозділ теми „Роль

ендоплазматичного ретикулула та мітохондрій у молекулярних механізмах інтегральної регуляції процесів проліферації”.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: біологія», Київ, 2016; Конференція-конкурс молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016», Київ, 2016; FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, From Conceptual Knowledge to Clinical Applications, Figueira da Foz, Portugal, 2017; International VACTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, 2017; XV Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», Київ, 2017; Joint meeting of the 25th annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» & 2nd conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017; Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, Дніпро, 2017; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2018», Kyiv, 2018; Young Scientist Program, IUBMB, Seoul, Korea, 2018; XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine», Kyiv, 2018; Конференція молодих вчених “Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією”, Київ, 2019; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019», Kyiv, 2019 та 12-му біохімічному конгресі, Тернопіль, 2019.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 29 робіт, із них 13 статей у іноземних та вітчизняних наукових фахових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 16 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних конференцій і конгресів, включаючи IUBMB, FEBS та Parnas Conference. 10 із опублікованих статей представлені в базах даних Scopus, PubMed і Web of Science.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 175 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 255 посилань. Робота містить 57 рисунків та 8 таблиць.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль мітохондрій у регуляції процесів проліферації в злоякісних пухлинах

Характерною рисою пухлинних клітин є репрограмування метаболізму, спрямоване на забезпечення швидкого росту та проліферації. Було показано, що в процесі трансформації енергетичний обмін пухлинних клітин зазнає глибоких змін, які включають в себе посилений аеробний гліколіз (ефект Варбурга), зміну споживання амінокислот, порушення регуляції функції мітохондрій, тощо [6].

Обмежуючі фактори мікрооточення, такі як доступність поживних речовин та кисню, а також вплив анти-ракових агентів, кидають виклик виживанню пухлинних клітин і, таким чином, керують їх еволюцією і селекцією всередині пухлини [21]. Нещодавніми дослідженнями встановлено, що метаболічний фенотип пухлин змінюється на різних стадіях захворювання і саме він є основним рушійним фактором пухлинної прогресії. Наприклад, активація ензимів гліколізу та пригнічення транскрипційної активності мітохондрій спостерігались на різних етапах прогресії раку простати [22, 23]. Аналогічні метаболічні ознаки, специфічні для різних стадій, були ідентифіковані для раку молочної залози, карциноми нирок та легень [24, 25]. У зв'язку з цим стає очевидним, що ключову роль у розвитку пухлин відіграє метаболізм мітохондрій [26, 27].

Окрім продукції АТФ шляхом окисного фосфорилування OXPHOS, мітохондрії відіграють важливу роль у підтриманні іонного гомеостазу, регуляції запрограмованої загибелі клітин і продукції проміжних сполук для синтезу амінокислот, ліпідів та нуклеотидів [28-30]. Таким чином, саме мітохондрії виступають центральною ланкою багатьох біоенергетичних та біосинтетичних процесів, які зазнають репрограмування у пухлинах, а їхня цілісність є ключовою контрольною точкою для пухлинних клітин [6, 31, 32].

На користь цієї думки свідчать дані про те, що мутації ключових мітохондріальних ензимів, таких як фумаратдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа та ізоцитратдегідрогеназа можуть приймати участь у розвитку пухлин. Справді, в дослідженнях на таких моделях було виявлено, що метаболіти мітохондріального походження, які накопичуються в цих пухлинах (фумарат, 2-гідрокси-глутарат, сукцинат і аспартат, а також активні форми кисню), можуть активувати онкогенні сигнальні каскади, виступаючи онкометаболітами [33].

Окрім посилення або пригнічення продукції певних метаболітів, пухлинні клітини використовують оборотний характер багатьох метаболічних реакцій. Наприклад, разом із порушеною активацією гліколізу, протікання циклу трикарбонних кислот у зворотному напрямку (так зване відновлювальне карбоксилювання, *reductive carboxylation*) дозволяє клітинам із дисфункціональними мітохондріями використовувати глютамін для своїх біосинтетичних потреб [34].

Транскрипційний аналіз 21 типу пухлин, проведений TCGA (The Cancer Genome Atlas), виявив, що пригнічення генів, пов'язаних із мітохондріальним метаболізмом, асоційоване із поганим клінічним прогнозом і наявністю профілю експресії генів епітеліально-мезенхімального переходу – молекулярного шляху, спряженого з ініціацією росту пухлин, інвазією та метастазуванням [35]. Ці результати свідчать про те, що мітохондріальна дисфункція може бути виграшною стратегією для пухлинних клітин, оскільки стимулює їхню рухливість та інвазивність, а також сприяє метастазуванню. Додаткові дослідження продемонстрували, що мутації ензимів циклу трикарбонних кислот, сукцинатдегідрогенази та фумаратдегідрогенази, пов'язані із активацією епітеліально-мезенхімального переходу та набуттям інвазивного фенотипу феохромоцитом та парагангліоми, а також раку нирок [36, 37]. Схожим чином було показано, що кількість копій мтДНК варіює у різних типах пухлин, що зазвичай асоціюється з різними біоенергетичними дефектами і пов'язане з поганим прогнозом для пацієнтів з різними видами

раку. Цікаво, що кількість копій мтДНК у більшості пухлин позитивно корелює із експресією генів, що кодують компоненти дихального ланцюга і негативно - із експресією генів, що кодують фактори імунної відповіді і регулятори клітинного циклу [38].

Загалом, ці результати демонструють, що пригнічення ензимів ЦТК забезпечує суттєву перевагу для ракових клітин під час прогресії пухлин. Тим не менш, описані приклади, які свідчать про негативну роль мітохондріальної дисфункції у розвитку пухлин. Дослідження, проведені на онкоцитомі нирок – доброякісній пухлині, яка характеризується аберантним накопиченням дисфункціональних мітохондрій, показали, що порушення функціонування мітохондрій може інгібувати машинерію автофагії, створюючи, таким чином, контрольну метаболічну точку, яка пригнічує розвиток пухлин [39]. І навпаки, активація автофагії є фундаментальною основою підтримки пухлинних клітин з мутантним онкогеном Ras шляхом постачання субстратів для мітохондріального метаболізму та видалення нефункціонуючих мітохондрій [40].

Крім того, мітохондрії беруть участь у метаболічній адаптації пухлинних клітин під час дисемінації та метастазування. Наприклад, було показано, що метастазуючі клітини з первинної меланоми потребують для свого виживання активації антиоксидантних систем мітохондрій, оскільки під час незаякореного росту зіштовхуються з оксидативним стресом [41, 42]. Інші дослідження продемонстрували, що від'єднання пухлинних клітин від матриксу призводить до складного репрограмування шляхів утилізації поживних речовин, за якого відновлювальне карбоксилування стає ключовим шляхом продукції молекул антиоксидантного захисту [43].

Активація специфічних транскрипційних програм, які регулюють активність мітохондрій під час дисемінації пухлинних клітин та метастазування є основою цих метаболічних змін. В клітинах раку простати, активний окислювальний метаболізм мітохондрій ставить пухлинні клітини у не вигідне метаболічне положення і призводить до пригнічення росту пухлин. Крім того,

нокдаун PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, коактиватор 1 α γ -рецептора, що активується проліфераторами пероксисом) ключового транскрипційного регулятора окислювального метаболізму мітохондрій, активує гліколіз і сприяє пухлинній прогресії та метастазуванню клітин передміхурової залози, що корелює із зниженою експресією даного протеїну [23].

Роль дисфункції мітохондрій в утворенні метастазів також підтверджується тим, що часткове інгібування дихального ланцюга мітохондрій у пухлинних клітинах B16F10 за допомогою ротенону є достатнім для індукції клітинної міграції та клоногенності *in vitro* та підтримання легеневого метастазування *in vivo* [44]. На додаток до цього, було встановлено, що мутації мтДНК, що впливають на комплекс I дихального ланцюга, підтримують утворення метастазів раку молочної залози *in vivo* через де-регуляцію співвідношення NAD⁺/NADH та активацію автофагії. Важливо, що відновлення мітохондріальної функції шляхом посилення активності комплексу I може пригнічувати формування метастазів [45].

Слід відмітити, що центральні клітинні процеси, такі як шляхи цілісності геному та проходження клітинного циклу, також тісно пов'язані з функціонуванням мітохондрій. З одного боку, мітохондріальна дисфункція супроводжується виснаженням пулу нуклеотидів, що, в свою чергу, є пов'язаним з індукцією пошкоджень ДНК [46]. Крім добре вивченої ролі ушкоджень ДНК у нестабільності геному і підтримці онкогенезу, високий рівень мутаційного навантаження пов'язаний із підвищеною чутливістю до блокаторів інгібіторних сигнальних шляхів імунної системи anti-CTLA-4 та anti-PD1 [47, 48]. З іншого боку, компоненти машинерії контролю клітинного циклу Cyclin D3-CDK6 виступають негативними регуляторами мітохондріального метаболізму, перенаправляючи інтермедіати гліколізу від ЦТК у пентозофосфатний шлях та шлях біосинтезу серину, і в такий спосіб підтримують продукцію молекул антиоксидантного захисту (NADPH та глутатіону), необхідних для виживання пухлинних клітин [49].

Таким чином, підбірка експериментальних даних демонструє дуалізм мітохондріальної функції за метастазування та резистентності до анти-ракової терапії. Показано, що дисфункція мітохондрій може досягати певних порогових значень, за яких вона перестає бути перевагою і стає шкідливою для пухлинних клітин. Наприклад, зниження кількості копій мітохондріальної ДНК внаслідок втрати гена, що кодує мітохондріальний транскрипційний фактор А (TFAM, mitochondrial transcription factor A) інгібує пухлиногенез в онкогенних мишачих Kras-моделях раку легень [50]. Крім того, було показано, що формування пухлин у сингенних C57BL/6Nsu9-DsRed2 мишей із клітин меланому, позбавлених мітохондріальної ДНК (ρ^0 -клітини), пов'язане із придбанням цілих мітохондрій із клітин хазяїна шляхом горизонтального переносу, що слугує стратегією відновлення мітохондріальної функції та онкогенного потенціалу даних клітин, а також виступає функціональним доказом важливої ролі окисного фосфорилування для розвитку пухлин [51].

Описані вище спостереження підкреслюють необхідність кращого розуміння сигналів мікрооточення та тонких молекулярних механізмів репрограмування і адаптації мітохондріального метаболізму за прогресії пухлин, що може бути корисним як для розробки нових анти-пухлинних стратегій, так і для ідентифікації нових прогностичних маркерів для діагностики пухлин.

1.2. Значення генів ядра і мітохондрій у біогенезі та функціонуванні мітохондрій

Функціональна активність мітохондрій залежить від протеому цих органел, який в свою чергу підтримується та регулюється відповідно до потреб клітини. Сучасні протеомні, геномні та біоінформаційні підходи дозволили отримати вичерпний перелік мітохондріальних протеїнів у різних видах еукаріотичних організмів, згідно з яким мітохондрії ссавців містять понад 1500 протеїнів [52].

Кільцева мтДНК кодує лише 13 протеїнів, що є важливими компонентами

дихального ланцюга мітохондрій, а також 22 тРНК та дві рРНК (12S та 16S), необхідні для забезпечення мітохондріальної трансляції. Таким чином, більше 99% усіх мітохондріальних протеїнів кодуються ядром і синтезуються на цитоплазматичних рибосомах. Це ензими циклу трикарбонових кислот та біосинтезу амінокислот, нуклеїнових кислот і ліпідів, ДНК- та РНК-полімерази, транскрипційні фактори, рибосомні протеїни, а також компоненти машинерії репарації ДНК [53]. Варто зазначити, що більшість із цих ензимів та факторів є мультифункціональними і відповідають за метаболічне репрограмування мітохондрій під час пухлинного росту та розвитку інших патологічних станів [54-56].

Геном мітохондрій відіграє важливу роль у пухлиногенезі [57, 58]. Численні соматичні та гаметні мутації мтДНК були ідентифіковані для широкого спектру пухлин, включаючи аденокарциному нирок, нейробластому, рак товстої кишки, астроцитоми, рак щитовидної і молочної залози [59]. Крім того, зростає кількість доказів, які свідчать про зміну числа копій мтДНК під час клітинного розвитку та туморогенезу, що пов'язано з експресією ключових регуляторів клітинного циклу та апоптичних факторів [60, 61]. Саме тому, фактори регуляції функціональної активності геному мітохондрій є об'єктом численних досліджень. До таких факторів належать апоптична ендорибонуклеаза ENDOG (endonuclease G), ДНК-полімераза POLG (DNA polymerase gamma, catalytic subunit, каталітична субодиниця ДНК-полімерази гамма), фактори ініціації та елонгації трансляції MTIF2 (mitochondrial translational initiation factor 2, мітохондріальний фактор ініціації трансляції 2) та TSFM (Ts translation elongation factor, mitochondrial, мітохондріальний фактор елонгації трансляції Ts), відповідно.

Полімераза G володіє полімеразною та екзонуклеазною активностями, необхідними для реплікації мтДНК, а метилування ДНК екзону 2 її каталітичної субодиниці (POLGA) є одним із центральних механізмів контролю числа копій мтДНК. Показано, що ракові стовбурові клітини характеризуються гіперметильованим екзоном 2 POLGA, що підтримує низькі рівні мтДНК,

викликаючи залежність пухлинних клітин від аеробного гліколізу та водночас сприяючи мультипотентності [57, 61]. Фактори MTF2 та TSMF відіграють важливу роль у мітохондріальній трансляції, а порушення в їх функції призводять до різних патологічних станів [62-64].

Мітохондріальна ендонуклеаза ENDOG бере участь у сайт-специфічному розщепленні ДНК під час реплікації за умов стресу та деградації геномної ДНК за апоптозу [65, 66]. Було також показано, що ENDOG залучена в ініціацію реплікації мтДНК, а також відповідає за видалення аберантних копій мтДНК, причому ці події є тісно пов'язаними і залежать від нуклеазної активності ENDOG. Важливо, що обидві активності ENDOG, спрямовані на мітохондріальну ДНК, індукуються оксидативним стресом [67].

Ядерним геномом кодується і глюкокортикоїдний рецептор NR3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1, член 1 групи C підродини 3 ядерних рецепторів), що відіграє важливу роль у регуляції численних метаболічних та проліферативних процесів, включаючи пухлиногенез та метаболічні захворювання, такі як ожиріння і діабет, переважно через взаємодію із специфічними чутливими елементами в генах-мішенях [68-72]. Цікаво, що на відміну від інших рецепторів стероїдних гормонів, глюкокортикоїдний рецептор не вважається онкогеном. Глюкокортикоїди, що зв'язуються із NR3C1, викликають зупинку росту та запускають апоптоз в лімфоїдній тканині [70, 73]. Більше того, транскрипційна активність NR3C1 позитивно корелює із ступенем фосфорилювання за Ser211, тоді як сумоїлювання, навпаки, пригнічує транскрипційну трансактивацію. Було показано, що глюкокортикоїди можуть безпосередньо стимулювати мітохондріальну транскрипцію через рецептори до глюкокортикоїдів [74]. Крім того, глюкокортикоїдні рецептори можуть зв'язуватись з іншими транскрипційними факторами та модулювати регуляцію транскрипції генів-мішеней [75-77].

Нікотинаміднуклеотидтрансгідрогеназа NNT (nicotinamide nucleotide transhydrogenase), інтегральний протеїн внутрішньої мітохондріальної

мембрани, що спряжує потік протонів за електрохімічним градієнтом та відновлення NADP^+ до NADPH [78]. У той же час, мутації в гені *NNT* викликають сімейну глюкокортикоїдну недостатність [79]. Експресія мРНК *NNT* є значно вищою у пацієнтів з вісцеральним типом ожиріння та корелює із показниками ваги тіла та концентрації інсуліну в плазмі крові натщесерце. Ряд досліджень виявив, що порушення функції *NNT* у клітинах людини і тварин негативно впливає на активність NADPH -залежних ензимів та здатність підтримувати мембранний потенціал, що знижує біоенергетичні можливості клітини та викликає оксидативний стрес [79-81]. Нещодавні дослідження продемонстрували, що клітини аденокарциноми SK-HEP-1 та раку шлунку, нокаутовані за геном *NNT*, володіли обмеженою здатністю підтримувати співвідношення $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ та характеризувались зниженою інтенсивністю проліферації [82]. Зниження рівня NADPH в таких *NNT*-дефіцитних клітинах призводило до пригнічення активності гістонових деацетилаз HDAC1 та посилення ацетилювання TP53 (tumor protein p53, пухлинний протеїн p53), що вказує на критичну роль протеїну *NNT* у підтриманні редокс-гомеостазу, зміни якого впливають на HIF- та HDAC1-залежні шляхи і, відповідно, на ретроградне сигналювання мітохондрій [80].

Мітохондріальна Іон-пептидаза 1 (LONP1, Ion peptidase 1, mitochondrial, також відома як серинова протеаза 15, serine protease 15, PRSS15) належить до Lon-родини АТФ-залежних протеаз та опосередковує селективне розщеплення не згорнутих, неправильно згорнутих або ушкоджених оксидативним стресом протеїнів, так само як і короткоживучих регуляторних протеїнів мітохондріального матриксу за виключенням агрегованих протеїнів [83-85]. Крім того, протеаза LONP1 може функціонувати у якості шаперону при збірці протеїнових комплексів внутрішньої мембрани мітохондрій, брати участь у регуляції експресії мітохондріальних генів та підтриманні цілісності мітохондріального геному [85, 86]. Таким чином, Lon-пептидаза 1 виступає ключовим ензимом, який контролює біоенергетику мітохондрій за пухлиногенезу та відіграє важливу роль у виживанні і проліферації пухлинних

клітин [87-89]. Нещодавно було показано, що інгібування LONP1 за допомогою тритерпеноїду з анти-пухлинними властивостями порушує функціонування мітохондрій та індукує апоптоз у клітинах колоректального раку людини [83]. Різноманітні чинники, такі як гіпоксія та активні форми кисню, індукують експресію LONP1, що в свою чергу забезпечує захист від оксидативного стресу. Більше того, пригнічення активності даного ензиму асоційоване із клітинним старінням, у той час як його активація була виявлена в пухлинах, причому це корелювало із набуттям більш агресивного пухлинного фенотипу [90].

Мітохондріальні ензими циклу трикарбонових кислот відіграють важливу роль у біоенергетиці і метаболізмі клітин, причому деякі із них демонструють поліфункціональність та є залученими до метаболічного репрограмування мітохондрій за пухлиногенезу [91-93].

Мітохондріальний NAD(P)^+ -залежний ензим ME2 (Malic Enzyme 2), що каталізує окисне декарбоксилювання малату до пірувату, є мішенню TP53 і нокдаун ME2 індукує еритроїдну диференціацію клітин еритролейкемії людини [94, 95]. Крім того, було виявлено надекспресію ензиму ME2 у багатьох типах солідних пухлин та встановлено, що його нокдаун пригнічує проліферацію, індукує клітинну загибель і, таким чином, пригнічує ріст пухлин легень *in vivo* [96]. Нещодавно було показано, що природна сполука ембонова кислота може специфічно інгібувати ензиматичну активність мітохондріального NAD(P)^+ -залежного ензиму ME2, що індукує сенесценцію клітин [97].

Більше того, малат-аспартатний шунт є необхідним для переносу цитозольного NADH до мітохондрій для підтримання високого рівня гліколізу та швидкого росту пухлинних клітин [98]. В даному процесі беруть участь дві пари ензимів, що локалізуються в мітохондріях та цитоплазмі, глутамат-оксалоацетат-трансаміназа GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) та малатдегідрогеназа MDH (malate dehydrogenase). Ацетилювання мітохондріальної GOT2 посилює асоціацію між GOT2 та MDH2 та ініціює перенесення цитозольного NADH до мітохондрій, що змінює мітохондріальний NADH/NAD^+ редокс-баланс для підтримки продукції АТФ.

Крім того, ацетилювання GOT2 сприяє проліферації клітин підшлункової залози та пухлинному росту *in vivo*, тоді як нокдаун цього ензиму призводить до посилення продукції АФК, що викликає p27-залежну сенесценцію клітин карциноми протоків підшлункової залози (PDAC) [98, 99]. Недавно було показано, що LW6, інгібітор MDH2, пригнічує клітинну проліферацію та апоптоз [100].

Мітохондріальна NADP⁺-залежна ізоцитратдегідрогеназа IDH2 (isocitrate dehydrogenase (NADP⁺) 2, mitochondrial) каталізує перетворення ізоцитрату в α -кетоглутарат та водночас продукує відновлений NADPH із NADP⁺. Мутації в генах, що кодують IDH1 та IDH2, нещодавно були виявлені у багатьох типах пухлин людини, переважно в гліомах і гострій мієлоїдній лейкемії [92]. Експресія мутантних ензимів IDH порушує процеси диференціації у багатьох клітинних лініях та разом з іншими онкогенами стимулює розвиток пухлин [91, 92]. Крім того, мутації IDH2 сприяють розвитку гліом шляхом порушення топології хромосом, що запускає аберантні регуляторні взаємодії, які індукують експресію онкогенів [91]. Недавно було продемонстровано, що IDH2 відіграє ключову роль у захисті клітин від оксидативного стресу, а недостатність цього ензиму викликає мітохондріальну дисфункцію та продукцію активних форм кисню у клітинах пухлин [101].

Важлива роль у функціонуванні мітохондрій належить сукцинатдегідрогеназному комплексу SDH, що складається із чотирьох субодиниць та є специфічно задіяним в окиснення сукцинату та перенесення електронів від FADH₂ до CoQ. Залізо-сірчана субодиниця SDHB (succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B) є високо консервативною та містить три кластери, збагачені цистеїном, що можуть включати в себе залізо-сірчаний центр ензиму [93]. Відносно нещодавно була продемонстрована онкогенна роль цього ензимного комплексу і наразі SDH-комплекс вважається важливим пухлинним сигнальним шляхом із пухлино-супресорними властивостями [102]. Протеїн SDHB виступає центральною коровою субодиницею та відповідає за цілісність SDH комплексу, причому було показано, що експресія SDHB

втрачається у всіх SDH-дефіцитних неоплазмах [93, 103]. Збірка та функціонування сукцинатдегідрогенази залежать від двох консервативних мотивів L(I)YR в субодиниці SDHB, які надають критичної специфічності для доставки залізо-сірчаного кластера [104]. Нещодавно було показано, що мутації в даних мотивах призводять до порушення включення Fe-S кластера в SDHB, і як наслідок, – втрати активності ензиму, що призводить до накопичення сукцинату та метаболічного ремоделювання за SHD-дефіцитного ракового синдрому [105].

Були виявлені мутації і в субодиниці D сукцинатдегідрогеназного комплексу, причому показано посилення експресії SDHD під впливом PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), який демонструє виражену протипухлинну дію [102, 104, 106].

Низка мітохондріальних протеїнів, що кодуються ядром, є залученими в регуляцію процесів апоптозу та автофагії. Наприклад, апоптоз-індукуючий фактор 1, асоційований з мітохондріями (AIFM1, mitochondria associated apoptosis inducing factor 1) бере участь у регуляції апоптозу та росту пухлин через активацію кінази JNK. Більше того, рівень експресії AIFM1 у клітинах карциноми був значно вищим, ніж в нормальних тканинах [56, 107].

Важливу роль у функціонуванні мітохондрій за пухлинного росту відіграє мітохондріальний про-апоптотичний протеїн FAM162A (family with sequence similarity 162 member A, член A родини протеїнів з гомологією послідовності 162), який є NIF- та естроген-залежним фактором і контролює процеси апоптозу та проліферації [108, 109]. Більше того, дослідження Pedram et al. [110] виявили високо-афінні рецептори до естрогену у мітохондріях клітин раку грудної залози MCF-7 та ендотелію і показали їх роль у регуляції функціонування мітохондрій та виживанні пухлинних клітин.

Ензим E1, який активує убіквітин (GSA7), також відомий як протеїн 7, асоційований з автофагією (ATG7, autophagy related 7) є важливим компонентом машинерії автофагії та полі-функціональним протеїном, що опосередковує пригнічення проліферації і активацію апоптозу шляхом індукції

сенесценції клітин [111-114]. Інгібування автофагії за допомогою Baf A1 або нокдауну ATG7 чи ATG13 індукує цитотоксичність та активує апоптоз у клітинних лініях раку сечового міхура. Окрім очікуваного зниження автофагії, нокдаун ATG7 призводив також до запуску стресу ендоплазматичного ретикулума, накопичення дефектних мітохондрій, розвитку оксидативного стресу, активації AMPK (кіназа, що активується AMP, AMP-activated protein kinase) та значного пригнічення трансляції протеїнів [115]. Нещодавні експерименти на мишачих моделях із KRAS-індукованими гліомами виявили, що інгібування автофагії призводило до суттєвого пригнічення розвитку гліобластом. Цікаво, що наступні *in vitro* дослідження виявили, що клітини гліоми із пригніченим ATG7 за допомогою shRNA були неспроможні підтримувати активний ріст на поживних середовищах з низькою концентрацією сироватки та були схильні до сенесценції, що вказує на роль автофагії у якості сигнального шляху відповіді на стрес, який є необхідним для обходу клітинного старіння та підтримання метаболічної активності в жорстких умовах мікрооточення [116].

Адапторний протеїн TRADD (TNFRSF1A-associated via death domain) містить death-домен, взаємодіє із рецептором TNFRSF1A та є важливим регулятором різних шляхів апоптозу та некроптозу, в тому числі опосередкованому мітохондріями апоптозі нейронів [117-119]. Дослідження Shukla et al. [120] показали, що пригнічення TRADD та цикліну CCNE1 за допомогою microRNA-30c-3p у клітинах раку молочної залози призводить до негативної регуляції NF-κB-сигналювання та прогресії клітинного циклу.

1.3. Роль гіпоксії в рості злоякісних пухлин та механізми гіпоксичної регуляції експресії генів

Мультиформна гліобластома (астроцитома IV ступеня) вважається найбільш злоякісною пухлиною головного мозку з високоагресивною поведінкою, важко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю виживання пацієнтів [4]. У порівнянні з досягненнями в області терапії інших

солідних пухлин, упродовж кількох десятиліть не вдалось досягнути помітного прогресу у зниженні смертності пацієнтів з гліобластою, що вимагає кращого розуміння патогенезу гліобластоми, покращення існуючих та створення нових перспективних терапевтичних стратегій.

Гіпоксія – це фундаментальний біологічний феномен, властивий великій кількості солідних пухлин. Здатність пухлинних клітин адаптуватись до умов гіпоксії та їх виживання регулюється родиною транскрипційних факторів HIF, що індукуються гіпоксією (hypoxia inducible factor) [121-123]. Фактори HIF функціонують у якості ключових транскрипційних факторів, що регулюють гени, чутливі до гіпоксії, та відіграють вирішальну роль у рості пухлин, метастазуванні, стійкості до хемо- та радіотерапії, а також у підтриманні фенотипу стовбурових ракових клітин (cancer stem cells, CSCs) [124, 125]. Таким чином, характерні для пухлин гіпоксія та порушена експресія факторів HIFs з їх подальшими біологічними наслідками, призводять до пухлинних рецидивів, поганої відповіді на терапію та розвитку несприятливих прогнозів для пацієнтів з солідними пухлинами, в тому числі гліобластомами [126-129].

Фактор HIF складається з двох субодиниць: HIF- α , що є кисневочутливою, та HIF- β , що експресується конститутивно. За умов активації HIF ці субодиниці формують функціональний гетеродимер. Три субодиниці HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α) є чутливими до кисню. Серед них HIF-1 α є найбільш поширеною та індукується за умов низьких концентрацій кисню у багатьох типах клітин. Підвищений рівень експресії HIF-1 α у пухлинах позитивно корелює з активним ростом пухлин та поганим прогнозом у пацієнтів з пухлинами мозку [130]. Субодиниця HIF-2 α експресується переважно гліомними стовбуровими клітинами GSCs, тоді як інший член родини, HIF-3 α , втратив домен транскрипційної активації та функціонує як доміант-негативний регулятор відповіді на гіпоксію [131, 132].

Активність факторів HIF регулюється серією кисневозалежних модифікацій. За нормоксії, субодиниця HIF-1 α гідроксильується по специфічним проліновим залишкам (Pro-402, Pro-564), а потім убіквітинується

пухлинним супресором VHL (von-Hippel–Lindau tumor suppressor gene) і швидко розщеплюється 26S-протеасомою [133, 134]. Окрім того, транскрипційна активність HIF-1 α пригнічується ко-репресором FHN-1 (фактор, що інгібує HIF-1 α , factor inhibiting HIF-1), що рекрутує гістонові деацетилази до HIF-1 α за умов нормоксії [133]. За умов гіпоксії проліл-гідроксилази PHD (prolyl hydroxylase) та інгібітор HIF-1 α інактивуються, що призводить до стабілізації HIF-1 α та індукції HIF-1 α -залежної клітинної відповіді: активації ангиогенезу, регуляції інфільтрації пухлини імунними клітинами та ремоделювання анаеробних та аеробних метаболічних процесів [135, 136]. Оскільки гіпоксія є характерною рисою пухлинного мікрооточення, HIF-1 α часто є активним у солідних пухлинах, до яких належать і гліобластоми [137]. Окрім низьких концентрацій кисню, HIF-1 α активується додатковими стимулами, такими, як рівні позаклітинного АТФ [126, 137-139].

Комплекс HIF-1 α з HIF-1 β (також відомий як ядерний транслокатор рецептора AHR, the AHR nuclear translocator, ARNT) транслокується до ядра, де контролює експресію численних генів-мішеней, що містять консенсусні послідовності, чутливі до гіпоксії (hypoxia-response elements, HREs) [140, 141]. Було виявлено, що HIF-1 α регулює експресію більш, ніж 40 генів-мішеней, протеїнові продукти яких контролюють ангиогенез, метаболізм та виживання клітини [142].

Субодиниця HIF-1 α була ідентифікована як важливий регулятор метаболізму глюкози та ключовий рушійний фактор ефекту Варбурга у кількох пухлинах, що включали і гліоми [134, 137]. Наприклад, HIF-1 α посилює експресію гексокінази 2 (hexokinase 2, HK2) – ензиму, що надекспресується у гліомах та відіграє вирішальну роль в ініціації гліколізу [143, 144]. Окрім того, HIF-1 α стимулює експресію кінази 1 піруватдегідрогенази (PDK1), що пригнічує піруватдегідрогеназу і, таким чином, обмежує надходження пірувату до циклу трикарбонових кислот [145]. Отже, HIF посилює гліколіз шляхом безпосередньої активації ключових компонентів цього метаболічного шляху.

Існують додаткові механізми, що підсилюють гліколіз у гліомі. Наприклад, було виявлено мутації IDH1, ключового ензиму циклу трикарбонових кислот, у 20 % випадках гліом, особливо у молодих пацієнтів [92, 146]. Важливо зазначити, що мутантна форма IDH1 може інгібувати активність нормального IDH1 у доміантний спосіб. Більш того, мутований IDH1 підвищує рівень HIF-1 α , захищаючи його від деградації [147-149]. У гліомах, які експресують мутантний IDH1 (R132H), спостерігається підвищена транскрипційна активність HIF-1 α , що призводить до посилення ангиогенезу та інших HIF-залежних процесів, що відбуваються за умов гіпоксії. Подібні ефекти були описані для мікроРНК, надекспресія яких корелювала з поганою виживаністю пацієнтів з гліобластомами. Дійсно, було показано, що miR-148a та miR-31 задіяні у сигналювання HIF-1 α , і таким чином, регулюють ріст гліоми та ангиогенез [147]. Таким чином, мутації IDH1 та епігенетичні зміни разом з гіпоксією та іншими метаболічними змінами, що супроводжують розвиток гліобластоми, активують HIF-1 α , посилюючи метаболічне репрограмування, сприяють пухлиногенезу.

Внесок гіпоксії та HIFs у пухлинний ангиогенез, міграцію та стійкість до терапії у гліобластомах також є добре відомим [150]. HIF1 α є однією з найбільш важливих рушійних сил регуляції про-ангиогенного фактора VEGF (vascular endothelial growth factor, ендотеліальний фактор росту судин), який є необхідним для утворення нових кровоносних судин та призводить до фізіологічного та патологічного ангиогенезу [151].

Таким чином, гіпоксія та фактори HIF спрямовують гліобластоми в бік більш агресивної та злоякісної поведінки. За умов низьких концентрацій кисню активується фактор диференціації клітин Notch1, що в свою чергу індукує експресію TRPC6 (канали транз'єнтного рецепторного потенціалу, transient receptor potential 6) у первинних пухлинах і клітинних лініях з гліобластоми, що призводить до активації транскрипційного фактору NFAT (ядерний фактор активованих Т-клітин, nuclear factor of activated T-cells) та веде до посиленої клітинної проліферації і пухлинного росту [152]. Окрім того, було виявлено

надекспресію рекомбінази RAD51, що відіграє ключову роль у мітотичній та мейотичній гомологічній рекомбінації, у клітинах гліоми за умов гіпоксії, що вказує на кооперацію генів, задіяних у репарації ДНК, з гіпоксією і факторами HIF, а також про їх участь у підсиленні клітинної проліферації та пухлинного росту [153]. Ці дослідження дозволяють стверджувати про посилення гіпоксією та факторами HIF процесів проліферації, інвазії та росту гліом [92, 125, 126, 143, 154].

1.4. Значення метаболізму глютаміну і глюкози в контролі процесів проліферації та функціонуванні мітохондрій у пухлинних клітинах

Численні дослідження виявили порушення або репрограмування шляхів метаболізму глюкози та глютаміну у пухлинних клітинах, що забезпечує їх ріст і виживання в жорстких умовах пухлинного мікрооточення [155-158].

В якості основного джерела енергії для клітинного росту, метаболізм глюкози включає процеси гліколізу, пентозо-фосфатного шляху та шляху синтезу серину, що відбуваються у цитоплазмі, а також цикл трикарбонових кислот у мітохондріях. Гліколіз – основний шлях метаболізму глюкози, в процесі якого утворений піруват може конвертуватись до лактату в якості кінцевого продукту для позаклітинної секреції або надходити до мітохондрій і включатись у цикл трикарбонових кислот та окислювальне фосфорилування. Шлях гліколізу може розгалужуватись до пентозофосфатного шляху або шляху синтезу серину через їх метаболічні інтермедіати.

Окрім того, шлях біосинтезу гексозамінів також слугує шляхом метаболізму глюкози, відгалужуючись від гліколізу на стадії утворення фруктозо-6-фосфату, та не лише бере участь у модифікації протеїнів, в процесі якої утворюється кінцевий продукт UDP-GlcNAc, але і координує індукцію метаболізму глюкози та глютаміну ростовими факторами [159].

Посилення аеробного гліколізу полегшує анаболічний метаболізм пухлинних клітин, постачаючи більшу кількість вуглецевих інтермедіатів для біосинтезу нуклеотидів, амінокислот та ліпідів [160]. Зміни онкогенів та

пухлинних супресорів регулюють метаболічні ензими і, таким чином, скеровують пухлинні клітини в бік аеробного гліколізу [161].

Було показано, що про-онкоген *c-Myc* (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*, гомолог вірусного онкогена міелоцитоматозу); є відповідальним за метаболічний зсув в бік гліколізу у пухлинних клітинах, а також регулює більшість ензимів гліколізу [162]. Окрім того, *Myc* задіяний в активацію генів, що відповідають за структуру і функціонування мітохондрій, а також стимулюють мітохондріальний біогенез [163]. Інший ключовий онкоген, *HIF* є основним регулятором метаболізму глюкози у пухлинних клітинах за умов низьких концентрацій кисню у середовищі, що є типовим для пухлинного розвитку. *HIF* активує експресію транспортерів глюкози та численних ензимів гліколізу, включаючи *GLUT1*, *GLUT3*, *HK1*, *HK2*, *GAPDH*, *PGK1*, *PKM2*, *LDHA* та *PDK1* [164, 165]. Фактор *HIF-1* не лише посилює поглинання глюкози та продукцію лактату, але разом з тим блокує цикл трикарбонних кислот та окислювальне фосфорилування у мітохондріях [164]. Тим не менш, пухлинний супресор *TP53* знижує поглинання глюкози клітинами, інгібуючи транскрипцію *GLUT1* та *GLUT4*, та відіграє ключову роль у негативній регуляції гліколізу за нормоксії чи гіпоксії через його мішені (*Mdm2*, *TIGAR*) [166, 167].

Окрім того, зростає кількість даних, що свідчать про важливу роль родини сіртуїнових деацетилаз у регуляції пухлинної прогресії та метаболізму. Було показано, що мишачі моделі, нокаутовані за генами *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4* або *SIRT6* є більш схильними до розвитку пухлин [168, 169]. Сіртуїни можуть контролювати метаболізм глюкози шляхом регуляції транскрипційної активності *c-Myc* і *HIF-1*, а також через безпосереднє деацетилювання та зміну активності ензимів шляху гліколізу [170-173]. Мітохондріальна деацетилаза *SIRT3* також стимулює метаболізм мітохондрій шляхом деацетилювання і активації ензимів циклу трикарбонних кислот та окислення жирних кислот [174]. Більше того, у регуляцію ефекту Варбурга є залученими мікроРНК, зокрема, через взаємодію з онкогенами і пухлинними супресорами *c-Myc*, *HIF-1* та *TP53* [175].

Глутамін - це найбільш поширена амінокислота плазми крові (концентрація - 0.57 мМ). Посилений метаболізм глутаміну є характерним для пухлин метаболічним порушенням, а за важливістю у якості поживної речовини для пухлинних клітин займає друге місце після глюкози [176, 177]. Подібно до глюкози, глутамін виступає прекурсором у синтезі АТФ та анаплерозі циклу трикарбонових кислот. Окрім забезпечення біоенергетичних потреб клітини, глутамін виконує низку інших важливих функцій у проліферуючих клітинах, включаючи синтез протеїнів, нуклеїнових кислот, ліпідів, гексозамінів, глутатіону і NADPH. Тому не дивно, що більшість клітин інтенсивно споживають глутамін під час росту, а деякі онкогени стимулюють метаболізм глутаміну у контексті клітинної проліферації [50, 178].

Після поглинання клітинами, глутамін метаболізується у замінну амінокислоту глутамат за участі ензиму глутамінази [179]. Існує два ізоформи глутамінази: ниркова форма, що кодується GLS1 та печінкова (цитоплазматичний ензим), що кодується GLS2 [180]. Глутамат, в свою чергу, метаболізується глутаматдегідрогеназами до альфа-кетоглутарату, який вступає в цикл трикарбонових кислот і може бути метаболізований до аспартату і малату.

Крім того, рівні фумарату, малату та цитрату, що є похідними глутаміну, значно зростають за умов дефіциту глюкози, що вказує на те, що глутамін запускає цикл трикарбонових кислот, незалежний від глюкози. Посилене використання глутаміну для продукції біоенергії мітохондріями та клітинного біосинтезу є ключовою рисою багатьох пухлинних клітин. Було показано, що сайленсинг пухлинного супресора LKB1 (liver kinase B1), що об'єднує біоенергетику із контролем росту клітин шляхом регуляції активності mTOR (mechanistic target of rapamycin, механістична мішень рапаміцину), посилює споживання глюкози та глутаміну пухлинними клітинами [181]. Разом із лейцином та аргініном глутамін є потужним активатором комплексу 1 mTOR, що призводить до автофагії [182]. Глутамін стимулює малий G-протеїн ARF1

(фактор 1 рибозилування ADP, ADP-ribosylation factor 1), активуючи, таким чином, mTOR [183].

Проте альфа-кетоглутарат, що походить із глутаміну, може також конвертуватись до цитрату шляхом реверсії реакцій циклу трикарбонових кислот, що каталізуються ізоцитратдегідрогеназою-1 (IDH1) та аконітазою 1 (ACO1) у цитоплазмі [184, 185]. Цей процес отримав назву глутамін-залежного відновлювального карбоксилювання. Гіпоксія може перемикає метаболізм глутаміну з окислювального на відновлювальне карбоксилювання. Sun et al. [186] ідентифікували механізм, за яким стабілізація HIF за умов гіпоксії сприяє убіквітинуванню і протеолізу субодиниці E1 α -KGDH (α -ketoglutarate dehydrogenase), що призводить до зниження активності α -KGDH та мітохондріального окиснення глутаміну до сукцинату (стандартна реакція ЦТК, що каталізується KGDH). Крім того, HIF-залежні зміни у метаболізмі глутаміну змінюють долю α -кетоглутарату від продукції енергії до продукції ліпідів, а також сприяють росту пухлин *in vivo* [186].

Вживання деяких типів пухлинних клітин залежить від доступності екзогенного глутаміну, а феномен глутамінової залежності контролюється окисно-відновним балансом [187].

1.5. Молекулярні основи синтезу і транспорту протеїнів до різних структур мітохондрій

Більше, ніж 1500 різних мітохондріальних протеїнів кодуються ядерними генами, синтезуються у вигляді попередників у цитозолі та містять сигнальну послідовність, що спрямовує їх до відповідного компартменту мітохондрій. Було показано, що імпорт протеїнів відбувається після повного синтезу протеїну за участі цитозольних шаперонів, що підтримують їх у незгорнутому стані і спрямовують до мітохондріальної транслокази зовнішньої мембрани TOM (translocase of the outer membrane) [188, 189].

Машинерія імпорту протеїнів продемонструвала велике різноманіття механізмів розпізнавання, транслокації та сортування протеїнів та є частиною

великої мережі, яка контролює біогенез мітохондрій, їх динаміку і функції за фізіологічних та патологічних умов. Зокрема, було ідентифіковано п'ять основних шляхів імпорту, кожен з яких характеризується певним типом сигнальної послідовності [189].

Класичний шлях імпорту отримав назву шляху пре-послідовностей (the presequence pathway). Переважна більшість матричних протеїнів, а також багато протеїнів внутрішньої мембрани синтезується з позитивно-зарядженою N-кінцевою пре-послідовністю, що служить сигнальною послідовністю [190]. Пре-протеїни, що містять цю послідовність імпортуються за участі транслокази зовнішньої мембрани TOM та транслокази внутрішньої мітохондріальної мембрани TIM23 (translocase of the inner membrane) [191, 192]. Комплекс TOM функціонує як головний вхід як для пре-протеїнів, що підлягають розщепленню, так і для більшості нерозщеплювальних білків-прекурсорів та складається із рецепторних протеїнів на цитозольному боці зовнішньої мітохондріальної мембрани (Tom70, Tom20 і Tom22) і протеїну Tom40, що утворює канал транслокації [193].

Мембранний потенціал $\Delta\psi$ внутрішньої мембрани мітохондрій (негативний заряд з матриксного боку) активує транслоказу TIM23 та скеровує протеїни із позитивно зарядженими пре-послідовностями до матриксу мітохондрій [194]. Транслокаційний мотор PAM (presequence translocase-associated motor, modular) містить мітохондріальний шаперон mtHsp70 і керує транслокацією протеїнів-попередників до матриксу, де процесуюча пептидаза мітохондрій MPP (mitochondrial processing peptidase) відщеплює сигнальну послідовність [189, 195, 196].

Додаткові процесуючі ензими матриксу здійснюють контроль якості мітохондріальних протеїнів. Зокрема, мітохондріальні протеїни можуть підлягати деградації в залежності від наявності стабілізуючих або дестабілізуючих амінокислотних залишків на N-кінці поліпептидного ланцюга [197]. Пептидази Icp55 (intermediate cleaving peptidase of 55 kDa) та Oct1 (octapeptidyl peptidase) видаляють дестабілізуючі амінокислотні залишки з

N-кінця, що захищає протеїни від деградації матриксними протеазами [198]. Після цього шаперон mtHsp70 за участі комплексу шаперонінів Hsp60–Hsp10 здійснює фолдинг імпортованих протеїнів.

У випадку інших чотирьох механізмів імпорту протеїнів – білки-попередники не містять послідовностей, які розщеплюються, проте мають різні типи внутрішніх сигнальних послідовностей. Попередники інтегральних протеїнів внутрішньої мітохондріальної мембрани можуть транспортуватись двома різними шляхами. Прекурсори із гідрофобною сигнальною послідовністю спочатку затримуються в комплексі TIM23, де взаємодіють із невеликим гідрофобним протеїном Mgr2, що відповідає за контроль якості сортування протеїнів і регулює латеральне вивільнення пре-протеїнів до внутрішньої мембрани мітохондрій (stop transfer pathway, шлях транспортування із затримкою) [199]. Інші протеїни внутрішньої мембрани мітохондрій спочатку транспортуються до матриксу, а потім вбудовуються у внутрішню мембрану інсертазою OXA (oxidase assembly protein 1), яка також задіяна у вставці мітохондріально-кодованих мембранних протеїнів (шлях консервативного сортування) [200].

Переважаюча частина протеїнів міжмембранного простору містить характерні цистеїнові мотиви, що підлягають окисненню з утворенням стабілізуючих дисульфідних зв'язків в нативному протеїні. Дані протеїни також транспортуються через комплекс TOM за участі машинерії імпорту та збірки протеїнів міжмембранного простору MIA (mitochondrial intermembrane space import and assembly), що розпізнає сигнальну послідовність, представлену гідрофобним елементом, фланкованим залишками цистеїну [201]. Два головні компоненти системи MIA, оксидоредуктаза Mia40 та сульфгідрильна оксидаза Egv1, відповідають за утворення внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків і дозрівання імпортованих протеїнів [189, 202].

Наступний шлях імпорту протеїнів характерний для протеїнів зовнішньої мітохондріальної мембрани із третинною структурою β -діжки. Прекурсори таких протеїнів через комплекс TOM транспортуються до міжмембранного

простору, де зв'язуються з шаперонами TIM (small TIM chaperones) та вбудовуються у зовнішню мембрану за участі машинерії сортування та збірки SAM (the sorting and assembly machinery) [203]. Сигнальна послідовність зазвичай знаходиться всередині α -спірального трансмембранного сегменту та фланкується позитивно зарядженими амінокислотними залишками.

П'ятий шлях імпорту використовується рядом протеїнів зовнішньої мембрани з альфа-спіральними трансмембранними сегментами. Як монотопічні протеїни із N-кінцевою сигнально-якірною послідовністю, так і політопічні протеїни ефективно транспортуються комплексом мітохондріального імпорту MIM, за участі Tom70 [204].

Нещодавні дослідження виявили багато мРНК, що кодують мітохондріальні протеїни, локалізованих біля зовнішньої мембрани мітохондрій [205]. Дослідження трансляції дозволяють припустити, що багато з цих мРНК транслуються локально, що, імовірно, вказує на існування ко-трансляційного імпорту у мітохондрії [188]. Важливо зазначити, що локалізація молекул мРНК у специфічних клітинних локусах є вагомим регуляторним механізмом як просторового, так і часового контролю синтезу протеїнів.

Одночасність трансляції та імпорту має особливу перевагу для мембранних протеїнів, що містять гідрофобні домени, оскільки ко-трансляційний імпорт мінімізує шанси агрегації у цитоплазматичному просторі. Дослідження ізольованих рибосом, асоційованих з мітохондріями, та їхніх мРНК виявили, що більшість мРНК протеїнів мітохондріальної внутрішньої мембрани транслуються у безпосередній близькості від мітохондрій [206].

1.6. Сенсорно-сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума та їх роль у рості злоякісних пухлин

Ендоплазматичний ретикулум (ER) – це динамічна мережа мембранних каналців і пухирців, що керує біосинтезом, фолдингом, дозріванням і транспортом понад третини усіх секреторних і трансмембранних протеїнів клітини [207]. Окрім того, ендоплазматичний ретикулум бере участь у багатьох

клітинних процесах, що включають біосинтез холестеролу, триацилгліцеролів і фосфоліпідів, метаболізм глюкози та підтримку Ca^{2+} -гомеостазу [208, 209]. Цікаво, що ER контактує з усіма внутрішньоклітинними органелами і через дані взаємозв'язки проявляє свої багатогранні функції: виступає сенсором усіх внутрішньо- і позаклітинних змін, відповідає за трансдукцію сигналу і керує багатьма клітинними процесами [8].

Машинерія контролю якості протеїнів ER складається із трьох ланок: полегшення правильного фолдингу протеїнів, активація відповіді на не згорнуті протеїни і деградація неправильно згорнутих протеїнів за допомогою механізму ER-асоційованої деградації ERAD. За цим механізмом, не згорнуті протеїни повертаються до цитозолу, де підлягають убіквітинуванню та наступній деградації 26S-протеасомою [210].

Широкий спектр клітинних стимулів може порушувати ефективність фолдингу протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі та призводити до накопичення неправильно згорнутих протеїнів в цій органелі – стану, відомого під назвою «стрес ендоплазматичного ретикулума» [211]. Умови, що провокують стрес ER, включають дефіцит поживних речовин, гіпоксію, точкові мутації секреторних протеїнів, що стабілізують проміжні фолдингові стани або викликають агрегацію протеїнів, порушення кальцієвого гомеостазу, що має негативний вплив на кальцій-залежні шаперони ER, тощо.

У відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума запускається каскад внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на не згорнуті протеїни» (UPR, unfolded protein response). UPR виступає тісно взаємозв'язаною сигнальною мережею, яка трансдукує статус фолдингу протеїнів від ER до цитозолу та ядра і, таким чином, знижує протеїнове навантаження та полегшує фолдинг протеїнів. Активація UPR ініціює дві послідовні у часі клітинні події для зниження протеїнового навантаження: початкову реакцію зниження біосинтезу протеїнів та посилення деградації неправильно згорнутих протеїнів та другу хвилю, що посилює експресію сотень генів, залучених у глобальний контроль протеостазу [211, 212].

У багатоклітинних еукаріотів, UPR представлена трьома трансмембранними сенсорами: активуючим транскрипційним фактором 6 ATF6, (activating transcription factor 6), ензимом 1, чутливим до інозитулу IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) та PRK-подібною кніазою ендоплазматичного ретикулума PERK (PRK-like endoplasmic reticulum kinase) (Рис. 1.1) [13]. За фізіологічних умов, всі три трансмембранні сенсори підтримуються у інактивованому стані через асоціацію з шапероном, що зв'язує імуноглобуліновий протеїн (BiP, binding immunoglobulin protein, також відомий як GRP78 – 78 kDa glucose-regulated protein, 78 кДа протеїн, що регулюється глюкозою). За умов накопичення неправильно згорнутих та не згорнутих протеїнів, BiP дисоціює від сенсорів ER і рекрутується до неправильно згорнутих протеїнів, що веде до активації сенсорних молекул. Якщо адаптивні можливості UPR перенавантажені стійким стресом ER, відбувається переключення клітинної відповіді у бік клітинної смерті через продукцію активних форм кисню, активацію про-апоптичних білків родини Bcl-2, регуляцію мікроРНК та вивільнення Ca^{2+} [213].

PERK – трансмембранна Ser/Thr-кіназа ендоплазматичного ретикулума, олігомеризація та транс-автофосфорилування якої веде до пригнічення загального рівня трансляції протеїнів шляхом фосфорилування еукаріотичного фактора ініціації трансляції 2 (eIF2a) по залишку Ser51 [211, 212]. Ця подія знижує протеїнове навантаження в ендоплазматичному ретикулумі і, в той же час, дозволяє вибірково трансляцію мРНК, що кодує активуючий транскрипційний фактор ATF4 (activating transcription factor 4). В свою чергу, ATF4 посилює експресію ряду генів, серед яких – транскрипційний регулятор CHOP (C/EBP homologous protein, протеїн гомологічний C/EBP), оксидоредуктаза ендоплазматичного ретикулума ERO1 і анти-проліферативний фактор GADD34, що беруть участь у процесах фолдингу, автофагії, окисно-відновного гомеостазу, метаболізмі амінокислот та апоптозі [8, 214, 215].

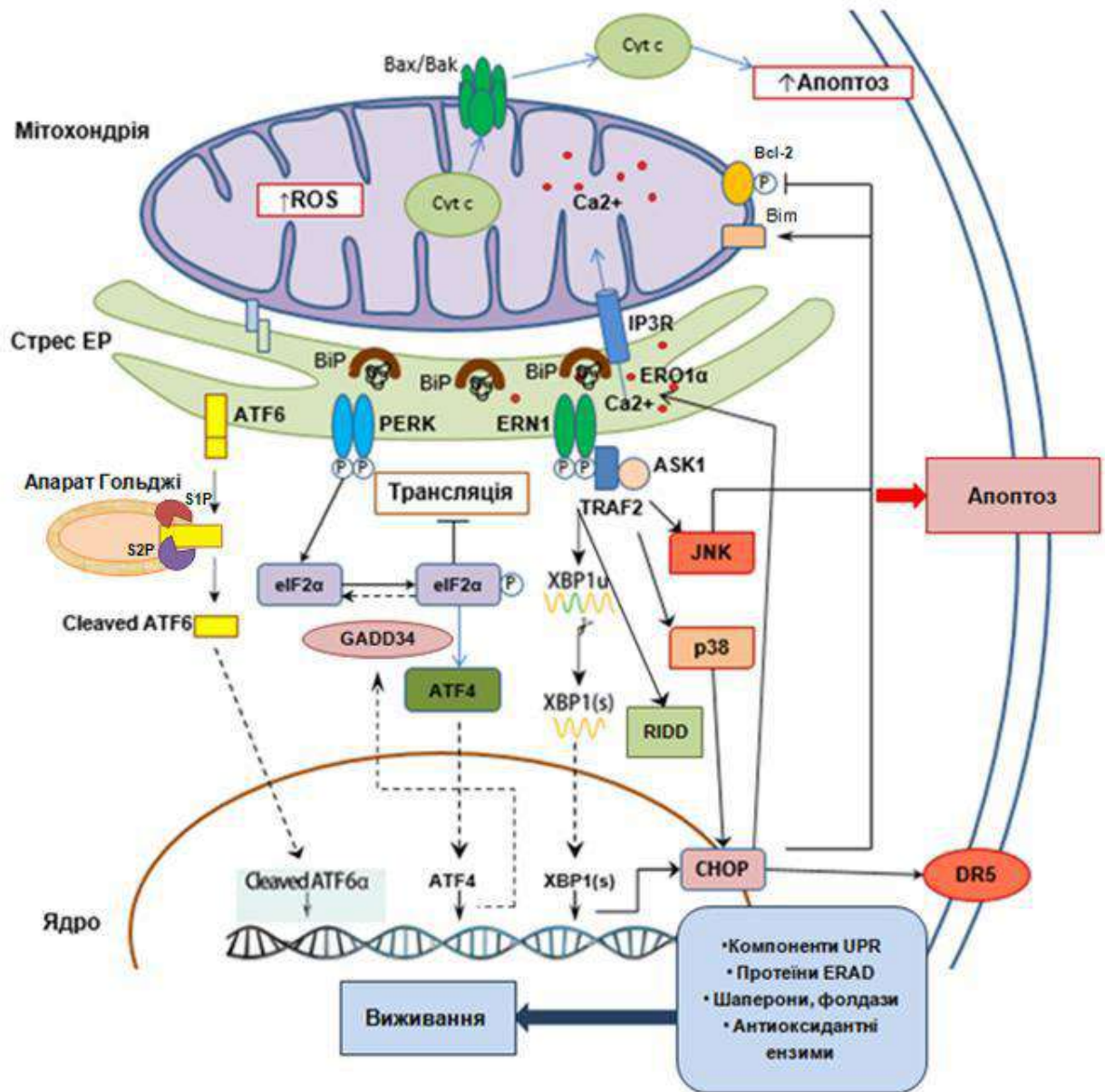


Рис. 1.1. Опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами реакція клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума

Транскрипційний фактор CHOP, відомий ще як DDIT3 або GADD153, відіграє провідну роль у стрес-індукованому апоптозі за надмірної або хронічної активації PERK [215, 216], стимулюючи Вах-Вак-опосередковану пермеабілізацію мітохондріальної мембрани та про-апоптичні шляхи CaMKII (ERO1α-IP3R-Ca²⁺-Ca²⁺/кальмодулін-залежна протеїнкіназа II), каспази-3 і c-Jun [217, 218]. Окрім того, CHOP активує транскрипцію фактора GADD34, що є регуляторною субодиницею 15A протеїнофосфатази 1 (PPP1R15A; protein

phosphatase 1, regulatory subunit 15A), та бере участь у відновленні синтезу протеїнів шляхом дефосфорилування фактору ініціації eIF2 α і сприяє виходу клітини із стану стресу ER [8, 215].

Транскрипційний фактор ATF6 належить до родини b-ZIP протеїнів та представлений двома ізоформами ATF6 α та ATF6 β , що за фізіологічних умов існують у мономерній, димерній або олігомерній формах. За умов стресу, ATF6 вивільняється від шаперона BiP і транслокується до апарату Гольджі, де зазнає обмеженого протеолізу двома сайт-специфічними протеазами S1P та S2P. Утворений цитозольний p50-фрагмент транспортується до ядра, де індукує транскрипцію численних генів, залучених в процеси фолдингу протеїнів та шлях ER-залежної деградації протеїнів ERAD, що сприяє полегшенню протеїнового навантаження в ER та відновленню гомеостазу. Цікаво, що експресія мРНК транскрипційного фактору XBP1 (X-box binding protein 1, протеїн, що зв'язується з X-боксом) також індукується ATF6, проте для активації даного фактора необхідний інший медіатор стресу ER – сигнальний ензим IRE1 [219].

Важливо зазначити, що фосфорилування eIF2 α представляє точку конвергенції різних шляхів стресу ER, так звану «інтегровану відповідь на стрес», що знаходиться під контролем специфічних кіназ, які активуються під час запалення, вірусних інфекцій, дефіциту поживних речовин, тощо [220]. Крім того, прикладом інтегральної взаємодії трьох сигнальних систем стресу ER є спільна регуляція про-апоптичного протеїну CHOP і транскрипційних факторів FOXO1 та XBP1, спрямована на репрограмування метаболізму для посилення відповіді на не згорнуті протеїни [14, 221].

Все частіше сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулума і відповідь на не згорнуті протеїни визнаються центральним рушійним фактором розвитку широкого кола захворювань людини, включаючи нейродегенеративні розлади, цукровий діабет, вірусні інфекції та фіброз легень, запальні та автоімунні захворювання, хвороби серцево-судинної системи та рак [13].

Було показано, що хронічна активація сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула тісно пов'язана із злоякісною трансформацією, агресивним ростом пухлин та набуттям резистентності до анти-ракових препаратів [13]. Пухлинні клітини використовують стрес ендоплазматичного ретикулула для адаптації до складних умов мікрооточення. Наприклад, однією із про-виживальних стратегій пухлинних клітин є активація шляху PERK/eIF2 α /ATF4, що індукує автофагію – процес, який дозволяє раковим клітинам генерувати додаткову енергію шляхом селективної або неселективної деградації білкових агрегатів чи пошкоджених органел [222]. В той же час, роль сигнального шляху ATF6 у пухлиногенезі ще недостатньо описана, проте ймовірно, що цей датчик стресу ER відповідає за підтримання пухлинних клітин у стані спокою, що сприяє розвитку хеморезистентності шляхом регуляції адаптивних шляхів [10, 223].

Сигнальний ензим IRE1 ініціює один із найконсервативніших шляхів стресу ER. Його ізоформа IRE1 α експресується усіма клітинами організму, тоді як IRE1 β є характерною для тканин кишечника. Трансмембранний протеїн IRE1 являє собою біфункціональний ензим, цитозольні домени якого володіють Ser/Thr-кіназною та ендорибонуклеазною активностями [212]. Під час стресу ER, IRE1 димеризується та автофосфорилується, що призводить до конформаційних змін, які активують ендорибонуклеазний домен. Ендорибонуклеаза здійснює альтернативний сплайсинг мРНК транскрипційного фактора XBP1, вирізаючи короткий інтрон із 26 нуклеотидів, що призводить до зсуву рамки зчитування та продукції стабільного і функціонально активного XBP1. Цей транскрипційний фактор відіграє важливу роль у запуску відповіді на не згорнуті протеїни та відновленні клітинного гомеостазу, оскільки індукує експресію сотень генів, що включають шаперони, фолдази, компоненти ER-залежного шляху деградації протеїнів та синтезу ліпідів [224, 225].

Крім сплайсингу XBP1, ендорибонуклеазний домен IRE1 α регулює стабільність численних мРНК за допомогою консервативного механізму «IRE1-

залежної деградації» (RIDD, regulated IRE1-dependent decay) [226]. Процес RIDD залучений у деградацію певних мРНК та мікроРНК, що беруть участь у контролі метаболізму глюкози, запальних реакціях та апоптозі [227]. Деякі з цих РНК є причетними до пухлиногенезу, наприклад мРНК *PDFGR*, *SPARC* і *PER1* та мікро-РНК miR-17 і miR-96 [227, 228]. Таким чином, RIDD бере участь у підтримці гомеостазу ER шляхом зниження протеїнового навантаження через деградацію певних мРНК, які мають специфічні до IRE1 послідовності.

1.7. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції процесів проліферації та репрограмуванні мітохондрій

Численні дослідження продемонстрували участь UPR, зокрема сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1, у репрограмуванні пухлинних клітин під час пухлиногенезу, а також у визначенні таких онкогенних маркерів, як клітинна трансформація, метастатичний потенціал, стабільність геному, ангиогенез, імунна толерантність та метаболічний статус клітини [10, 209, 229].

Піонерські дослідження Drogat et al. продемонстрували, що надекспресія домінантнегативної форми dnIRE1 у клітинах гліоми лінії U87 пригнічувала експресію про-ангіогенного фактора VEGFA, індуковану гіпоксією або дефіцитом глюкози [230]. В свою чергу, фактори, що індукуються гіпоксією (HIFs) активують сигнальні системи стресу ER [231].

Оцінка росту пухлин із контрольних клітин гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченою функціональною активністю IRE1 (dnIRE1), що були трансплантовані в мозок мишей або ембріони курей, виявила, що пухлини із IRE1-дефіцитних клітин характеризуються значно меншими розмірами та зниженою васкуляризацією [15, 16]. Було показано, що блокада функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 в клітинах гліоми модулює експресію численних про- та анти-ангіогенних факторів та генів, що кодують протеїни, асоційовані із пухлинним супресором p53 та компоненти системи

інсуліноподібного фактора росту [130, 232-235]. В той же час, пригнічення активності IRE1 у клітинах гліоми призводило до зростання рівня експресії важливого модулятора міграції клітин астроцитоми SPARC та маркерів епітеліально-мезенхімального переходу, що стимулює міграцію пухлинних клітин і демонструє здатність пухлинних клітин адаптуватись до агресивних умов мікрооточення [236].

Було показано, що активація IRE1 сигнального шляху пригнічує мітохондріальну активність через обмеження використання альтернативних джерел вуглецю для підтримання мітохондріального дихання за умов дефіциту глюкози, що є характерною рисою пухлинних клітин та виступає про-виживальною стратегією сповільнення метаболічних процесів за несприятливих умов [237].

Крім того, було продемонстровано тісний взаємозв'язок UPR та мітохондріального оксидативного стресу [238]. Також відомо, що кілька мітохондріальних протеїнів (наприклад, про-апоптичний протеїн Bax) безпосередньо зв'язуються з IRE1 в ER та беруть участь у регуляції клітинного виживання [239]. Беручи до уваги ці факти, можна припустити, що мембранні мікроструктури MAM (mitochondrion-associated ER membrane, мембрани ER, асоційовані з мітохондріями), що є контактами між ER та мітохондріями, можуть слугувати важливими локусами про- та анти-апоптичних сигналів між цими двома органелами. Також було виявлено, що сигнальний протеїн IRE1 локалізується переважно в MAM, а шаперон Sig-1R, що є резидентом MAM, під час стресу ER стабілізує IRE1 у правильній конформаційній формі для наступної його димеризації та формування активної ендорибонуклеази. Окрім того, IRE1 та MAM є сенсорами активних форм кисню, що продукуються мітохондріями. Таким чином, ER-мітохондріальні контакти є важливими регуляторами клітинного виживання через посилення стрес-опосередкованого сигналювання між мітохондріями, ER та ядром [240].

Численні гени, що кодують протеїни мітохондрій також є цільовими мішенями для XBP1-опосередкованого транскрипційного репрограмування, що

вказує на участь мітохондрій у відповіді на стрес ER [241, 242]. Дані гени-мішені кодують компоненти дихального ланцюга та фактори, що відповідають за його формування, а також гем- та O₂-залежний транскрипційний фактор Hnf1. Інші мішені UPR беруть участь у антиоксидантному захисті та мітохондріальному контролі якості протеїнів [243, 244].

Враховуючи тісний взаємозв'язок пухлинного росту, систем стресу ендоплазматичного ретикулума та функціональної активності мітохондрій, а також важливу роль ядерних генів, що кодують мітохондріальні протеїни у регуляції процесів проліферації, апоптозу та автофагії як у нормі, так і за злоякісного росту, логічно припустити, що дані ензими та фактори можуть бути причетними до IRE1-залежного репрограмування клітин гліоми, яке лежить в основі пригнічення їх проліферації за умови інгібування сенсорно-сигнального ензиму IRE1. З'ясування молекулярних механізмів регуляції процесів виживання та клітинної загибелі за пухлиногенезу з метою пошуку потенційних генів-мішеней для створення нових анти-пухлинних препаратів є одним із найбільш актуальних напрямків сучасної біохімії. Дослідження експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1, ключового медіатора відповіді на стрес, дозволить поглибити розуміння молекулярних механізмів пригнічення росту гліом та ідентифікувати потенційні гени-мішені для створення нових протипухлинних терапевтичних стратегій.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та умови проведення експериментів

Клітини культури гліоми лінії U87 були отримані з American Type Culture Collection (ATCC, США). Для досліджень використовували три сублінії цієї клітинної лінії. Перша сублінія (контрольні клітини гліоми) була отримана шляхом селекції стабільно трансфікованих клонів, що надекспресували «порожній» вектор pcDNA3.1+ (Invitrogen, США). Друга сублінія клітин була люб'язно надана професором Мішелем Моне (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангиогенезу, Університет Бордо 1, Франція) і представляла собою dnIRE1-клітини з повним пригніченням (як кінази, так і ендорибонуклеази) функціональної активності IRE1 за допомогою домінант-негативної кДНК-конструкції dnIRE1. dnIRE1-клітини третьої сублінії були отримані проф. О. Г. Мінченком (відділ молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) та характеризувались частковим пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 в результаті надекспресії домінант-негативної кДНК-конструкції dnIRE1 [15, 230]. Ефективність пригнічення функціональності активності IRE1 було оцінено раніше за рівнем експресії сплайсованої форми XBP1, ключового транскрипційного фактору IRE1-залежного сигналювання, та рівнем фосфорильованої ізоформи IRE1 у клітинах з індукцією стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (0,01 мг/мл, протягом 2 год.). Нормальні астроцити людини лінії NHA/TS (ATCC, США) були використані для порівняння клітин гліоми із нормальними [15, 235].

Клітини росли відповідно до рекомендацій виробника в середовищі DMEM (мінімальному есенціальному середовищі Eagle's у модифікації Dulbecco, Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 мМ глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Bio, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco, США) та стрептоміцин (0,1 мг/мл; Gibco,

США) . Клітини культивували в чашках для культур клітин CellStar діаметром 10 см (*Greiner bio-one*, Німеччина) в інкубаторі з 5% CO₂ при +37°C.

Для створення умов гіпоксії, клітини поміщали в атмосферу 3% O₂, 5% CO₂ та 92% N₂ і культивували протягом 16 годин [235].

Для моделювання умов дефіциту глюкози та глютаміну клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (*Thermo Fisher Scientific*, США), додавали середовище DMEM (*Gibco*, США) без глюкози або глютаміну та інкубували протягом 16 годин.

Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума у поживне середовище, в якому культивували клітини гліоми лінії U87, додавали тунікаміцин (0,01 мг/мл) та витримували протягом 2 годин.

2.2. Методи досліджень

У роботі були використані методи біохімії та молекулярної біології: виділення тотальної РНК та екстрактів протеїнів з клітин, визначення концентрації та якості зразків РНК спектрофотометричними методами, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотної транскрипції, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), електрофоретичні методи аналізу нуклеїнових кислот та протеїнів, метод імуноблотингу, біоінформаційний аналіз та статистична обробка отриманих даних.

2.2.1. Виділення РНК із клітин гліоми. Виділення тотальної РНК з клітин гліоми здійснювали за допомогою реагенту TRizol (*Invitrogen*, США), згідно з протоколом виробника. Культуральні чашки діаметром 10 см промивали фосфатно-сольовим буфером (*Thermo Fisher Scientific*, США), після чого додавали 1 мл препарату TRizol та інкубували протягом 5 хв. на льодяній бані. Лізати клітин переносили у мікропробірки, додавали 200 мкл хлороформу і центрифугували при 15000 g протягом 10 хв. за 4°C до повного розділення водної і фенольної фаз. Верхню водну фазу відбирали в нові мікропробірки,

додавали ізопропанол у співвідношенні 1:1 та витримували 2 год. при -30°C , після чого зразки центрифугували при 15000 g протягом 15 хв. за 4°C для осадження РНК. Осад РНК промивали 75% етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували 95% етанолом для видалення можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК. Чистоту та концентрацію препаратів РНК контролювали спектрофотометрично, використовуючи безкюветний спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, США).

2.2.2. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції.

Отриману тотальну РНК використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК за допомогою набору QuantiTect Reverse Transcription Kit (*QIAGEN*, Німеччина). Для елімінації можливих залишків геномної ДНК до 1 мкг РНК додавали буфер gDNA Wipeout, що містив ДНКазу, та інкубували протягом 2 хв при $+42^{\circ}\text{C}$. Потім до суміші додавали 1 мкл розчину зворотної транскриптази Quantiscript, 4 мкл буферного розчину (Quantiscript RT Buffer), що містив інгібітор рибонуклеаз, та 1 мкл олігонуклеотидних праймерів (Primers mix), після чого інкубували протягом 15 хвилин при 42°C . Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хвилин, після чого швидко охолоджували її на льоду. Отриману кДНК використовували для дослідження експресії генів за допомогою методу кількісної ПЛР.

2.2.3. Ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції.

Рівень експресії ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій, визначали за допомогою методу кількісної полімеразної реакції у реальному часі, використовуючи прилади „QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*, США) та „Mx 3000P QPCR” (*Stratagene*, США).

Таблиця 2.1

Олігонуклеотидні праймери, використані для визначення рівня експресії мРНК досліджених генів методом полімеразної ланцюгової реакції

Ген	Послідовності праймерів (п – прямий, з – зворотний)	Відповідні послідовності генів	GenBank номер
<i>β-актин</i> (<i>ACTB</i>)	п: 5'-cgtaccactggcatcgtgat-3' з: 5'-gtgttgccgtacaggtcttt-3'	п: 704-723 з: 937-918	NM_001101
<i>ME2</i>	п: 5'-ttctctgtaacacccggcat-3' з: 5'-tggccttgcttcaggttct-3'	п: 1695-1714 з: 1910-1891	NM_002396
<i>MDH2</i>	п: 5'-cctgttcaacaccaatgcca-3' з: 5'-gccgaagatttgttgggg-3'	п: 478-497 з: 646-627	NM_005918
<i>IDH2</i>	п: 5'-tgctccagtatgccatcca-3' з: 5'-tcatagttcttcgaggccca-3'	п: 867-886 з: 1099-1080	NM_002168
<i>GOT2</i>	п: 5'-aactagccctgggtgagaac-3' з: 5'-cctgtgaagtcaaacaccgca-3'	п: 461-480 з: 707-688	NM_002080
<i>SDHB</i>	п: 5'-agaaactggacgggctctac-3' з: 5'-tgtggcagcggatagagag-3'	п: 684-703 з: 884-865	NM_003000
<i>SDHD</i>	п: 5'-gagtccagggacaagacca-3' з: 5'-ctcctccgctttcagttg-3'	п: 229-248 з: 401-382	NM_003002
<i>POLG</i>	п: 5'-gatctggccaatgatgctg-3' з: 5'-aaactcctcctcactgc-3'	п: 1675-1694 з: 1899-1880	NM_002693
<i>TSMF</i>	п: 5'-aaacctgaagacggtggcc-3' з: 5'-ctgctcttcaccttcca-3'	п: 798-817 з: 1021-1002	NM_005726
<i>MTIF2</i>	п: 5'-tgtggaagagaccagtag-3' з: 5'-agaccacaatccattcccgt-3'	п: 2167-2186 з: 2397-2378	NM_002453
<i>FAM162A</i>	п: 5'-tcctcatatggtcaggtcgc-3' з: 5'-gctgcttctcttcagacg-3'	п: 299-318 з: 533-514	NM_014367
<i>ENDOG</i>	п: 5'-gttctacctgagcaacgtcg-3' з: 5'-tgccgatgacctgtacttt-3'	п: 659-678 з: 843-724	NM_004435
<i>NR3C1</i>	п: 5'-ttcctcctgctccttctg-3' з: 5'-tcacatcctcctcctga-3')	п: 382-401 з: 571-552	NM_000176
<i>NNT</i>	п: 5'-gtctcctgaaatcgtcccct-3' з: 5'-cagcacagtgataacgacgg-3'	п: 2549-2568 з: 2769-2750	NM_012343
<i>AIFM1</i>	п: 5'-cccaatggtgagttggcaa-3' з: 5'-agcgtgatcatggtgctcta-3'	п: 1435-1454 з: 1605-1586	NM_004208
<i>ATG7</i>	п: 5'-tgagcctccaacctcttg-3' з: 5'-agatctcagcagcttggtt-3'	п: 1956-1975 з: 2200-2181	NM_006395
<i>TRADD</i>	п: 5'-tgcagatgctgatccaacta-3' з: 5'-gctcagccagttctcatcc-3'	п: 256-275 з: 543-524	NM_003789
<i>LONP1</i>	п: 5'-atctacctgagcgacatggg-3' з: 5'-ttacgggtgggtctgcttgat-3'	п: 1111-1130 з: 1304-1285	NM_004793

Для ампліфікації кДНК використовували 1 мкл її розчину, в який додавали реакційну суміш Absolute QPCR SYBR-Green Mix (*Thermo Scientific*, Великобританія) та суміш олігонуклеотидних праймерів (*Sigma-Aldrich*, США), специфічних для кожного гена. Послідовності праймерів, використаних для проведення кількісної ПЛР кДНК, та відповідні їм послідовності генів *Homo sapiens* наведено в табл. 2.1.

Ампліфікацію усіх досліджених генів проводили протягом 40 циклів за таких параметрів полімеразної ланцюгової реакції: 95°C, 30 сек. – денатурація дволанцюгової ДНК; 55°C, 30 сек. – «відпал» олігонуклеотидних праймерів; 72°C, 30 сек. – синтез ДНК. Усі досліди проводили у трьох повторях.

Відносний рівень експресії досліджених генів нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину (АСТВ) і виражали у % від контролю, прийнятого за 100 %.

2.2.4. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі. Продукти ампліфікації кількісної полімеразної ланцюгової реакції (RT-qPCR) досліджували методом електрофорезу в 2%-му агарозному гелі, використовуючи TRIS-ацетатний буфер з ЕДТА (ТАЕ буфер). Електрофорез проводили за напруги 10 В/см протягом 1 год. Для визначення молекулярної маси зразків використовували маркери GeneRuler 100-bp DNA ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США). Візуалізацію проводили в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм, забарвлюючи ДНК SYBR* Safe DNA Gel Stain (*Life Technologies*, США).

2.2.5. Отримання протеїнових екстрактів та вестерн-блот аналіз протеїнів. Для отримання екстрактів протеїнів із клітин гліоми була використана методика, описана раніше [245]. З культуральних чашок з діаметром 10 см, видаляли поживне середовище та промивали фізіологічним розчином із фосфатно-сольовим буфером (*Thermo Fisher Scientific*, США). Клітини знімали з чашок, переносили у центрифужні пробірки та

центрифугували для осадження при 3000 g протягом 30 с. Для лізису гомогенат клітин обережно ресуспендували у 100 мкл холодного буферу А (10 ммоль/л HEPES-КОН, 1,5 ммоль/л MgCl₂, 10 ммоль/л KCl, 0,5 ммоль/л дитіотриітолу, 0,5 ммоль/л фенілметилсульфоніл флуориду, 1 ммоль/л бензамідину, 1 мг/л леупептину, 1 мг/л пепстатину А та 0,5% NP-40, рН 7,9 при 4°C), інкубували на льоду протягом 10 хв. та центрифугували при 3000 g протягом 1 хв. Отриманий після центрифугування супернатант, який містив цитозольну фракцію протеїнів, переносили в інші мікропробірки та зберігали при -30°C.

Спектрометричне визначення концентрації протеїнів в екстрактах проводили за допомогою методу М. Бредфорд, використовуючи реагент Coomassie Protein assay Reagent (*Sigma-Aldrich*, США) згідно інструкції виробника за довжини хвилі 595 нм.

Для розділення протеїнів здійснювали електрофорез у 10% поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію в камері для вертикального електрофорезу (сила струму дорівнювала 40мА). Після проведення електрофорезу протеїни переносили з гелю на PVDF мембрану (*Immobilon-P Transfer Membrane; Millipore*, США) методом напівсухого переносу. Для насичення залишкових сайтів зв'язування інкубували PVDF мембрани у фосфатно-сольовому буфері PBST, що містив 5% сухого молока та 0,1% Tween 20, протягом 1 год. за кімнатної температури. Для візуалізації протеїнів використовували набір «Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit» (*Invitrogen*, США). Детекція сигналу здійснювалась у авторадіографічній касеті FisherBiotech (*Fisher Scientific*, США) на Hyperfilm ECL (high performance chemiluminescence film), Amersham Biosciences (Англія).

Для аналізу рівня протеїнів у клітинах гліоми методом вестерн-блоту були використані наступні антитіла: поліклональні антитіла кролика анти-АСТВ (*Santa Cruz Biotechnology*, США) (1 : 2000) та анти-ATG7 (*Abcam*, Великобританія), а також анти-HIF-1 α (1 : 500) та анти-ENDOG (*Novus Biologicals*, США).

В якості контролю кількості протеїнів у цитозольній фракції використовували β -актин. Вестерн-блот для кожного протеїну здійснювали у трьох повторах, щоразу використовуючи екстракти, що були виділені незалежно із культур клітин, вирощених на різних чашках.

2.3. Статистична обробка результатів. Обробку результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі виконували з допомогою програмного пакету “Differential expression calculator”, а статистичний аналіз – в програмі Excel. Результати представляли у вигляді $M \pm m$, де M - середнє значення, m – стандартна похибка середнього. Показник статистичної достовірності відмінностей p обчислювали за критерієм Стьюдента, використовуючи двовибірковий t -тест для середнього [246]. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$. Усі досліди були проведені у трикратному повторі.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Експресія ядерних генів ензимів трикарбонового циклу мітохондрій у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1

Рядом досліджень було показано, що пригнічення функції IRE1 призводило до суттєвого зниження росту гліом через інгібування ангиогенезу шляхом блокування експресії про-ангіогенних факторів та посилення експресії анти-ангіогенних факторів [15, 16, 230]. Для поглиблення розуміння комплексних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми, опосередкованих сенсорно-сигнальним ензимом IRE1, ми дослідили у клітинах гліоми лінії U87 експресію ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*, що кодують ключові ензими циклу трикарбонових кислот, за умов повного (як кінази, так і ендорибонуклеази) та часткового (лише ендорибонуклеази) пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1. Дані ензими циклу трикарбонових кислот відіграють важливу роль у біоенергетиці та метаболізмі клітин, причому деякі із них є мультифункціональними та беруть участь у метаболічному репрограмуванні мітохондрій за пухлинного росту [91-93].

Доцільно відмітити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1 не є ізольованим у клітині, він тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6). Тому, для з'ясування можливості залучення інших сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула у регуляцію експресії ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій, були проведені дослідження з індукцією стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ензиму IRE1.

Нами було досліджено експресію мітохондріального ензиму ME2, що каталізує окисне декарбоксилювання малату до пірувату, і встановлено, що

рівень експресії мРНК *ME2* знижувався на 60 % у клітинах гліоми з повним пригніченням функції IRE1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми, тоді як виключення лише ендорибонуклеазної активності IRE1 істотно не впливало на експресію гена *ME2*. Разом з тим, індукція стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином в dnIRE1-клітинах викликала суттєве зростання експресії мРНК *ME2* (+29 %, dnIRE1+t у порівнянні з dnIRE1 на рис. 3.1). Отже, стрес-залежна регуляція експресії гена *ME2* опосередковується, головним чином, протеїнкіназною активністю IRE1 та, можливо, функціонуванням інших сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула.

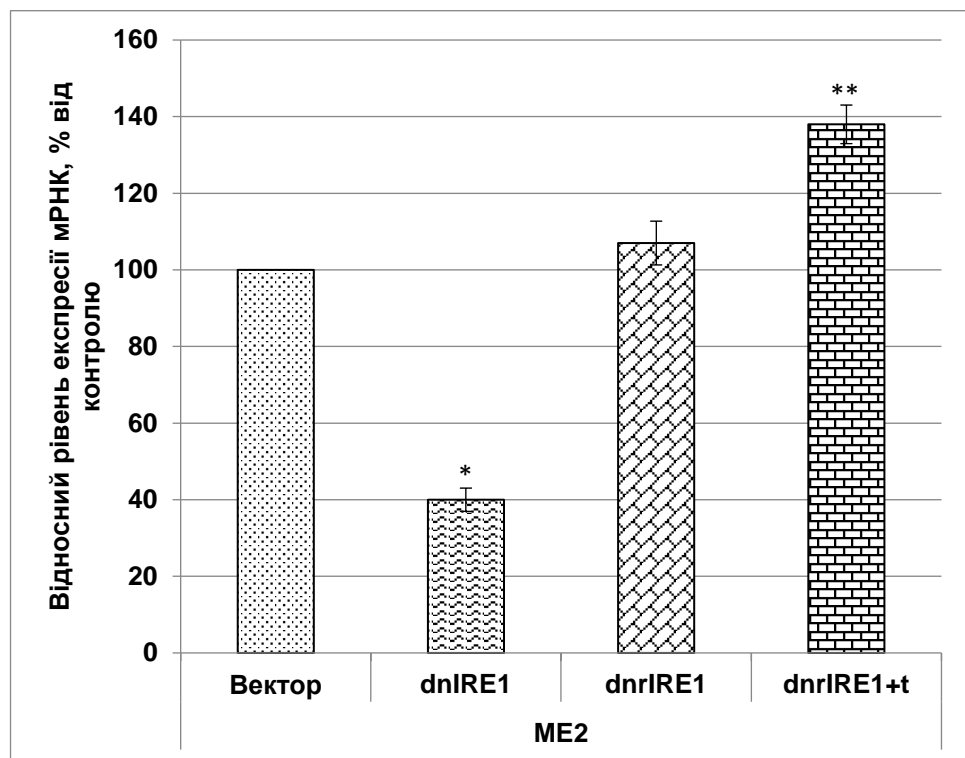


Рис. 3.1. Відносний рівень експресії мРНК *ME2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnIRE1+t). Значення експресії *ME2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n = 3$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з dnIRE1.

Із даних, представлених на Рис. 3.2, видно, що експресія мРНК *MDH2* також знижувалась (в 2 рази) у клітинах гліоми за умов повного інгібування функціональної активності IRE1 та істотно не змінювалась за умов пригнічення ендорибонуклеазної активності IRE1. В той же час, індукція стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином посилювала експресію мРНК *MDH2* на 26 % (dnrIRE1+t порінювали з dnrIRE1). Таким чином, значне пригнічення (-48 %) рівня експресії гена *MDH2* у dnIRE1-дефіцитних клітинах опосередковане саме протеїнкіназою IRE1 та в деякій мірі іншими шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума.

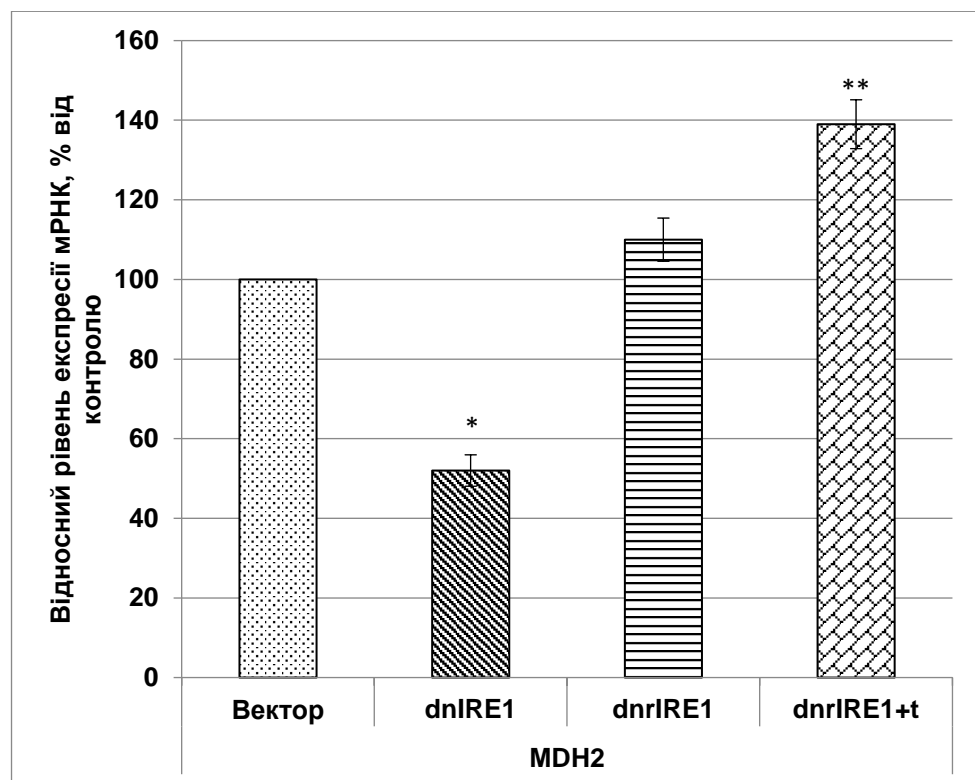


Рис. 3.2. Відносний рівень експресії мРНК *MDH2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *MDH2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n = 3$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з dnrIRE1.

У випадку гена *GOT2* (glutamic-oxaloacetic transaminase 2), спостерігали суттєве зниження (-38 %) рівня експресії у клітинах, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією dnIRE1 і, навпаки, у клітинах з частковим пригніченням функції IRE1 – зростання рівня мРНК *GOT2* (+72 %) (Рис. 3.3). В умовах стресу ER, індукованого тунікамідом, рівень експресії мРНК *GOT2* знижується на 18 % (dnrIRE1+t у порівнянні з dnrIRE1). Таким чином, механізми IRE1-залежної регуляції експресії гена *GOT2* є більш складними та опосередковуються як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активностями ензиму IRE1, а також, певною мірою, іншими шляхами стресу ендоплазматичного ретикулула.

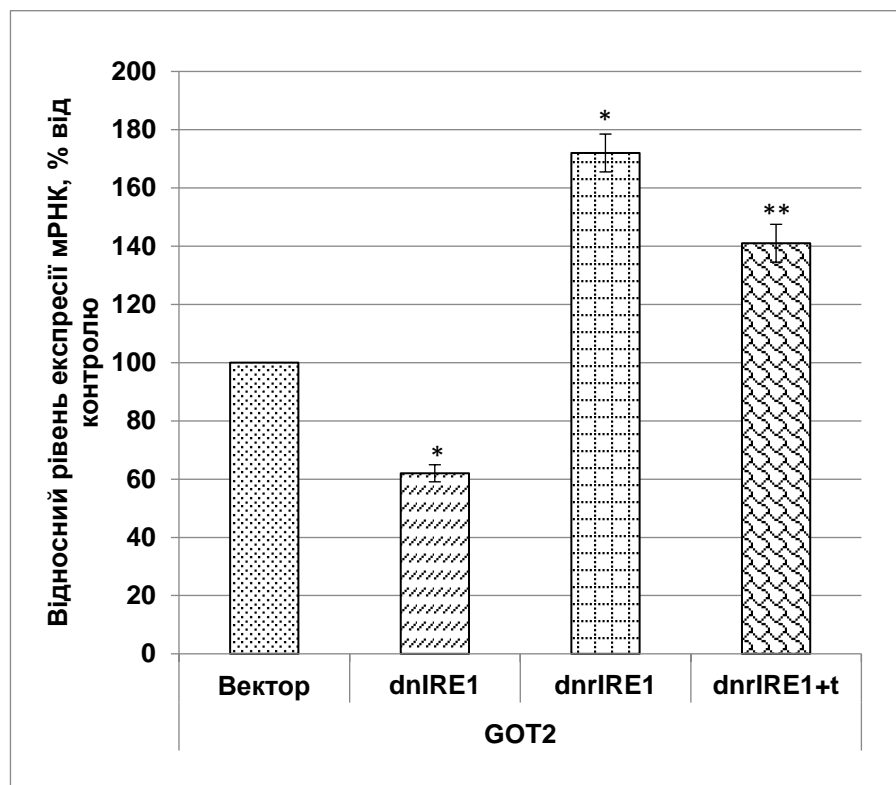


Рис. 3.3. Відносний рівень експресії мРНК *GOT2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікамідом (dnrIRE1+t). Значення експресії *GOT2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 3, * – P < 0,05 у порівнянні з контролем; ** – P < 0,05 у порівнянні з dnrIRE1.

На Рис. 3.4 показано, що рівень експресії гена мітохондріальної ізоцитрадегідрогенази *IDH2* зростав втричі у клітинах з повною блокадою IRE1 і, разом з тим, істотно не змінювався за умови інгібування лише ендорибонуклеазної активності IRE1. Такі результати свідчать про те, що стрес-залежна регуляція експресії даного гена опосередкована не ендорибонуклеазою, а протеїнкіназою IRE1. Крім того, суттєве зниження (-37%) експресії мРНК *IDH2* у *dnrIRE1*-клітинах за індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином вказує на можливу участь інших систем стресу ендоплазматичного ретикулула у контролі експресії гена *IDH2*.

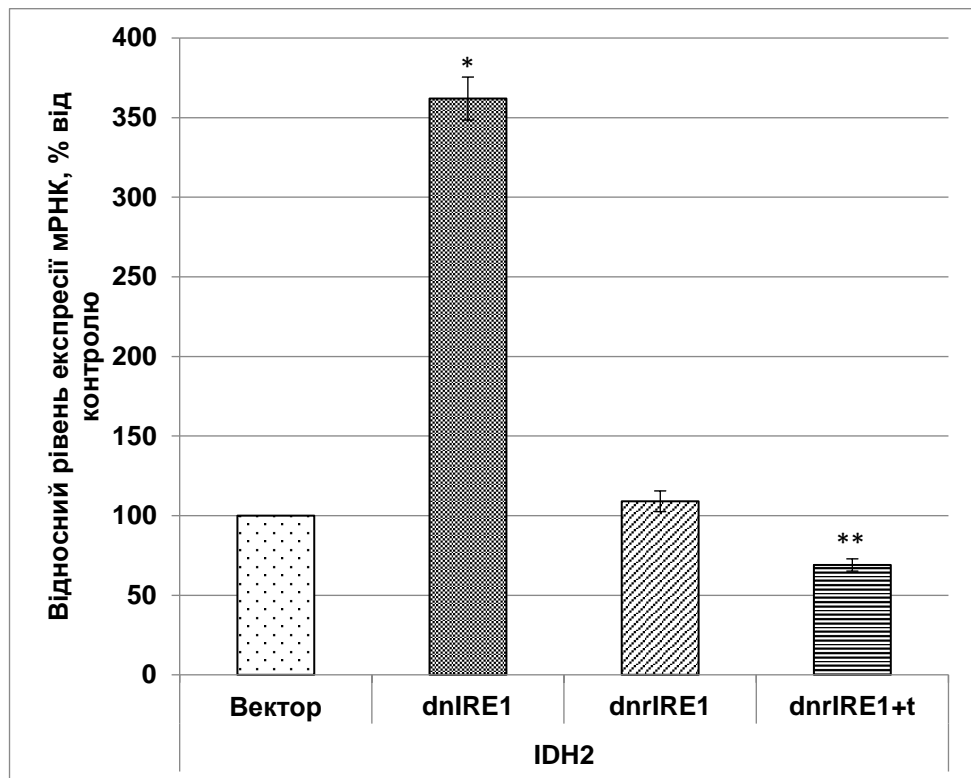


Рис. 3.4. Відносний рівень експресії мРНК *IDH2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (*dnIRE1*) та частковим (*dnrIRE1*) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (*dnrIRE1+t*). Значення експресії *IDH2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100%; $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем, ** - $P < 0,05$ у порівнянні з *dnrIRE1*.

Було встановлено, що повна блокада активності IRE1 призводила до зниження рівня експресії мРНК *SDHB*, що кодує субодиницю В сукцинатдегідрогеназного комплексу, а за умови пригнічення лише ендорибонуклеази – істотних змін в експресії цього гена не спостерігалось. Дія тунікаміцину на клітини з виключеною ендорибонуклеазною активністю IRE1 також не впливала на експресію мРНК *SDHB* (Рис. 3.5). Отримані результати дозволяють стверджувати, що стрес-залежна регуляція експресії гена *SDHB* опосередковується саме протеїнкіназною активністю сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

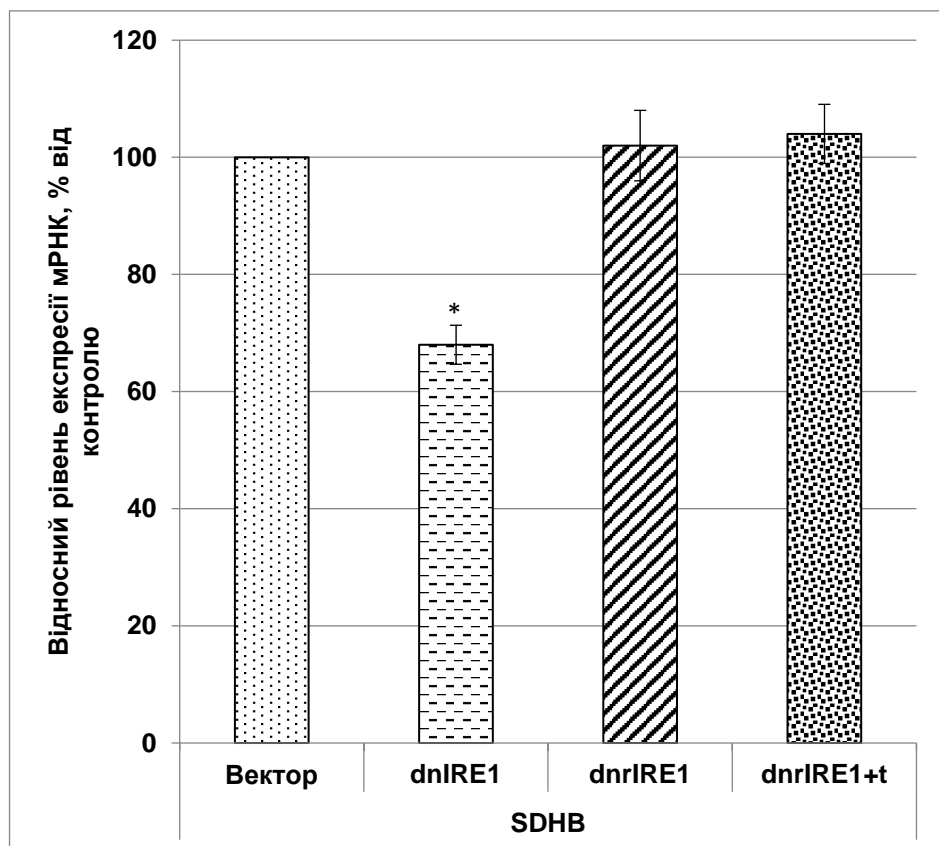


Рис. 3.5. Відносний рівень експресії мРНК *SDHB* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *SDHB* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). n = 3, * - P < 0,05 у порівнянні з контролем.

З даних, представлених на Рис. 3.6 видно, що експресія мРНК субодиниці D сукцинатдегідрогеназного комплексу знижувалась у клітинах гліоми лінії U87 як за повного, так і за часткового інгібування функції IRE1 (-32 % і -24% відповідно), що вказує на важливу роль ендорибонуклеази IRE1 у регуляції функції гена *SDHD*. Індукція стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазою також знижувала експресію даного гена, хоч і меншою мірою (-17 %). Таким чином, інші системи стресу ендоплазматичного ретикулула теж можуть бути задіяними у регуляцію експресії гена *SDHD*.

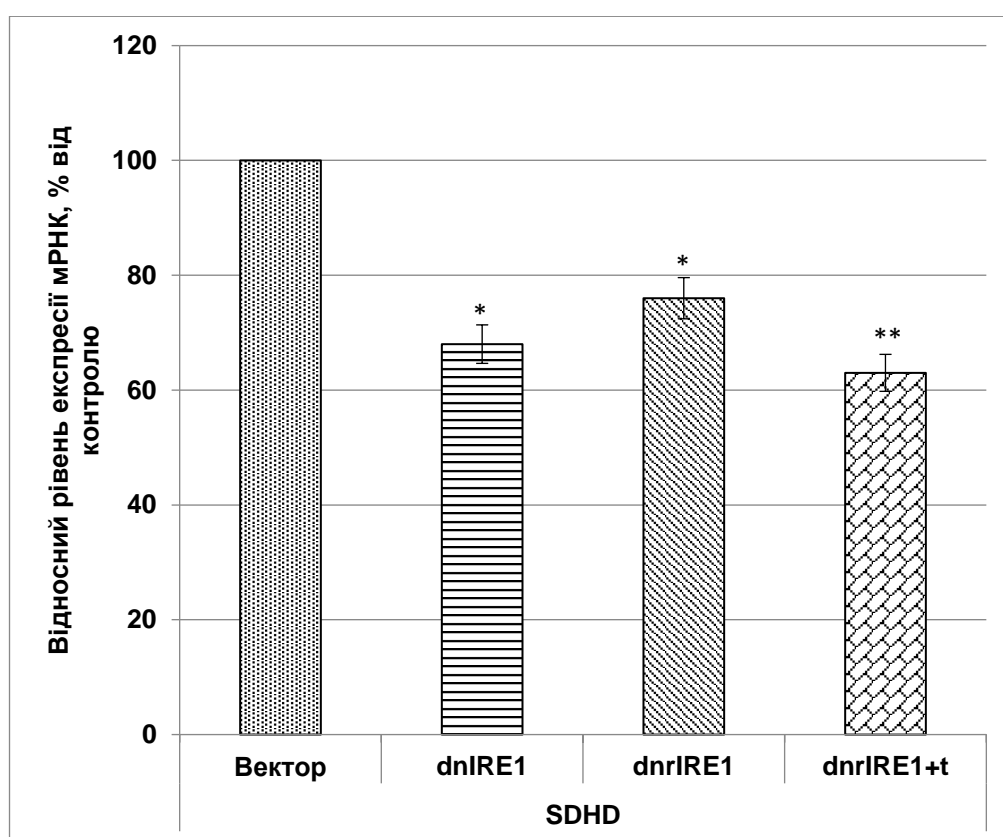


Рис. 3.6. Відносний рівень експресії мРНК *SDHD* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *SDHD* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 3, * - P < 0,05 у порівнянні з контролем, ** - P < 0,05 у порівнянні з dnIRE1.

Отже, експресія усіх ядерних генів, що кодують ключові ензими циклу трикарбонних кислот, є залежною від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1, причому ця залежність має гено-специфічний характер. Важливо зазначити, що IRE1-залежна регуляція експресії генів може реалізуватись різними молекулярними шляхами: через активацію транскрипційного фактора XBP1 ендорибонуклеазною активністю IRE1 або через консервативний механізм вибіркової деградації численних мРНК або мікроРНК. Для більш детального з'ясування механізмів, що лежать в основі спостережених змін в експресії ядерних генів, що кодують мітохондріальні ензими циклу трикарбонних кислот, ми здійснили пошук специфічних сайтів зв'язування з транскрипційним фактором XBP1 (XBP1-responsive element - CCACG/CGTGG) у промоторних ділянках досліджених генів методом біоінформаційного аналізу [247]. Результати проведеного аналізу промоторних ділянок генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* представлені в Таблиці 3.1.

Специфічні до транскрипційного фактора XBP1 послідовності CCACG/CGTGG, що можуть його зв'язувати, було виявлено у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2* та *SDHD*. Зокрема, для генів *ME2* та *MDH2* було ідентифіковано по три залежні від XBP1 елементи, два з яких були розташовані у напрямку 5' - 3' (CCACG), а третій – в зворотному (CGTGG). В той же час, у промоторних ділянках генів *IDH2* та *SDHD* було виявлено по одній XBP1-залежній послідовності: у напрямку від 3' до 5' - у випадку гена *IDH2*, та від 5' до 3' - для гена *SDHD*. Аналіз промоторної ділянки гена *GOT2* виявив чотири сайти зв'язування з XBP1, два з яких були розташовані у напрямку 5' - 3' і ще два – у зворотному (Табл. 3.1).

Таким чином, результати біоінформаційного аналізу свідчать про можливість участі транскрипційного фактора XBP1 у стрес-залежній регуляції експресії генів ензимів трикарбонного циклу у клітинах гліоми лінії U87.

Таблиця 3.1

Послідовності ССАСG/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1, у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сторінка послідовності промотору та GenBank номер
<i>ME2</i>	-217 до -212 -54 до -49 -48 до -43	tCCACGag acCGTGGg gCCACGcc	1, NM_002396
<i>MDH2</i>	-1215 до -1210 -945 до -940 -573 до -568	aCCACGct aaCGTGGt aCCACGga	2, NM_005918
<i>GOT2</i>	-175 до -170 -145 до -140 -111 до -106 -93 до -88	caGCTGGa ggGCTGGg tCCACGac cCCACGcc	3, NM_002080
<i>IDH2</i>	-729 до -724	ttCGTGGt	4, NM_002168
<i>SDHB</i>		Не виявлено	5, NM_003000
<i>SDHD</i>	-434 до -429	tCCACGct	6, NM_003002

1 – https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_709130/

2 – http://bit.ly/genecopoeia_mdh2_promoter

3 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_703343/

4 - http://bit.ly/genecopoeia_idh2_promoter

5 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_706840/

6 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_712472/

Проведено також біоінформаційний аналіз 3'-послідовності мРНК *ME2* на наявність сайтів зв'язування мікроРНК і виявлено сайт для мікроРНК miR-182-5p (Рис. 3.7). Встановлено, що рівень цієї мікроРНК у клітинах з

пригніченим IRE1 істотно збільшується (+38 %) у порівнянні з контрольними клітинами гліоми, а це свідчить про можливість і пост-транскрипційної регуляції експресії гена *ME2*, оскільки зменшення рівня експресії мРНК цього гена супроводжується збільшенням рівня мікроРНК miR-182-5p (Рис. 3.8).

Position 303-309 of ME2 3' UTR	5' ...UACUCUAAUUCAGAC-UUGCCAAA...
hsa-miR-182	<div style="text-align: center;"> III IIIIIII </div> 3' UCACACUCAAGAUGGUAACGGUUU

Рис. 3.7 Сайт зв'язування мікроРНК miR-182-5p в 3'-последовності мРНК *ME2*.

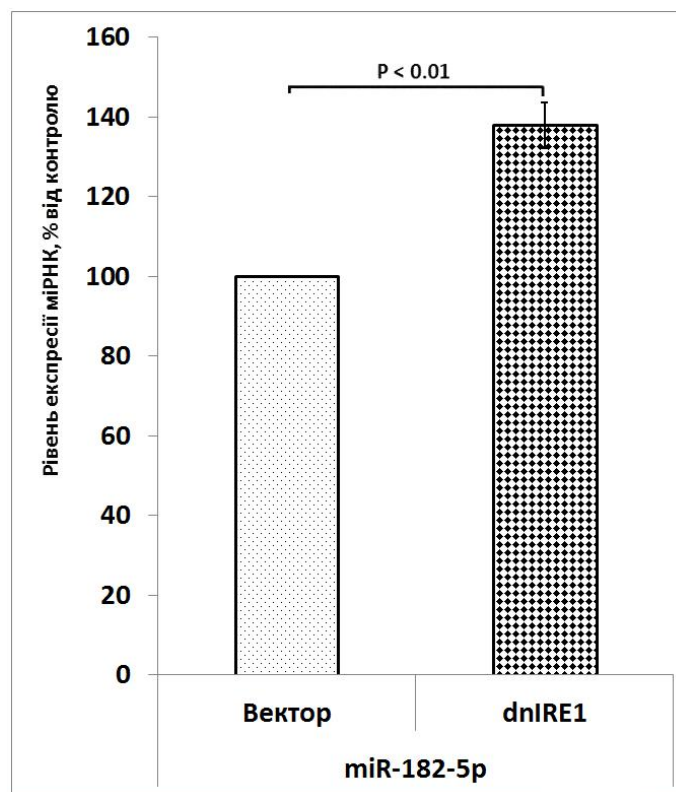


Рис. 3.8. Рівень експресії мікроРНК miR-182-5p у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (контроль), та у сублінії цих клітин з пригніченою за допомогою домінант-негативної конструкції IRE1 обох ензиматичних активностей IRE1 (dnIRE1 U87). Інтенсивність експресії miR-182 нормалізували по рівню експресії мРНК GAPDH та RNU6 РНК і виражали в % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %; n = 3.

3.2. Вплив гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну на експресію ядерних генів мітохондріальних ензимів трикарбонового циклу у клітинах гліоми з пригніченою функцією IRE1

Процеси пухлинного росту тісно пов'язані з індукцією шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксією, яка регулює метаболічні процеси та проліферацію клітин, а також експресію багатьох генів, в тому числі і ядерних генів, що кодують мітохондріальні фактори та ензими. Глибше розуміння механізмів пухлинної відповіді на гіпоксію необхідне для створення терапевтичних стратегій і підходів, заснованих на сенсibiliзації пухлинних клітин шляхом виключення механізмів виживання.

Результати досліджень впливу гіпоксії на експресію групи ядерних генів мітохондріальних ензимів циклу трикарбонових кислот представлені на Рис. 3.9 – 3.14.

Було показано, що гіпоксія у середовищі знижувала рівень експресії мРНК малік-ензиму мітохондрій ME2 на 40 % у контрольних клітинах гліоми, тоді як виключення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1 послаблювало ефект гіпоксії на експресію даного гена (-22 % у dnIRE1-клітинах) (Рис. 3.9).

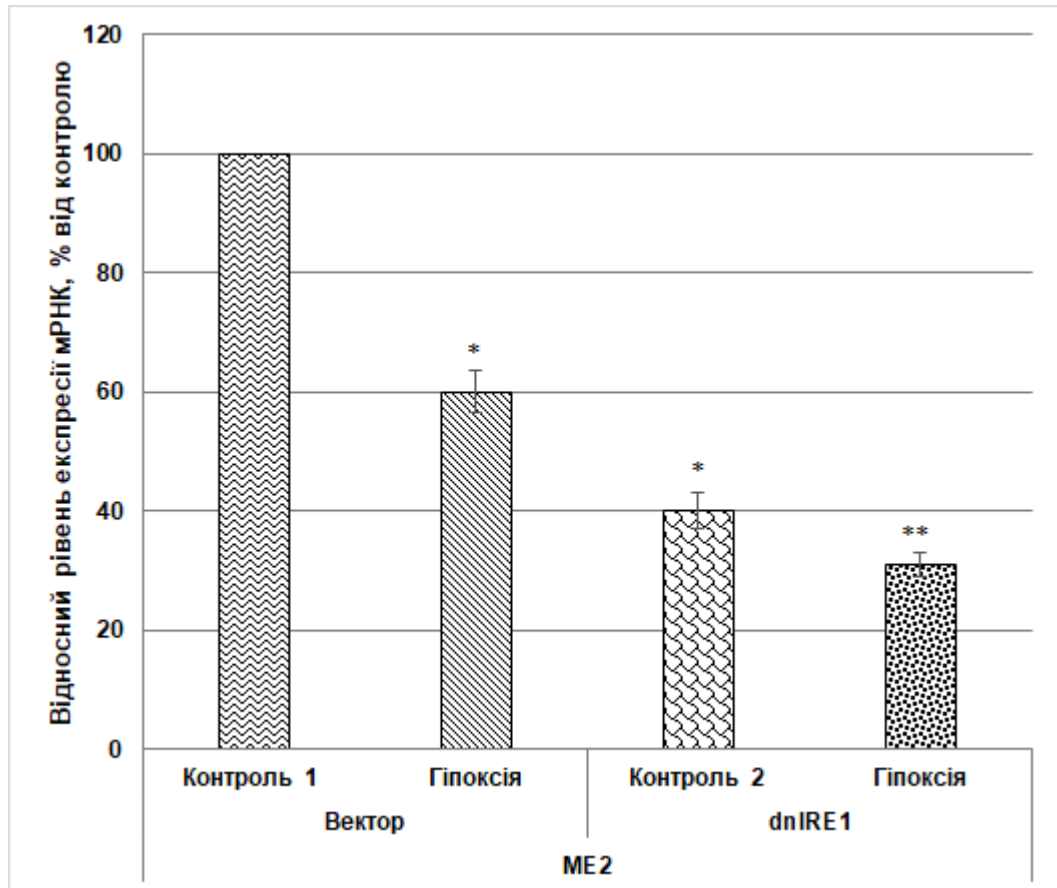


Рис. 3.9. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *ME2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *ME2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Як показано на Рис. 3.10, експресія мРНК *MDH2*, що кодує мітохондріальну малатдегідрогеназу, також знижується у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії (-17 % у порівнянні з Контролем 1), тоді як у клітинах з виключеною функцією IRE1 не спостерігали суттєвих змін в експресії даного гена. Отже, пригнічення IRE1 усуває вплив гіпоксії на експресію мРНК *MDH2*.

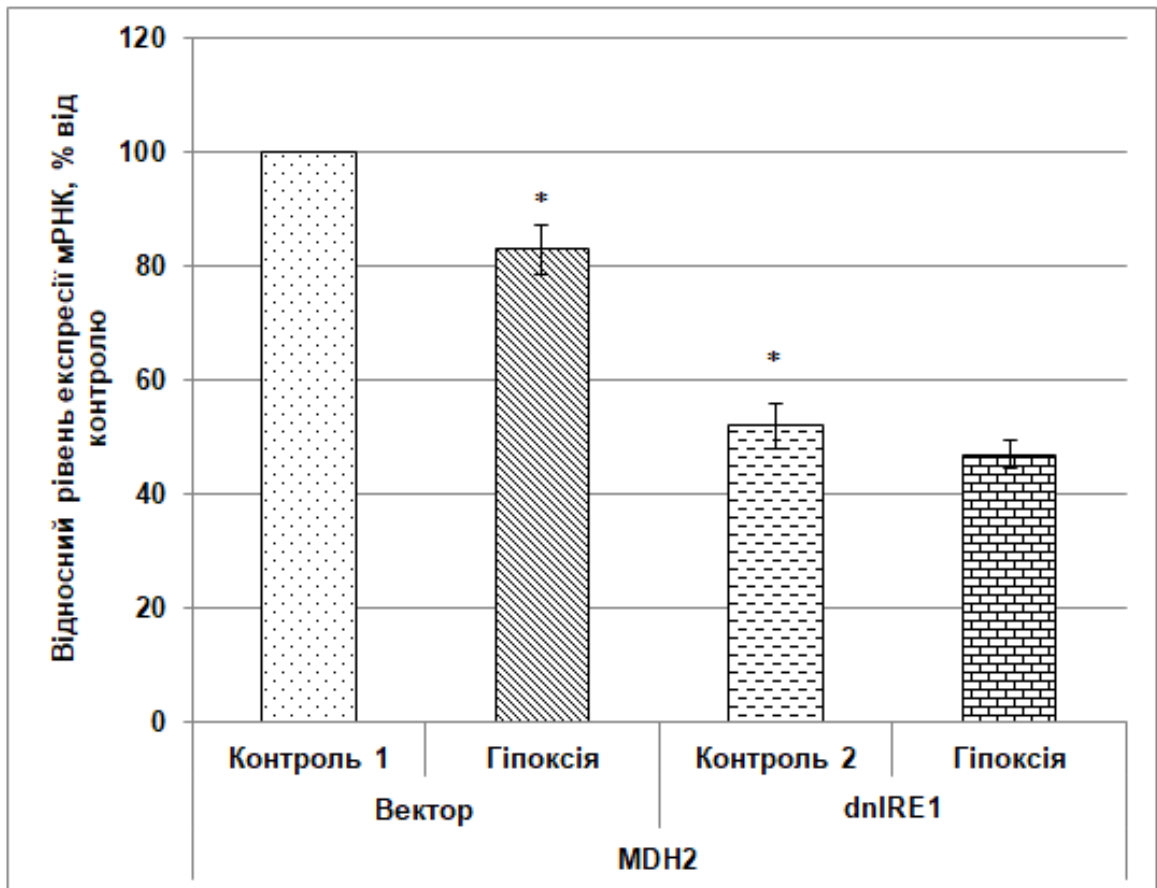


Рис. 3.10. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *MDH2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *MDH2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор).

За умов гіпоксії спостерігали пригнічення (-46 %) рівня експресії мРНК *GOT2* у клітинах гліоми, що експресували функціонально активний ензим IRE1. В клітинах, стабільно трансфікованих домінант-негативною конструкцією dnIRE1, експресія мРНК *GOT2* також знижувалась за гіпоксії, проте меншою мірою (-35 %), тому можна зробити висновок про те, що блокада обох ензиматичних активностей IRE1 у деякій мірі послаблює гіпоксичну регуляцію експресії гена *GOT2* (Рис. 3.11).

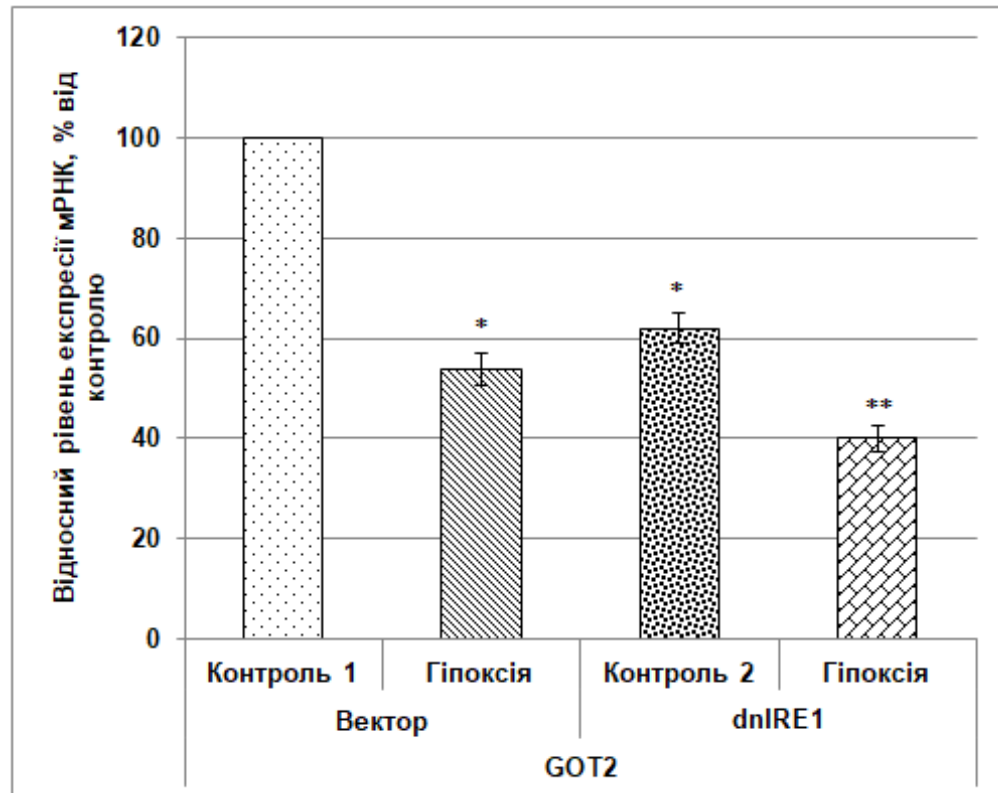


Рис. 3.11. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *GOT2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *GOT2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Дослідження експресії гена *IDH2*, який кодує мітохондріальну ізоцитрадегідрогеназу, показало, що дефіцит кисню не впливає на рівень експресії мРНК *IDH2* у контрольних клітинах гліоми. В той же час, інгібування функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1 призводило до значного зниження (-50 % у порівнянні з Контролем 2) рівня експресії мРНК *IDH2* за умов гіпоксії. Таким чином, виключення функціональної активності IRE1 індукує чутливість експресії даного гена до гіпоксії у клітинах гліоми лінії U87 (Рис. 3.12).

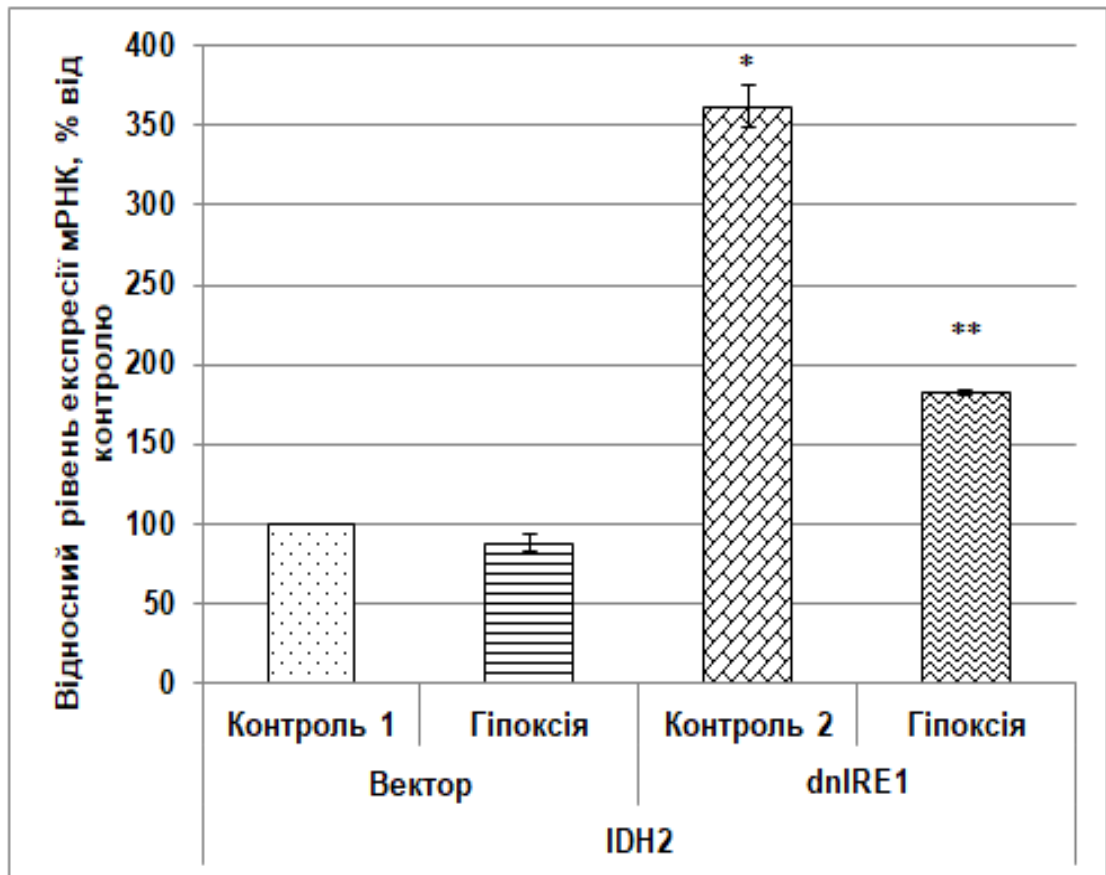


Рис. 3.12. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *IDH2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *IDH2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Встановлено, що експресія мРНК субодиниці В сукцинатдегідрогеназного комплексу (*SDHB*) знижувалась за умов гіпоксії у контрольних клітинах гліоми (-37 %) та клітинах з пригніченою активністю IRE1, проте ефект гіпоксії на експресію гена *SDHB* в цих клітинах був значно меншим (-16 %). Це свідчить про те, що IRE1 модифікує гіпоксичну регуляцію експресії гена *SDHB*, зменшуючи відповідь на гіпоксію більше ніж вдвічі (Рис. 3.13).

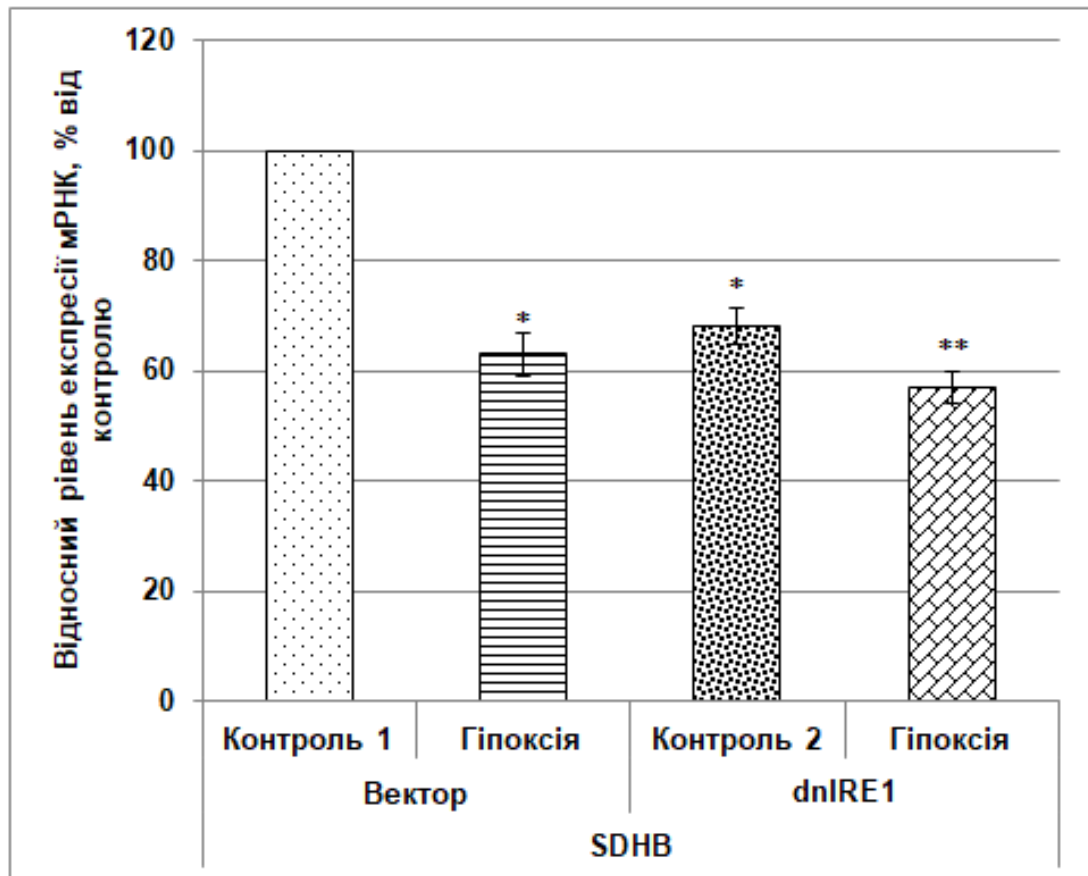


Рис. 3.13. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *SDHB* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *SDHB* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

На Рис. 3.14 показано, що гіпоксія індукує незначне, проте статистичне достовірне, зниження рівня експресії мРНК субодиниці D сукцинатдегідрогеназного комплексу (-14 %) у контрольних клітинах гліоми в порівнянні з нормоксією. В той же час, пригнічення функції IRE1 вимикає чутливість експресії мРНК *SDHD* до умов гіпоксії.

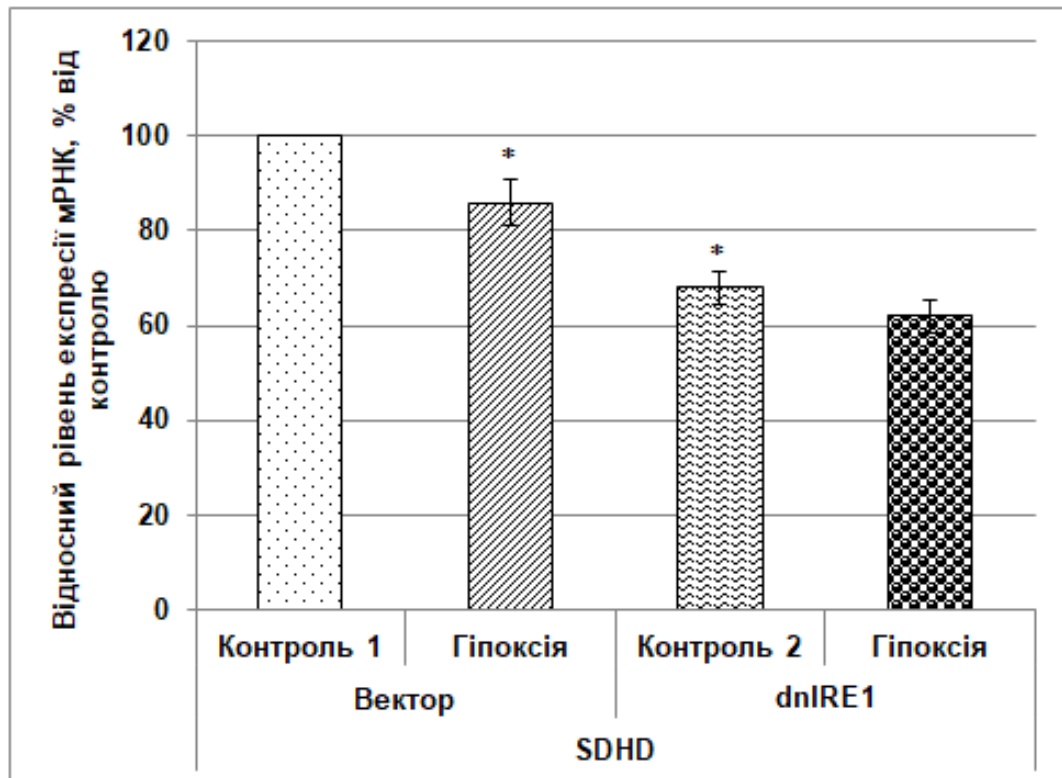


Рис. 3.14. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *SDHD* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *SDHD* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор).

Отже, результати кількісної полімеразної ланцюгової реакції показали, що експресія більшості досліджених генів мітохондріальних ензимів трикарбонного циклу є залежною від умов гіпоксії, а пригнічення функціональної активності IRE1 модифікує ефект гіпоксії на експресію даних генів.

Транскрипційний фактор HIF є ключовим регулятором клітинної відповіді на гіпоксію, контролюючи експресію великої групи генів, що містять консенсусні послідовності, чутливі до гіпоксії (hypoxia-response elements, HREs). У зв'язку з цим, нами було проведено пошук специфічних елементів A(G)CGTGG(C)/(G)CCACGC(T) у промоторних ділянках досліджених генів

ензимів циклу Кребса, що розпізнаються транскрипційним фактором HIF, методом біоінформаційного аналізу [248].

Специфічні до транскрипційного фактора HIF послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що можуть його зв'язувати, було виявлено у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *SDHB* та *SDHD* (Табл. 3.2). Цікаво, що дані елементи були розташовані як у напрямку від 5' до 3' (A(G)CGTGG(C)), так і в зворотному - C(G)CACGC(T). Так, у промоторній ділянці гена *ME2* був виявлений залежний від HIF елемент, розташований у напрямку 5' - 3' (від -48 до -42), а у випадку гена *SDHB* такий регуляторний елемент знаходився у зворотному напрямку (від -37 до -31). Для гена *MDH2* було виявлено два елементи, специфічні до HIF: прямий - ACGTGG та зворотний – CCACGC. В той же час, було ідентифіковано чотири залежні від транскрипційного фактора HIF елементи у промоторній послідовності гена *GOT2*, два із яких розташовані у напрямку від 5' до 3', а два інших – в зворотному. Аналогічні результати були отримані при аналізі промоторної послідовності гена *SDHD* (Табл. 3.2).

Більше того, вперше було виявлено, що послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), які зв'язують транскрипційний фактор HIF, ідентифіковані у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2* та *SDHD*, водночас містили у своїй структурі сайти зв'язування ХВР1 (CGTGG/CCACG). Спостережений феномен ілюструє механізм кооперативної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують ключові ензими трикарбонового циклу, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами. Більше того, це явище пояснює залежність гіпоксичної регуляції від функціонування сигнального ензиму IRE1, ендорибонуклеаза активність якого відповідає за альтернативний сплайсинг мРНК ХВР1, що призводить до зсуву рамки зчитування та продукції стабільного і функціонально активного транскрипційного фактора ХВР1. Таким чином, більш виражені зміни в експресії генів *MDH2*, *GOT2* та *SDHD*, які спостерігали у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії, можна пояснити

спільною дією транскрипційних факторів HIF та XBP1, а послаблення або виключення ефекту гіпоксії у клітинах гліоми із блокадою IRE1 – відсутністю транскрипційно активної форми XBP1.

Таблиця 3.2

Послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що зв'язують транскрипційний фактор HIF (hypoxia responsive element), у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*.

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>ME2</i>	-48 до -42	gCCACGCc	1, NM_002396
<i>MDH2</i>	-1215 до -1209 -945 до -939	aCCACGCt aACGTGGt	2, NM_005918
<i>GOT2</i>	-538 до -532 -93 до -87 -54 до -48 -38 до -32	gGCGTGGt cCCACGCc gACGTGGc aGCACGCg	3, NM_002080
<i>IDH2</i>		Не виявлено	4, NM_002168
<i>SDHB</i>	-37 до -31	cGCACGCt	5, NM_003000
<i>SDHD</i>	-571 до -565 -569 до -564 -434 до -428 -296 до -290	gGCACGTg cACGTGGc tCCACGCt aGCGTGCc	6, NM_003002

1 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_709130/

2 - http://bit.ly/genecopoeia_mdh2_promoter

3 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_703343/

4 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_709040/

5 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_706840/

6 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_712472/

Однією із загальноприйнятих метаболічних змін, яка слугує маркером злоякісного росту, є посилений глутаміноліз. Глутамін – це протеїногенна амінокислота, що забезпечує поповнення пулу інтермедіатів для циклу трикарбонових кислот та бере участь у біосинтезі протеїнів, ліпідів і нуклеотидів і, таким чином, є необхідною для проліферації і виживання ракових клітин. Поряд із активним катаболізмом глутаміну, характерною рисою пухлинних клітин є підвищене споживання глюкози – основного джерела енергії і вуглецю для синтезу багатьох органічних речовин, що дозволяє забезпечити високу швидкість проліферації ракових клітин та їх агресивну поведінку. У зв'язку з цим, ми дослідили вплив дефіциту глюкози і глутаміну на експресію ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*, що кодують ензими циклу Кребса у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

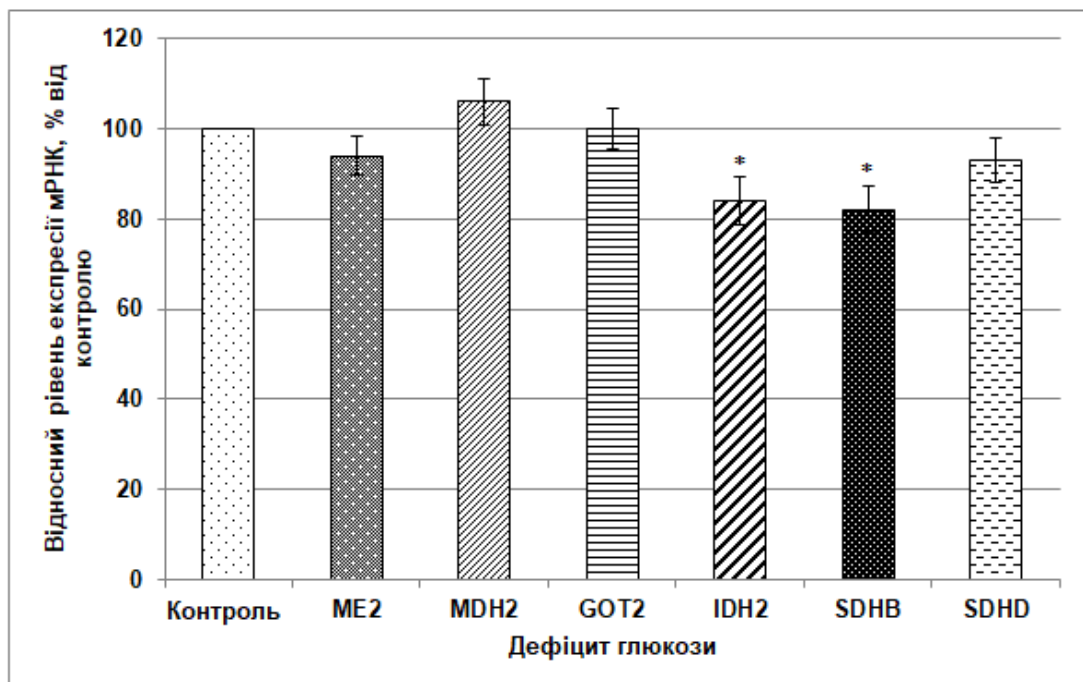


Рис. 3.15. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pсDNA3.1 (Контроль). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. n = 3. * - p<0,05 у порівнянні з контролем.

Було показано, що відсутність глюкози у середовищі призводила до незначного, проте статистично достовірного, пригнічення рівня експресії мРНК *IDH2* (-16 %) та *SDHB* (-18 %) у контрольних клітинах гліоми, тоді як експресія більшості досліджених генів була резистентною до умов дефіциту глюкози (Рис. 3.15).

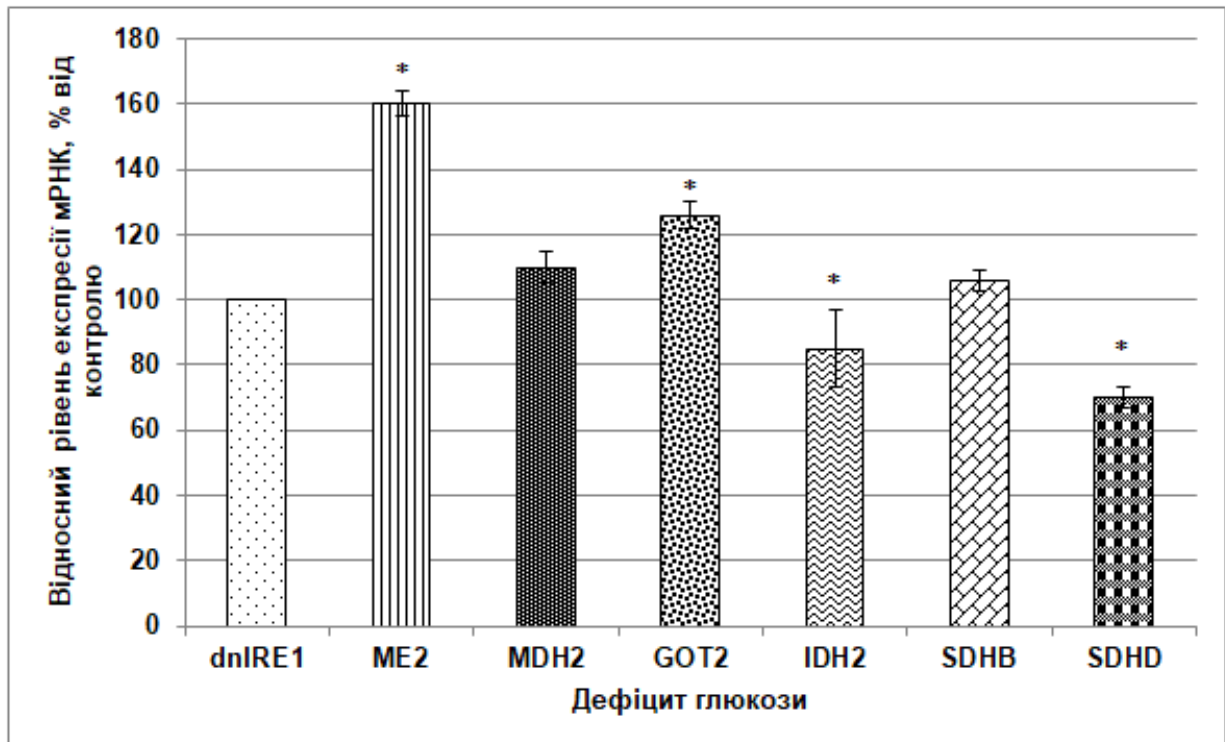


Рис. 3.16. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. n = 3. * - p < 0,05 у порівнянні з контролем (dnIRE1).

Виключення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1 модифікувало ефект дефіциту глюкози на експресію більшості досліджених генів. Зокрема, блокада функції IRE1 індукувала чутливість експресії генів *ME2*,

GOT2 і *SDHD* до умов відсутності глюкози у середовищі, посилюючи рівень експресії мРНК *ME2* (+60 %) та *GOT2* (+26) та, навпаки, пригнічуючи рівень експресії мРНК *SDHD* на 30 % у порівнянні з dnIRE1-клітинами гліоми за стандартних умов культивування. Разом з тим, виключення активності IRE1 знімало ефект дефіциту глюкози на експресію гена *SDHB* і не змінювало ефект дефіциту глюкози на експресію гена *IDH2*, що знижувалась однаковою мірою в обох типах клітин гліоми. В той же час, експресія гена *MDH2* була нечутливою до умов дефіциту глюкози як в контрольних, так і в dnIRE1-клітинах гліоми (Рис. 3.16).

Результати досліджень ефекту дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК ядерних генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*, що кодують ключові мітохондріальні ензими циклу Кребса, у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1 представлені на Рис. 3.17-3.18.

Встановлено, що відсутність глутаміну у середовищі пригнічувала рівень експресії мРНК *ME2* (-24 %), *IDH2* (-44 %), *GOT2* (-46 %) та *SDHB* (-27 %) у клітинах гліоми, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 у порівнянні з клітинами гліоми за стандартних умов культивування. В той же час, експресія генів *MDH2* і *SDHD* була нечутливою до умов дефіциту глутаміну у клітинах цієї сублінії гліоми (Рис. 3.17).

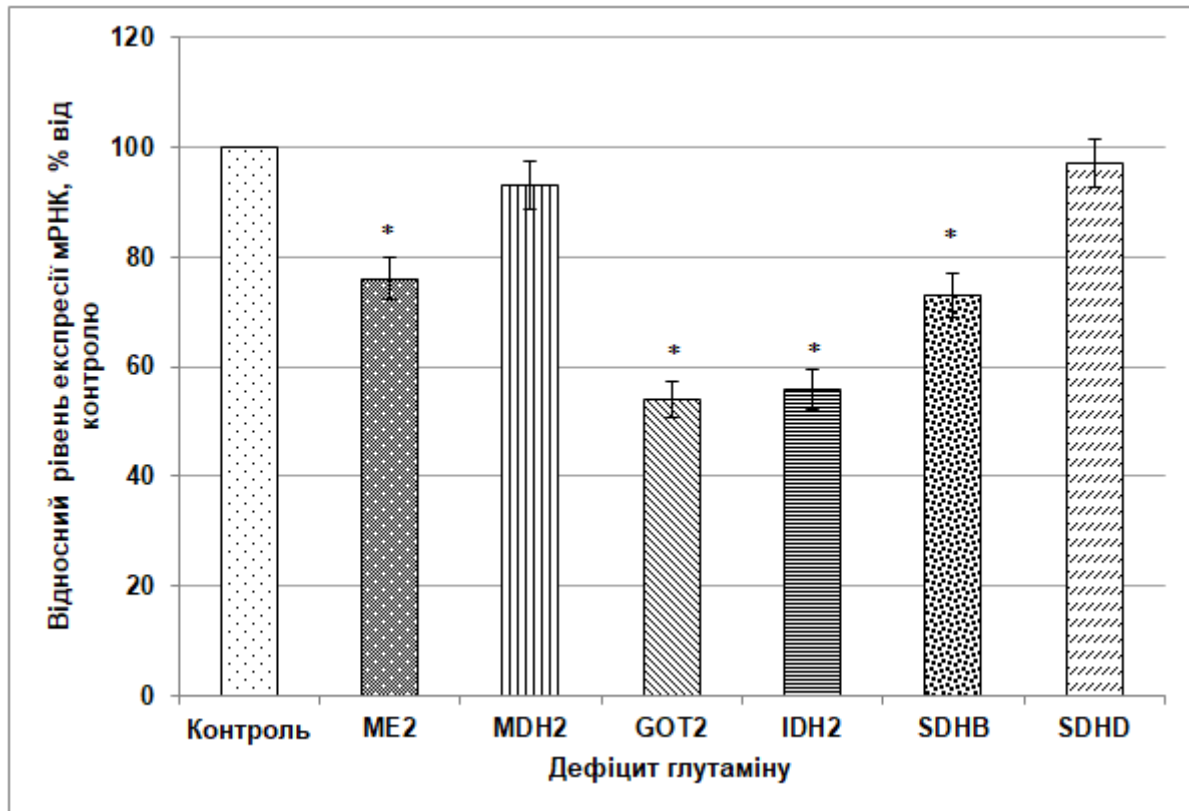


Рис. 3.17. Ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* у контрольних клітинах гліоми лінії, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Інгібування обох ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1 по-різному модифікувало ефект відсутності глутаміну у середовищі на експресію усіх досліджених генів. Зокрема, пригнічення активності IRE1 знімало вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *ME2*, *GOT2* і *SDHB* та індукувало чутливість експресії генів *MDH2* і *SDHD* до умов дефіциту глутаміну, посилюючи рівень експресії мРНК *MDH2* (+27 % у порівнянні з контролем) та послаблюючи експресію гена *SDHD* на 15 % у порівнянні з клітинами гліоми, стабільно трансфікованими кДНК-конструкцією dnIRE1, за стандартних умов культивування. Водночас, пригнічення функції IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 посилювало ефект

дефіциту глутаміну на експресію гена *IDH2* (-44 % у контрольних клітинах і - 56 % - у dnIRE1-клітинах).

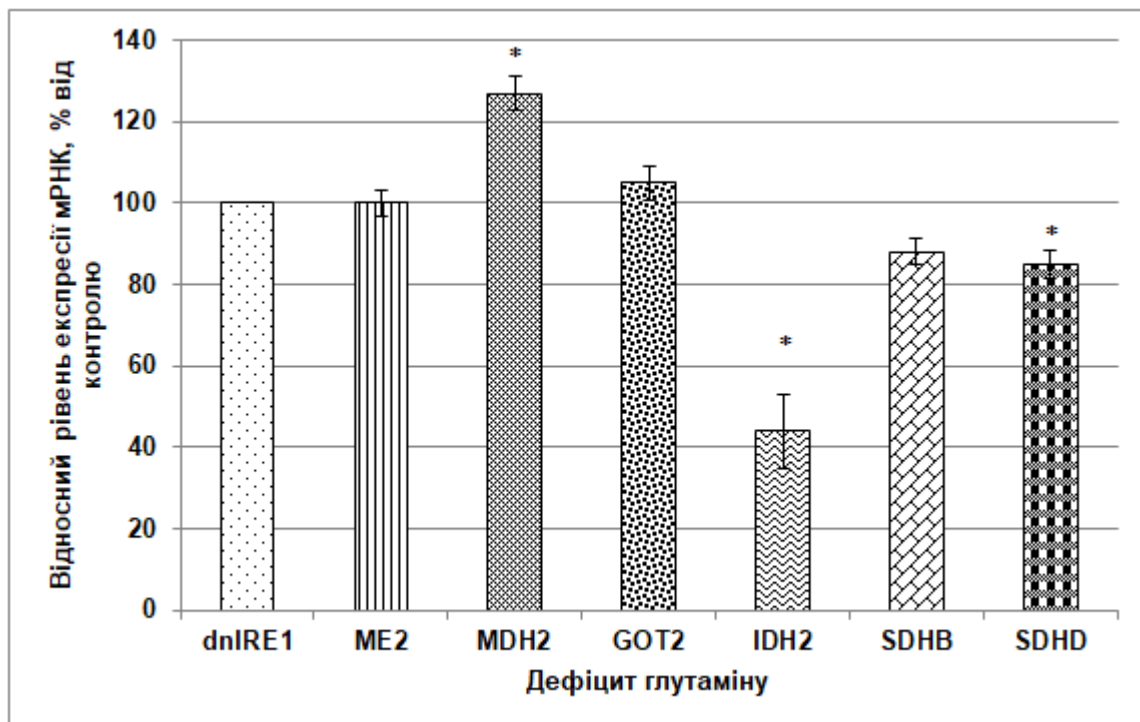


Рис. 3.18. Ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (dnIRE1).

Таким чином, експресія більшості ядерних генів, що кодують ключові ензими циклу трикарбонних кислот, була резистентною до умов відсутності глюкози у середовищі, тоді як пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 модифікувало вплив дефіциту глюкози на експресію усіх досліджених генів, окрім гена мітохондріальної ізоцитратдегідрогенази *IDH2*, зміни експресії якого були однаковими в обох типах клітин гліоми за умов дефіциту глюкози. Крім того, експресія більшості досліджених генів була залежною від умов

дефіциту глутаміну, а виключення функції IRE1 модифікувало ефект відсутності глутаміну у середовищі на експресію усіх досліджених генів.

3.3. Експресія ядерних генів факторів, що контролюють процеси транскрипції, трансляції та біоенергетику в мітохондріях, у клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1 за гіпоксії в залежності від функції сигнального ензиму IRE1.

Відомо, що тісні взаємозв'язки між ЕР та мітохондріями відіграють важливу роль у стрес-опосередкованій регуляції виживання клітин, а численні ядерні гени, що кодують мітохондріальні протеїни, виступають мішенями ХВР1-залежного транскрипційного репрограмування [240-242]. Більше того, мітохондрії є центральним вузлом багатьох біоенергетичних процесів, які ремоделюються у пухлинах, а цілісність мітохондріального геному може слугувати вирішальною точкою ініціації пухлиногенезу [6, 31, 32]. Саме тому, було дуже актуальним дослідити механізми IRE1-залежної регуляції експресії низки факторів, що беруть участь у регуляції функціональної активності мітохондріального геному та контролюють біоенергетику в мітохондріях.

Результати досліджень експресії генів *POLG*, *TSFM*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у клітинах гліоми із повним та частковим пригніченням активності IRE1, а також за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином у клітинах з виключеною ендорибонуклеазою IRE1 представлені на Рис 3.19 – 3.25.

Було показано, що повна блокада функції IRE1 призводила до незначного, проте статистично достовірного, зниження (-14 %) рівня експресії мРНК *POLG*, що кодує каталітичну субодиницю мітохондріальної ДНК-полімерази. В той же час, пригнічення лише ендорибонуклеазної активності не змінювало рівня експресії мРНК *POLG*, що кодує каталітичну субодиницю мітохондріальної ДНК-полімерази. Так само не спостерігали змін в експресії цього гена і за індукції стресу ендоплазматичного ретикулула

тунікаміцином (Рис. 3.19). Отримані результати дозволяють зробити висновок про ключову роль протеїнкінази IRE1 у регуляції експресії даного гена.

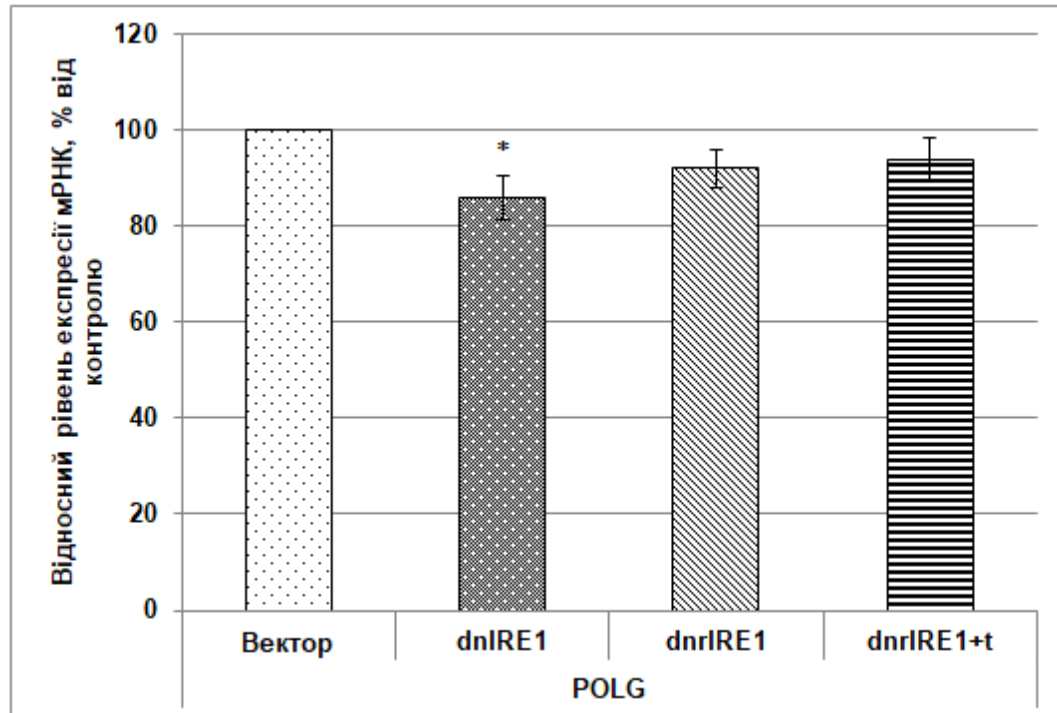


Рис. 3.19. Відносний рівень експресії мРНК *POLG* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулу тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *POLG* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор).

Зміни в експресії мРНК мітохондріального фактора ініціації трансляції MTIF2 за умов повного та часткового пригнічення активності IRE1 були подібними (-47 % і -35 % відповідно). Більше того, індукція стресу ендоплазматичного ретикулу тунікаміцином у клітинах гліоми з пригніченням лише ендорибонуклеази IRE1 істотно не впливала на рівень експресії гена цього мітохондріального фактора (Рис. 3.20). Отримані

результати свідчать про те, що IRE1-залежна регуляція експресії мРНК *MTIF2*, опосередкована, головним чином, ендорибонуклеазною активністю IRE1.

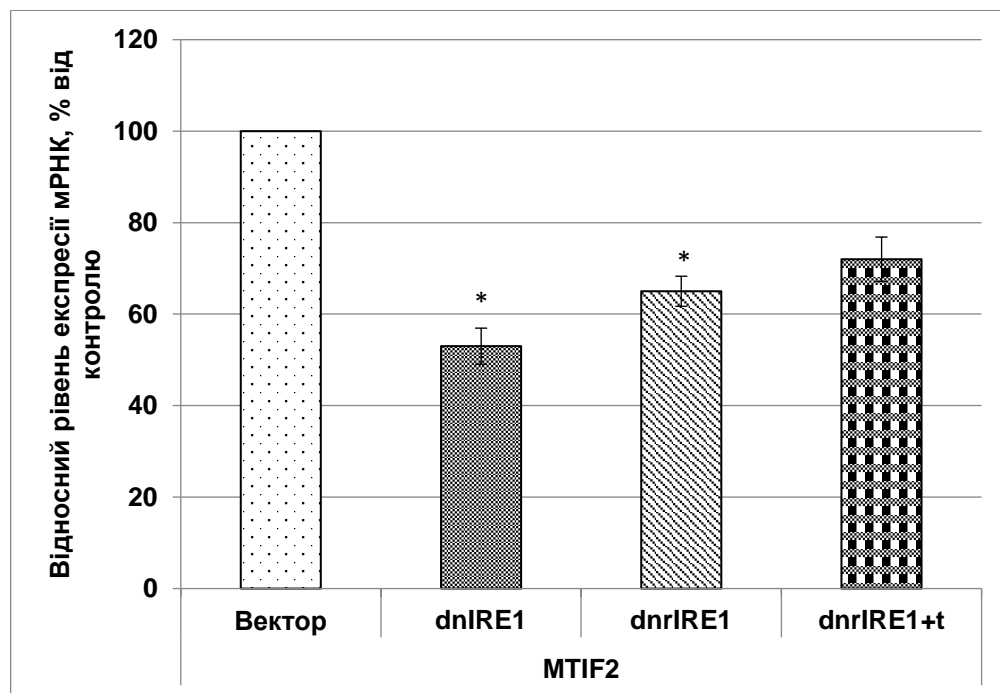


Рис. 3.20. Відносний рівень експресії мРНК *MTIF2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікамідом (dnrIRE1+t). Значення експресії *MTIF2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %. $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор).

З даних, представлених на Рис. 3.21, видно, що повне пригнічення активності IRE1 знижувало рівень експресії мРНК *TSM* на 47 % у порівнянні з контрольними клітинами гліоми, стабільно трансфікованими вектором pcDNA3.1, тоді як інгібування лише ендорибонуклеази IRE1 не призводило до суттєвих змін експресії даного гена. В той же час, за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікамідом спостерігали зниження рівня експресії мРНК *TSM* на 31 % (dnrIRE1+t порівнювали із dnrIRE1). Таким

чином, експресія даного гена є залежною від протеїнкіназної активності IRE1 і, деякою мірою, від функціонування інших мереж стресу ER.

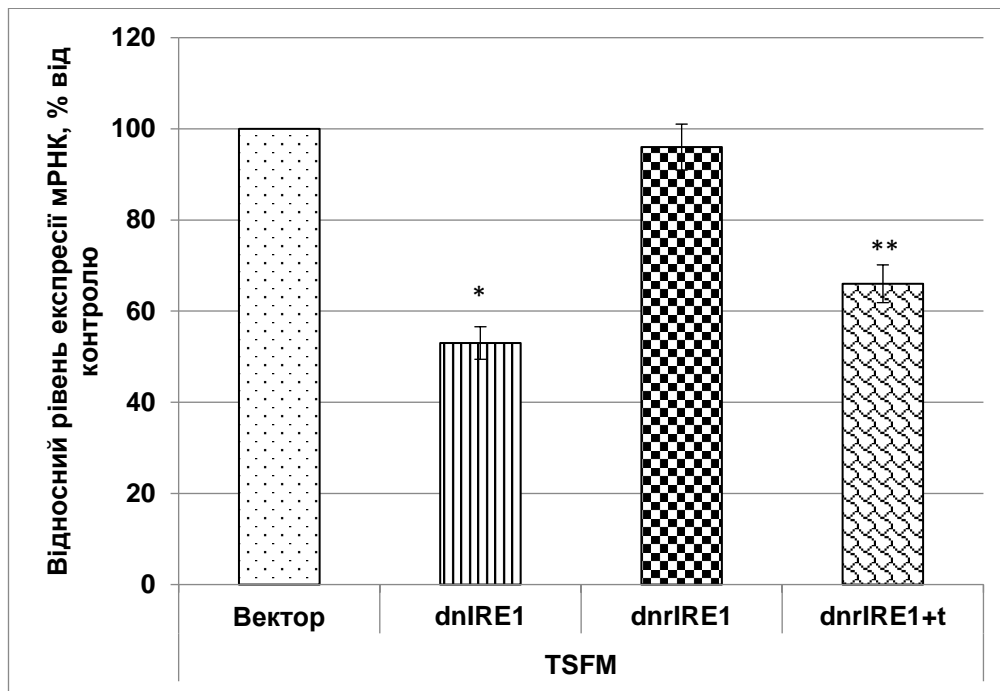


Рис. 3.21. Відносний рівень експресії мРНК *TSMF* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *TSMF* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 3, * - P < 0,05 у порівнянні з контролем (Вектор); ** - P < 0,05 у порівнянні з dnIRE1.

Експресія мРНК апоптичної ендонуклеази *ENDO*G була незалежною від ендорибонуклеазної активності IRE1, а також не змінювалась за умов індукції стресу ER тунікаміцином (Рис. 3.22). Враховуючи значне (+98 %) зростання рівня експресії мРНК *ENDO*G у клітинах гліоми з повним пригніченням функції IRE1, можна стверджувати, що стрес-залежна регуляція експресії гена *ENDO*G опосередкована саме протеїнкіназою IRE1.

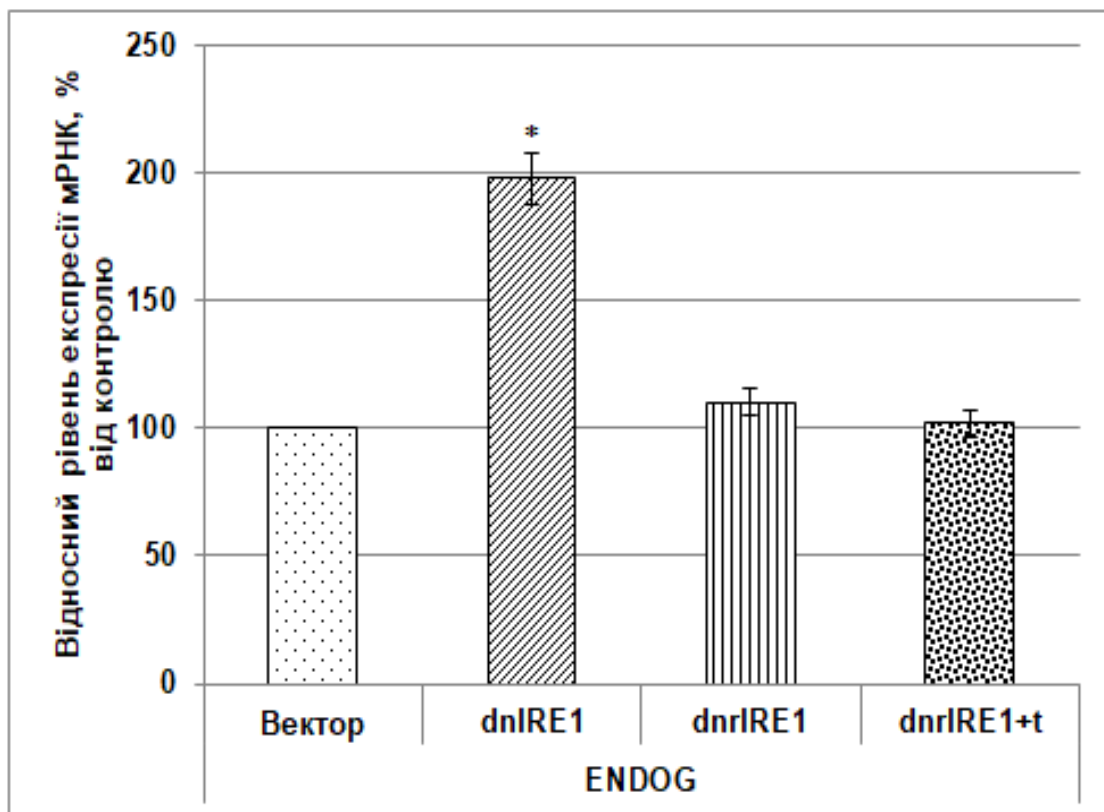


Рис. 3.22. Відносний рівень експресії мРНК *ENDOG* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікамідіном (dnrIRE1+t). Значення експресії *ENDOG* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор).

На Рис. 3.23 показано, що експресія гена *NR3C1*, що кодує глюкокортикоїдний рецептор, зростала на 50 % у клітинах гліоми із повним пригніченням активності IRE1. В той же час, зміни в експресії мРНК *NR3C1* у клітинах гліоми із виключеною ендорибонуклеазою IRE1 були відсутніми, так само, як і за індукції стресу ЕР тунікамідіном у цих dnIRE1-клітинах. Такі результати свідчать про головну роль протеїнкіназної активності IRE1 у регуляції функції даного гена за умов стресу ЕР.

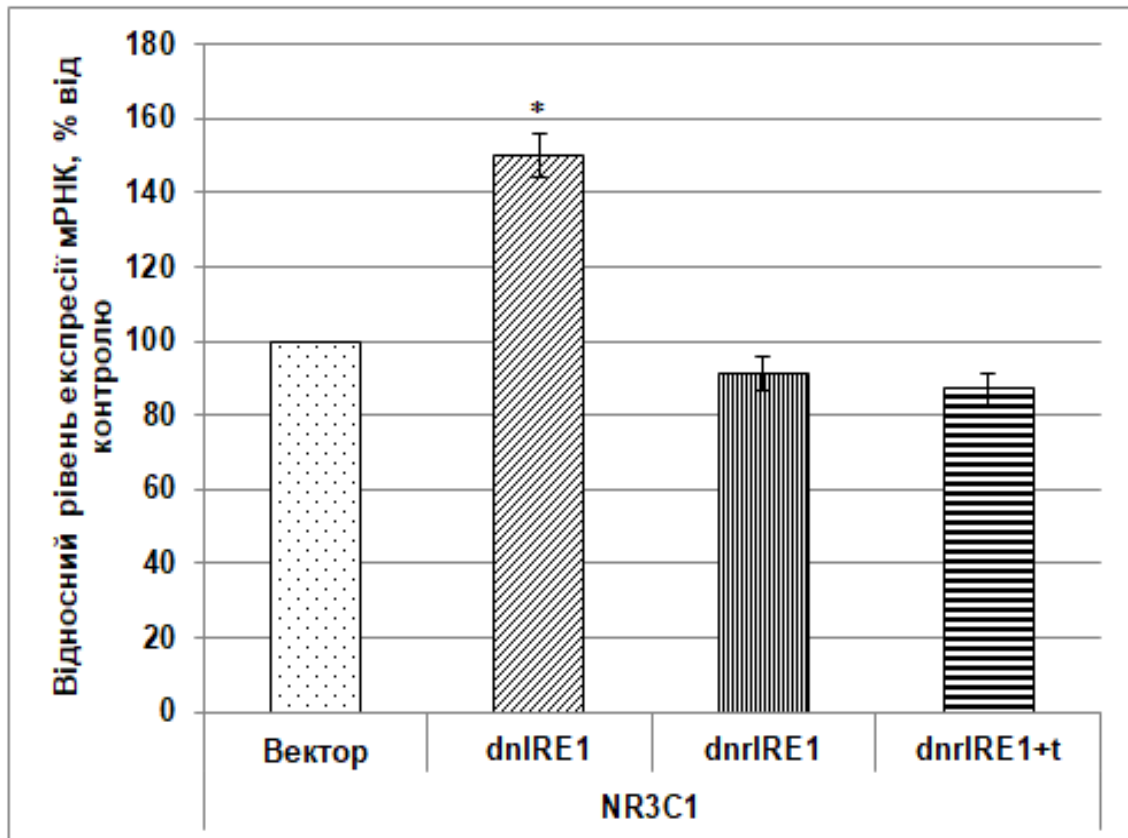


Рис. 3.23. Відносний рівень експресії мРНК *NR3C1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулума тунікамідіном (dnrIRE1+t). Значення експресії *NR3C1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор).

Було виявлено, що повна блокада функції IRE1 призводила до зростання рівня експресії мРНК *NNT* на 64 %, а пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ензиму IRE1, навпаки, знижувало експресію даного гена на 52 %. В той же час, під дією тунікамідіну рівень експресії даного гена не змінюється (Рис. 3.24). Таким чином, IRE1-залежна регуляція експресії даного гена опосередкована обома активностями ензиму IRE1 та, певною мірою, іншими системами стресу ендоплазматичного ретикулума.

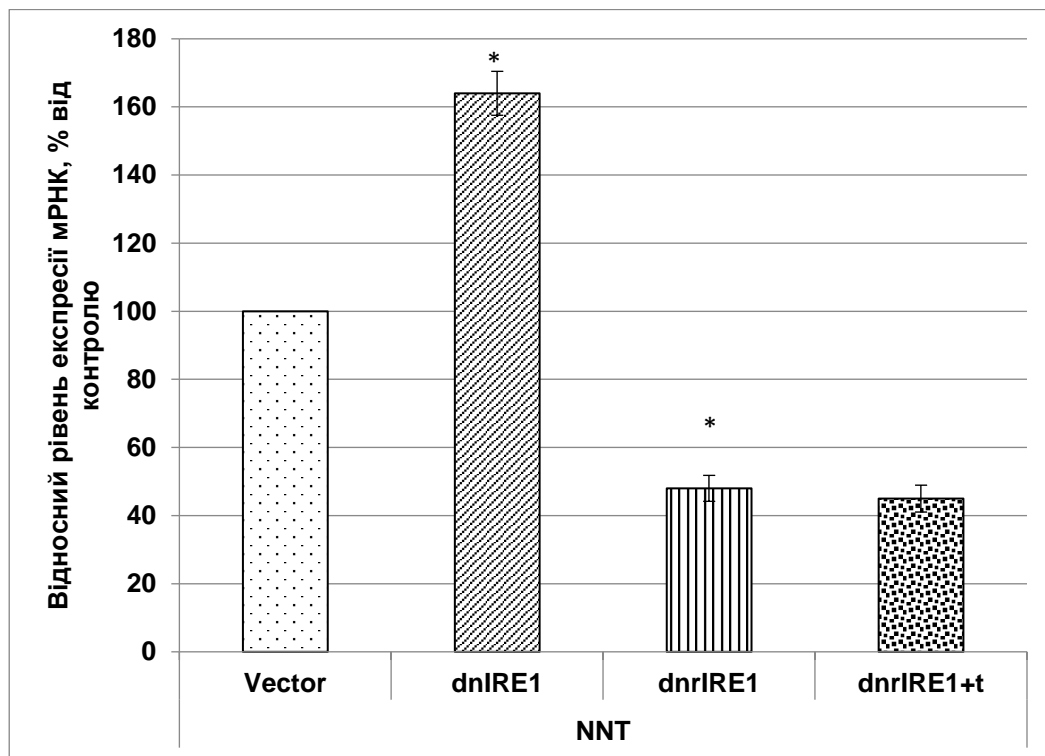


Рис. 3.24. Відносний рівень експресії мРНК *NNT* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *NNT* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Vector).

Нами було встановлено, що повна блокада функції IRE1 призводила до незначного пригнічення експресії мРНК *LONP1* (-20 % у порівнянні з контролем), тоді як виключення лише ендорибонуклеази IRE1 не викликало істотних змін експресії цього гена (Рис. 3.25). Таким чином, регуляція експресії даного гена опосередкована саме протеїнкіназною активністю IRE1. Разом з тим, дія тунікаміцину на dnrIRE1-клітини підвищувала рівень експресії мРНК *LONP1* більш, ніж у 2 рази, в порівнянні із клітинами гліоми, що експресували

функціонально активний IRE1, що дозволяє зробити висновок про залучення інших систем стресу ER у регуляцію функції гена *LONP1*.

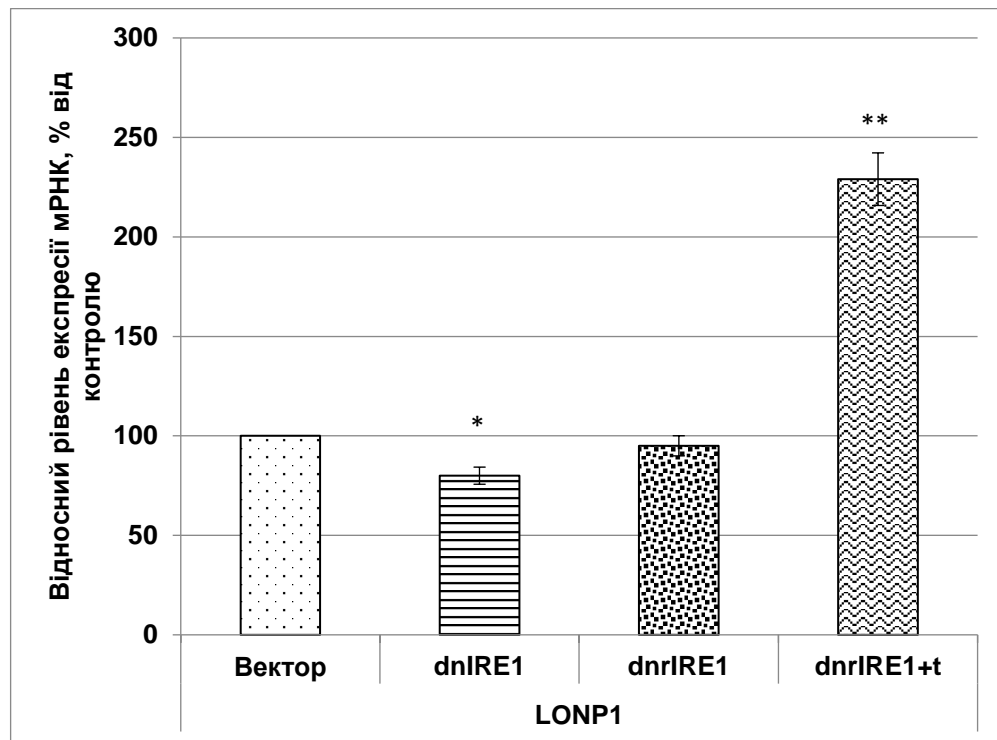


Рис. 3.25. Відносний рівень експресії мРНК *LONP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *LONP1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор), ** - $P < 0,05$ у порівнянні з dnrIRE1.

Отримані результати свідчать про гено-специфічну залежність експресії усіх досліджених ядерних генів мітохондріальних ензимів та факторів, які регулюють процеси реплікації, транскрипції та трансляції у мітохондріях, а також контролюють процеси біоенергетики в цих органелах, від функціональної активності IRE1, основного медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни. Більше того, було продемонстровано наявність різних механізмів стрес-залежної регуляції експресії цих генів, що

опосередковуються протейніназою або ендорибонуклеазною активностями сигнального ензиму IRE1, а в ряді випадків – ще й іншими системами стресу ER.

Результати проведеного аналізу промоторних ділянок генів *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* на наявність специфічних сайтів зв'язування з транскрипційним фактором XBP1 (XBP1-responsive element - CCACG/CGTGG) представлені в Таблиці 3.3.

Специфічні до транскрипційного фактора XBP1 послідовності CCACG/CGTGG, що можуть його зв'язувати, було виявлено у промоторних ділянках генів *POLG*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*. Знайдені регуляторні елементи були розташовані як у напрямку від 5' до 3' (CCACG), так і в зворотному – CGTGG. Так, у промоторній ділянці гена *POLG* було виявлено п'ять залежних від XBP1 елементи, два з яких були розташовані в напрямку 5' - 3', а решта три – у зворотному напрямку. Чотири XBP1-залежні елементи було ідентифіковано у промоторній послідовності гена *ENDOG*, причому два із них були розташовані у напрямку 5' - 3', а ще два – у зворотному (Табл. 3.3).

В той же час, для гена *MTIF2* було виявлено одну XBP1-залежну послідовність, розташовану у напрямку від 3' до 5'. У промоторній ділянці гена *NR3C1* було ідентифіковано два сайти зв'язування з XBP1: прямий і зворотний, тоді як у випадку гена *NNT* обидва регуляторні елементи були розташовані у напрямку від 5' до 3'. Аналіз промоторної послідовності гена *LONP1* виявив п'ять залежних від XBP1 елементів, три з яких були розташовані у напрямку 5' - 3', а решта два – у зворотному напрямку (Табл. 3.3).

Отже, результати біоінформаційного аналізу свідчать про можливість участі транскрипційного фактору XBP1 у стрес-регуляції експресії генів, що контролюють функціональну активність мітохондріального геному та біоенергетику мітохондрій, у клітинах гліоми лінії U87.

Таблиця 3.3

Послідовності ССАСG/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1, у промоторних ділянках генів *POLG*, *MTIF2*, *TSMF*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сторінки послідовності промотору та GenBank номер
<i>POLG</i>	-1201 до -1196 -1198 до -1193 -1075 до -1070 -485 до -480 -287 до -282	tCCACGtg caCGTGGc tCCACGct ggCGTGGt gCCACGcg	1, NM_002693
<i>MTIF2</i>	-174 до -169	aCCACGcg	2, NM_002453
<i>TSMF</i>		Не виявлено	3, NM_005726
<i>ENDOG</i>	-836 до -831 -532 до -527 -128 до -123 -50 до -45	tgCGTGGg ggCGTGGt cCCACGac gCCACGcc	4, NM_004435
<i>NR3C1</i>	-212 до -207 -147 до -142	gCCACGcc ggCGTGGg	5, NM_000176
<i>NNT</i>	-816 до -811 -655 до -650	aCCACGaa aCCACGgc	6, NM_182977
<i>LONP1</i>	-1036 до -1031 -898 до -893 -441 до -436 -240 до -235 -101 до -96	ggCGTGGt ggCGTGGt gCCACGgg ccCGTGGc tCCACGtg	7, NM_004793

1 - http://bit.ly/genecopoeia_polg_promoter

2 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702609/

3 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_701770/

4 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_705614/

5 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721809/

6 - http://bit.ly/genecopoeia_nnt_promoter

7 - http://bit.ly/genecopoeia_lonp1_promoter

Крім того, було проведено біоінформаційний аналіз 3'-послідовностей мРНК *POLG* і *TSM* на наявність сайтів зв'язування мікроРНК і виявлено сайти для мікроРНК miR-203-3p, miR-507 та miR-381-3p (Рис. 3.26).

Position 283-289 of <i>POLG</i> 3' UTR	5' ...UCACAUUAACUCAGGCAUUUCAN...
hsa-miR-203	3' GAUCACCAGGAUUUGUAAAGUG
Position 87-93 of <i>POLG</i> 3' UTR	5' ...UUCAGCUGUGCUUUUUGCAAAG...
hsa-miR-507	3' AAGUGAGGUUUUCCACGUUUU
Position 119-125 of <i>TSM</i> 3' UTR	5' ...AAAUAUUAAUAGUUGUAUAA...
hsa-miR-381-3p	3' UGUCUCUCGAACGGGAACAUAU

Рис. 3.26. Сайти зв'язування мікроРНК miR-203-3p, miR-507 та miR-381-3p в 3'-послідовностях мРНК *POLG* і *TSM*.

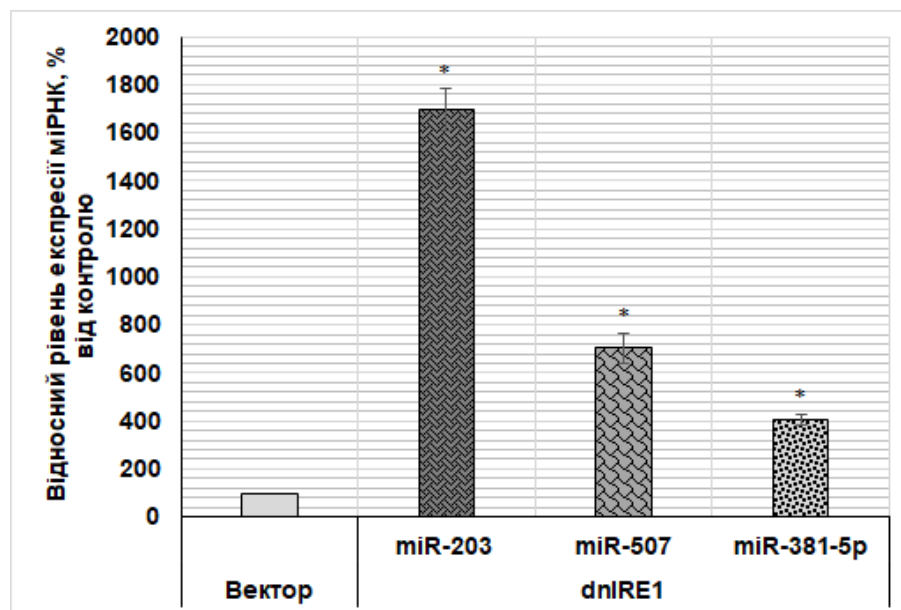


Рис. 3.27. Рівень експресії мікроРНК miR-203, miR-507 та miR-381-5p у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (Контроль), та у сублінії цих клітин з пригніченою за допомогою доміант-негативної конструкції IRE1 обох ензиматичних активностей IRE1 (dnIRE1). Інтенсивність експресії мікроРНК нормалізували по рівню експресії мРНК GAPDH та RNU6 РНК і виражали в % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %; n = 3.

Встановлено, що рівень мікроРНК miR-203, miR-507 та miR-381-5p у клітинах з пригніченим IRE1 значно зростає у порівнянні з контрольними клітинами гліоми. Оскільки зниження рівня експресії мРНК *POLG* і *TSM* супроводжується посиленням експресії даних мікроРНК, можна зробити висновок про можливість регуляції експресії даних генів на пост-транскрипційному рівні (Рис. 3.27).

Наступна серія наших досліджень була присвячена дослідженню впливу гіпоксії, що є важливим компонентом пухлинного росту, на експресію ядерних генів мітохондріальних протеїнів, що контролюють функціональну активність мітохондріального геному та біоенергетичні процеси в мітохондріях, у клітинах гліоми лінії U87 у залежності від IRE1-опосередкованого шляху стресу ER (Рис. 3.28 – 3.36).

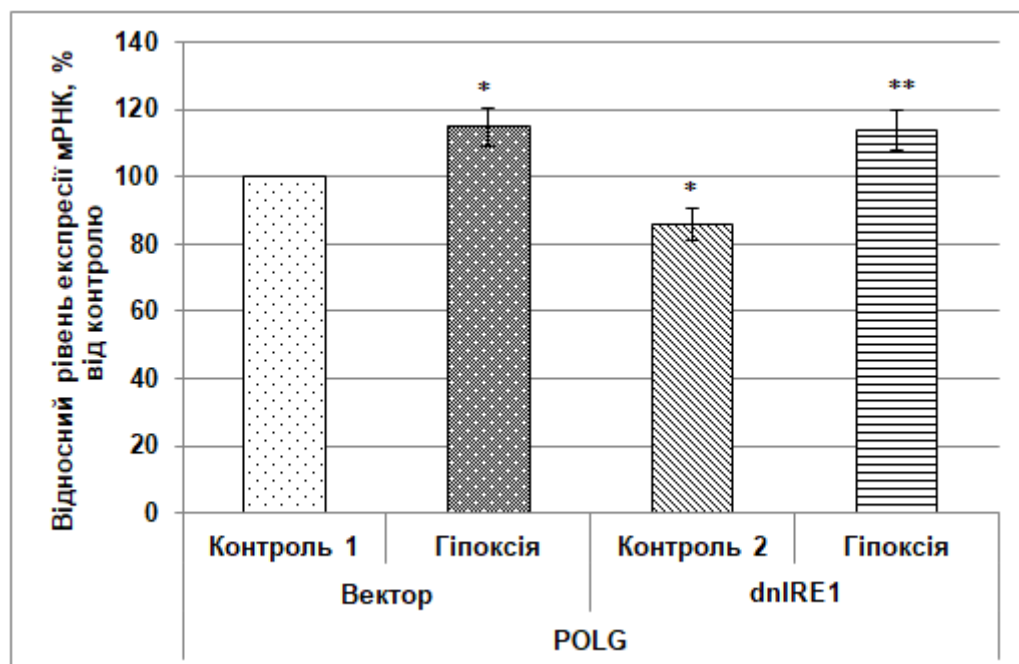


Рис. 3.28. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *POLG* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *POLG* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

З даних, наведених на Рис. 3.28, видно, що гіпоксія призводила до незначного зростання експресії мРНК мітохондріальної полімерази POLG (+15 %) у контрольних клітинах гліоми, а виключення функції сигнального ензиму IRE1 посилювало вплив гіпоксії на експресію цього гена (+ 32%).

Експресія мРНК мітохондріального фактора ініціації трансляції 2 (MTIF2) за умов гіпоксії знижувалась на 21% у контрольних клітинах гліоми у порівнянні з нормоксією (Контроль 1), тоді як пригнічення активності IRE1 знімало ефект гіпоксії на експресію гена *MTIF2* (Рис. 3.29).

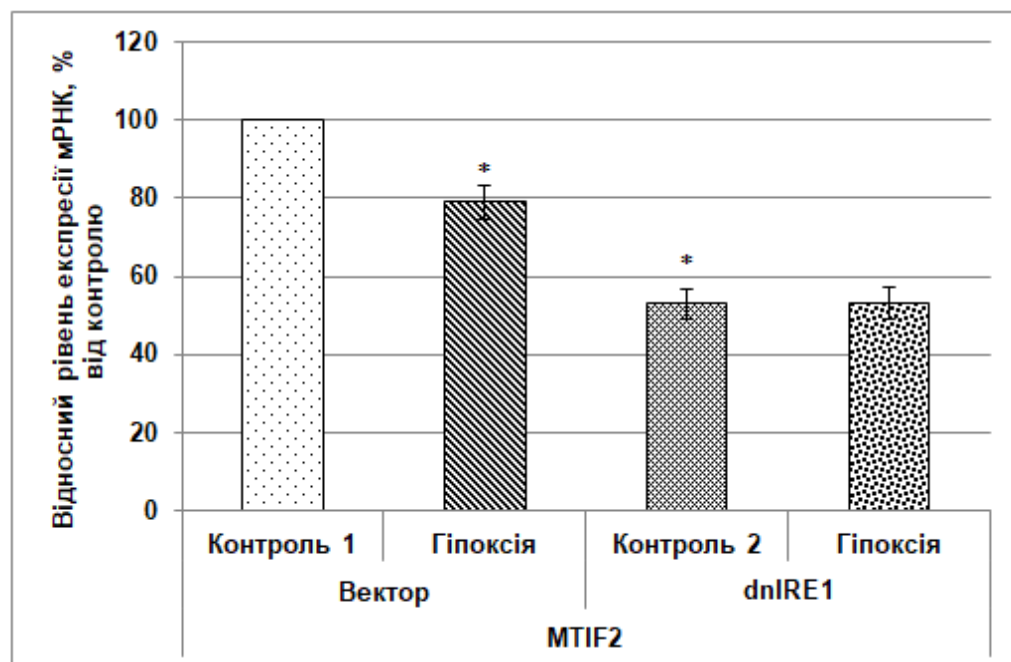


Рис. 3.29. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *MTIF2* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *MTIF2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1.

Подібно до *MTIF2*, експресія мРНК мітохондріального фактору елонгації трансляції TSFM змінювалась у відповідь на гіпоксію лише у контрольних

клітинах гліоми, а блокада ензиматичних активностей IRE1 усувала гіпоксичну регуляцію експресії даного гена (Рис. 3.30).

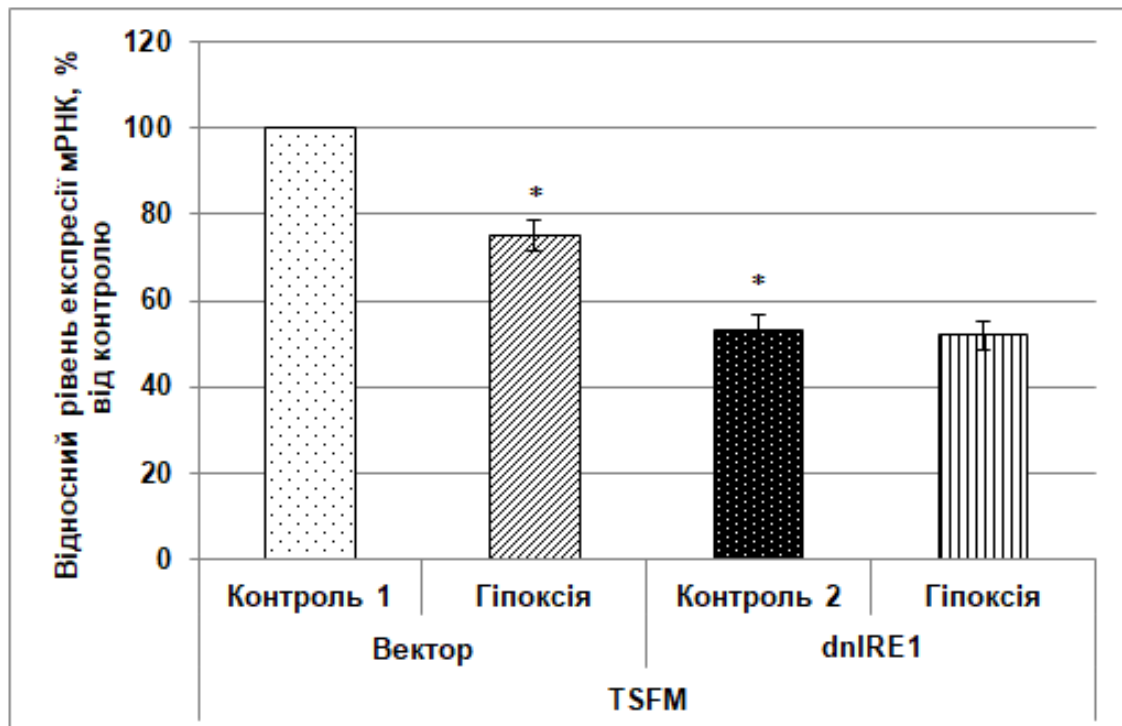


Рис. 3.30. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *TSMF* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *TSMF* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1.

Мітохондріальна ендонуклеаза ENDOG виконує переважно анти-проліферативні функції, тому зростання її експресії за умов гіпоксії може призводити до інгібування росту пухлин. З даних, представлених на Рис. 3.31, видно, що пригнічення IRE1 не лише посилює експресію мРНК *ENDOG* у 2 рази, але і збільшує чутливість її експресії до умов низьких концентрацій кисню у середовищі, що може мати значення у IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації клітин гліоми.

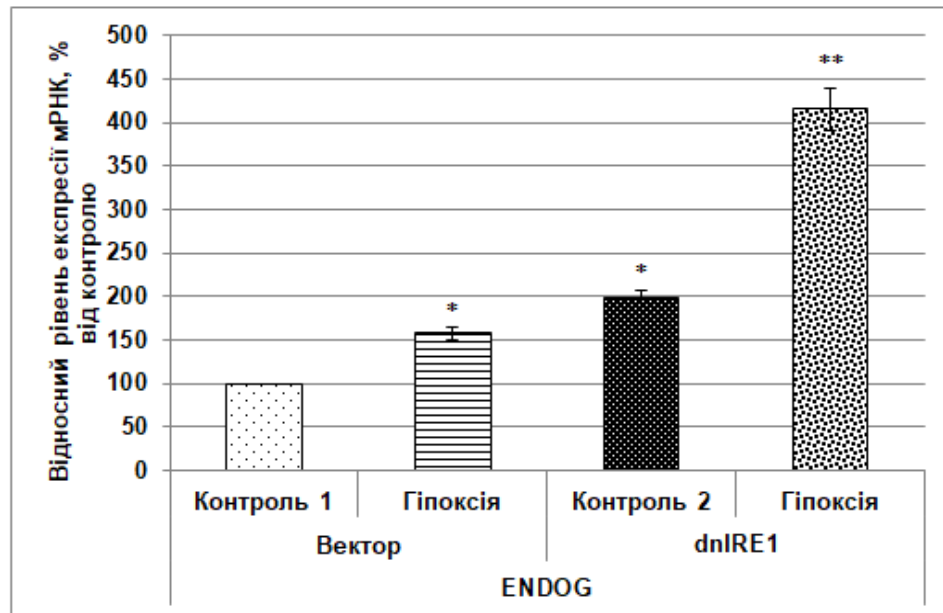


Рис. 3.31. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *ENDOG* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *ENDOG* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1; ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

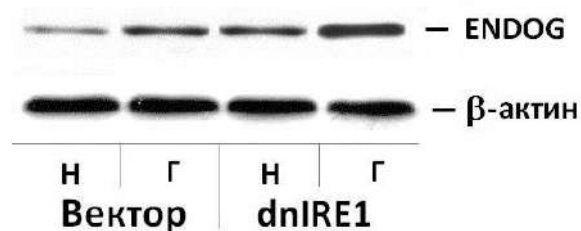


Рис. 3.32. Вплив гіпоксії на експресію протеїну ENDOG у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор), та сублінії цих клітин із пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1, стабільно трансфікованої домінант-негативною конструкцією (dnIRE1), визначений з допомогою вестерн-блот аналізу. Н – контроль (нормоксія), Г – умови гіпоксії. Визначення бета-актину (β -актин) слугувало контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

Результати змін в експресії мРНК *ENDOG*, отримані за допомогою ПЛР, цілком узгоджуються із даними вестерн-блот аналізу рівнів відповідного протеїну в клітинах гліоми за відповідних експериментальних умов (Рис. 3.32).

На Рис. 3.33 показано, що експресія мРНК глюкокортикоїдного рецептора (*NR3C1*) за умов гіпоксії зростала майже в два рази у клітинах гліоми, трансфікованих порожнім вектором, тоді як пригнічення активності IRE1 зменшувало ефект гіпоксії на експресію мРНК *NR3C1* (+64 % у порівнянні з контролем 2).

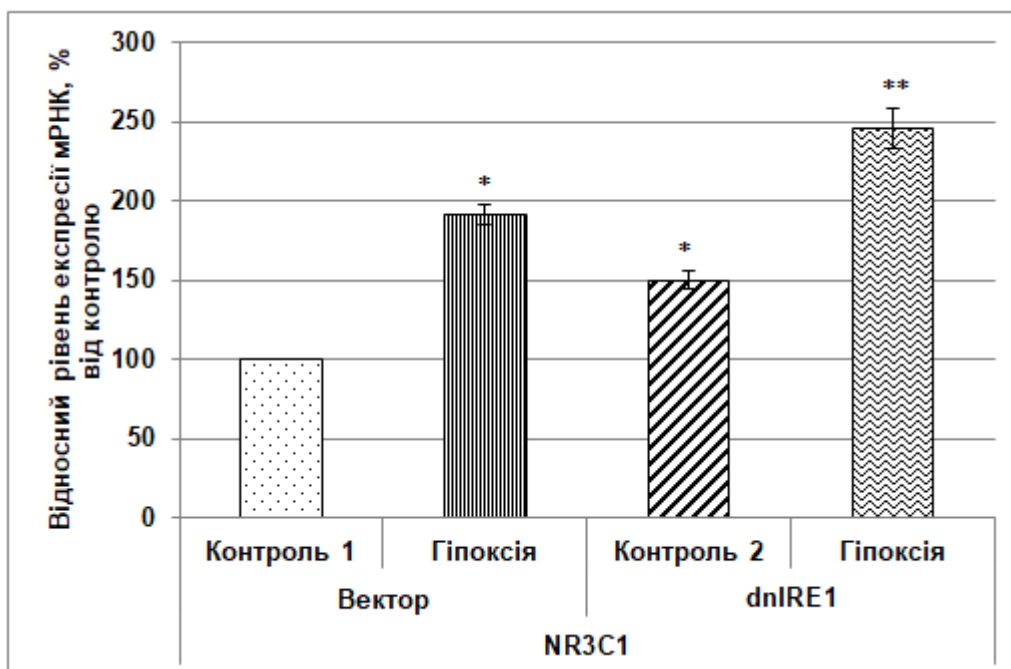


Рис. 3.33. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *NR3C1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *NR3C1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1; ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

З даних, наведених на Рис. 3.34, видно, що гіпоксія викликає незначне, проте статистично достовірне, зростання рівня експресії мРНК *NNT*

(нікотинаміднуклеотид-трансгідрогенази, nicotinamide nucleotide transhydrogenase), що кодує інтегральний протеїн внутрішньої мітохондріальної мембрани (+16% у порівнянні з Контролем 1). Пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1 значно посилювало вплив гіпоксії на експресію дослідженого гена (+42% у порівнянні з Контролем 2).

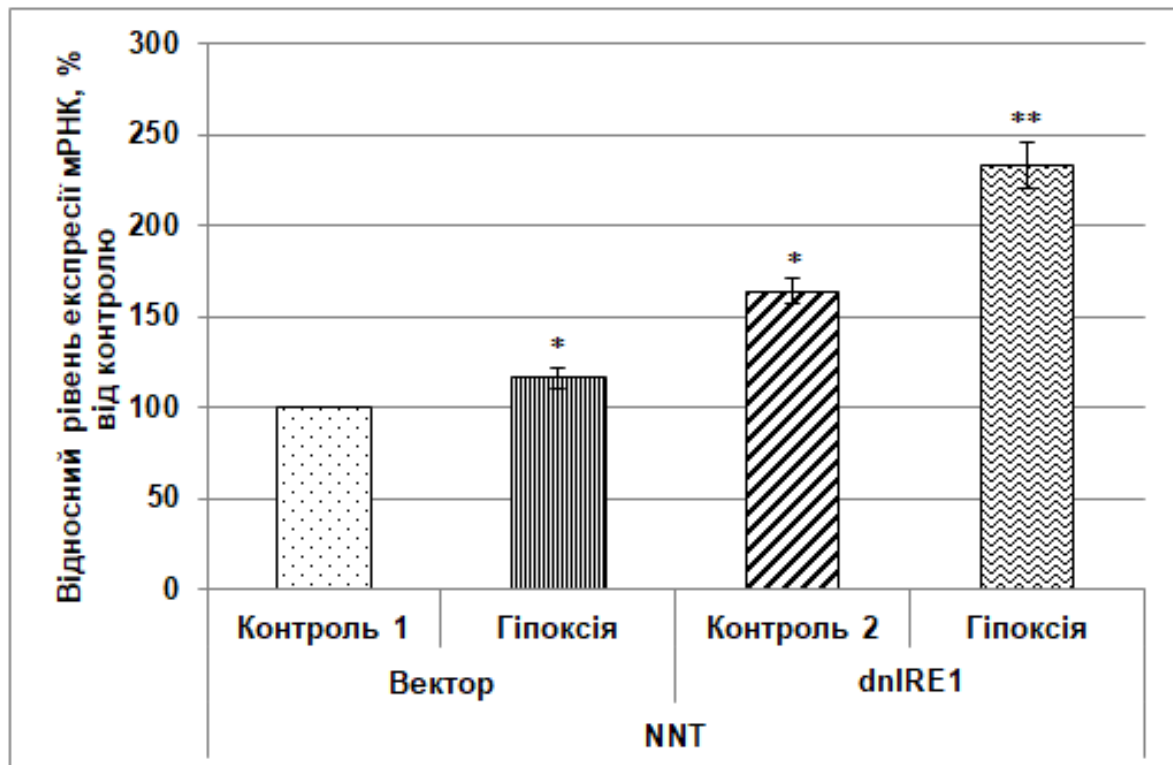


Рис. 3.34. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *NNT* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії клітин гліоми з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (*dnIRE1*). Значення експресії *NNT* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1; ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією *dnIRE1*).

Дані по експресії мРНК *NNT* узгоджуються із рівнями кодованого ним протеїну в клітинах гліоми лінії U87 за досліджених умов (Рис. 3.35).

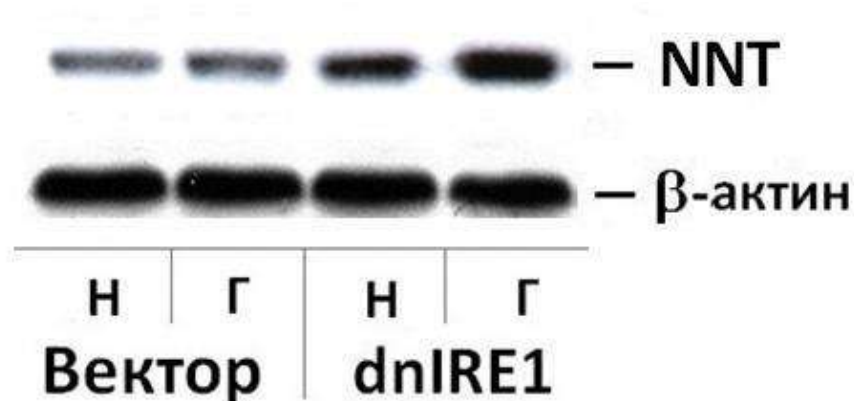


Рис. 3.35. Вплив гіпоксії на експресію протеїну NNT у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор), та сублінії цих клітин із пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1, стабільно трансфікованої домінант-негативною конструкцією (dnIRE1), визначений з допомогою вестерн-блот аналізу. Н – контроль (нормоксія), Г – умови гіпоксії. Визначення бета-актину (β -актин) слугувало контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

На Рис. 3.36 показано, що гіпоксія призводила до суттєвого зростання рівня експресії мРНК Lon-пептидази 1 на 53 % у контрольних клітинах гліоми, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1. Водночас, пригнічення функціональної активності IRE1 знімало ефект гіпоксії на експресію цього гена. Такі результати свідчать, що гіпоксична регуляція експресії гена *LONP1* є залежною від IRE1.

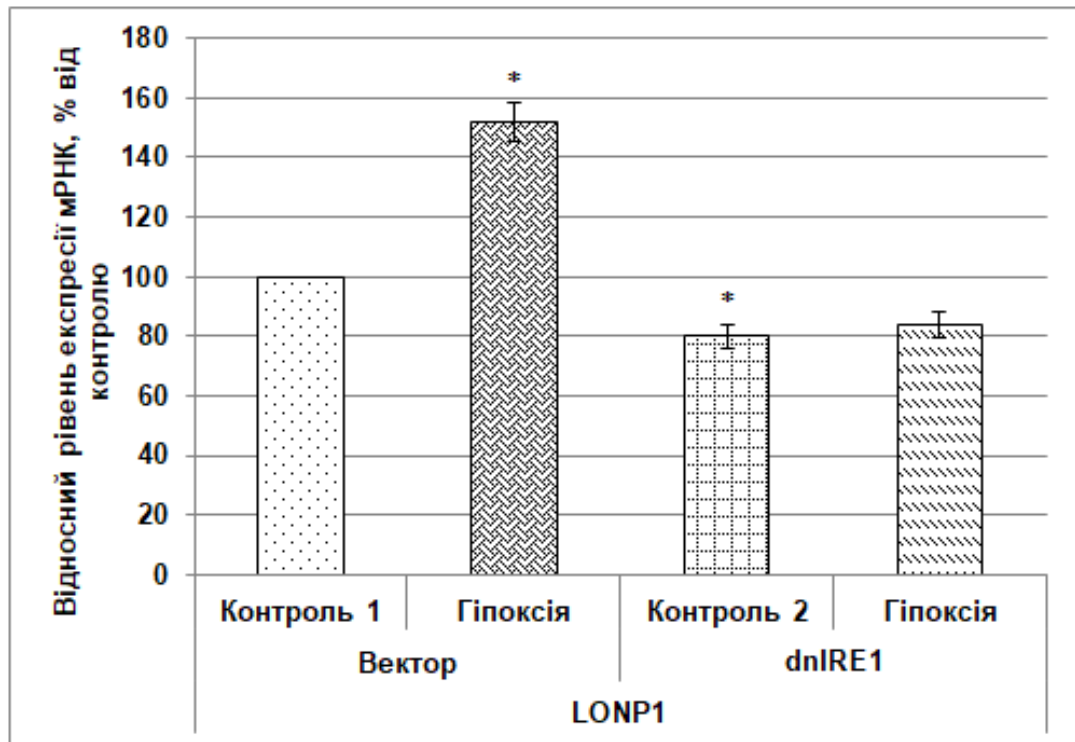


Рис. 3.36. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *LONP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *LONP1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1.

Таким чином, дефіцит кисню в середовищі змінює рівень експресії усіх ядерних генів, що кодують мітохондріальні протеїни *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*, що є залученими у регуляцію процесів реплікації, транскрипції і трансляції в мітохондріях та контролюють біоенергетику цих органел, в залежності від функціональної активності ензиму *IRE1*, який є ключовим медіатором стресу ендоплазматичного ретикулума.

Результати біоінформаційного пошуку специфічних елементів $A(G)CGTGG(C)/(G)CCACGC(T)$ у промоторних ділянках досліджених генів *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*, що розпізнаються транскрипційним фактором HIF, наведені у Таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що зв'язують транскрипційний фактор HIF (hypoxia responsive element), у промоторних ділянках генів *POLG*, *MTIF2*, *TSM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*.

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>POLG</i>	-908 до -902 -486 до -480 -287 до -281	tGCGTGGa gGCGTGGt gCCACGCg	1, NM_002693
<i>MTIF2</i>	-174 до -168	aCCACGCg	2, NM_002453
<i>TSM</i>	-	Не виявлено	3, NM_005726
<i>ENDOG</i>	-837 до -831 -533 до -527 -128 до -122 -50 до -44	tGCGTGGg gGCGTGGt cCCACGAc gCCACGCc	4, NM_004435
<i>NR3C1</i>	-711 до -705 -212 до -206 -194 до 188 -148 до -142	gGCACGCg gCCACGCc gGCGTGCg gGCGTGGg	5, NM_000176
<i>NNT</i>	-128 до -122	aGCACGCa	6, NM_182977
<i>LONP1</i>	-1037 до -1031 -899 до -893 -413 до -407 -101 до -95	gGCGTGGt gGCGTGGt tACGTGCa tCCACGTg	7, NM_004793

1 - http://bit.ly/genecopoeia_polg_promoter

2 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702609/

3 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_701770/

4- https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_705614/

5 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721809/

6 - http://bit.ly/genecopoeia_nnt_promoter

7 - http://bit.ly/genecopoeia_lonp1_promoter

Специфічні до транскрипційного фактора HIF послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), що можуть його зв'язувати, було виявлено у промоторних ділянках генів *POLG*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1*. Дані регуляторні елементи були розташовані як у напрямку від 5' до 3' (A(G)CGTGG(C)), так і в зворотному - C(G)CACGC(T). Так, у промоторній ділянці гена *POLG* було виявлено два залежних від HIF елементи, розташовані у напрямку 5' - 3', а ще один регуляторний елемент знаходився у зворотному напрямку. В той же час, для генів *MTIF2* та *NNT* було ідентифіковано по одній залежній від HIF послідовності, що в обох випадках розташовувалась у напрямку від 3' до 5' (Табл. 3.4).

Чотири сайти зв'язування з HIF було виявлено у промоторній ділянці гена *ENDOG*, два з яких були розташовані у напрямку від 5' до 3', тоді як ще два – у зворотному напрямку. Аналогічні результати були отримані при аналізі промоторної послідовності гена *NR3C1*. У випадку гена *LONP1* три залежні від HIF елементи були розташовані у напрямку 5' - 3', а четвертий – був у зворотному напрямку (Табл. 3.4).

Крім того, вперше було виявлено, що послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), які зв'язують транскрипційний фактор HIF, виявлені у промоторних ділянках генів *POLG*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *LONP*, водночас містили у своїй структурі сайти зв'язування ХВР1 (CGTGG/CCACG) (Табл. 3.3-3.4). Отримані результати дозволяють зробити припущення про кооперативну регуляцію експресії частини ядерних генів протеїнів мітохондрій, що контролюють мітохондріальний геном та біоенергетику цих органел, різними транскрипційними факторами, що розпізнають специфічні послідовності у промоторних ділянках цих генів. Крім того, ці дані пояснюють залежність гіпоксичної регуляції від функціонування сигнального ензиму IRE1, ендорибонуклеаза активність якого відповідає за утворення стабільного і функціонально активного ХВР1. Таким чином, більш виражені зміни в експресії досліджених генів, які спостерігали у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії, можна пояснити спільною дією

транскрипційних факторів HIF та XBP1, а послаблення або виключення ефекту гіпоксії у клітинах гліоми із блокадою IRE1 – відсутністю транскрипційно активної форми XBP1.

3.4. Вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси транскрипції і трансляції в мітохондріях, у клітинах гліоми в залежності від функції IRE1

На Рис. 3.37-3.40. представлені результати досліджень по впливу дефіциту глюкози та глутаміну, що відіграють важливу роль у проліферації і рості пухлинних клітин, на експресію групи ядерних генів, що контролюють функціональну активність мітохондріального геному та біоенергетику в мітохондріях, в залежності від функціонування сенсорно-сигнального ензиму IRE1.

Встановлено, що відсутність глюкози у середовищі призводила до незначного пригнічення експресії мРНК *MTIF2* (-13 %) і навпаки, зростання експресії мРНК *NNT* (+17 %) та *LONP1* (+30 %) у контрольних клітинах гліоми, що експресують функціонально активний ензим IRE1. Експресія решти генів була нечутливою до умов дефіциту глюкози (Рис. 3.37).

На Рис. 3.38 показано, що виключення обох ензиматичних активностей IRE1 модифікувало ефект дефіциту глюкози на експресію частини досліджених генів: змінювало напрямок змін експресії мРНК *MTIF2* (-13 % - у контрольних клітинах та +62 % - у dnIRE1-клітинах), посилювало ефект дефіциту глюкози на експресію мРНК *LONP1* (+30 % і +43 %, відповідно) та знімало вплив відсутності глюкози в середовищі на експресію гена *NNT*. В той же час, експресія генів *POLG*, *TSMF*, *ENDOG* та *NR3C1* залишалась резистентною до дефіциту глюкози у клітинах гліоми із блокадою IRE1.

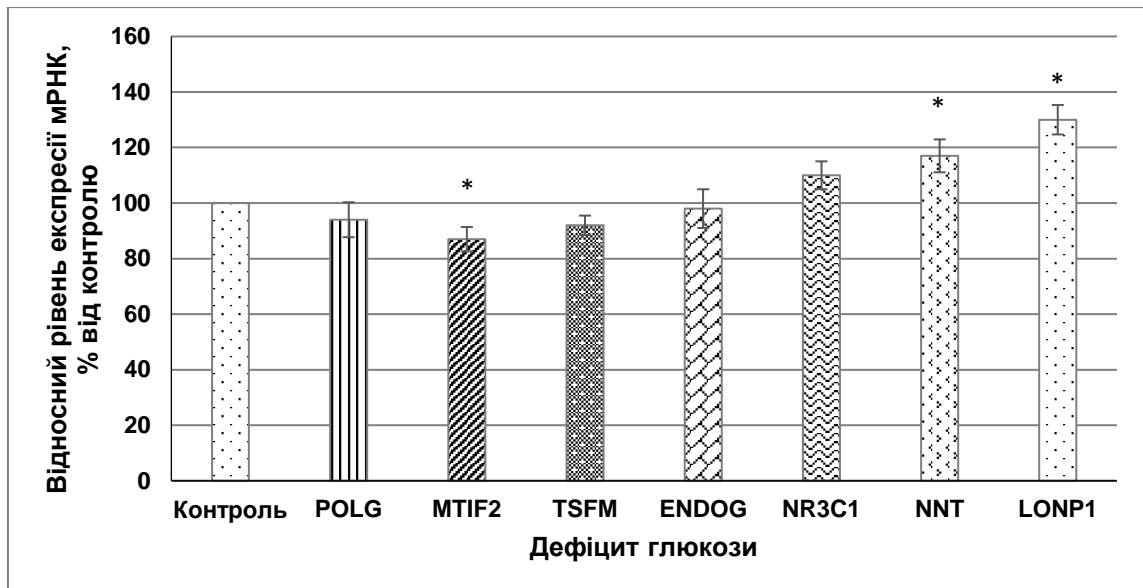


Рис. 3.37. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором рсDNA3.1 (Контроль). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

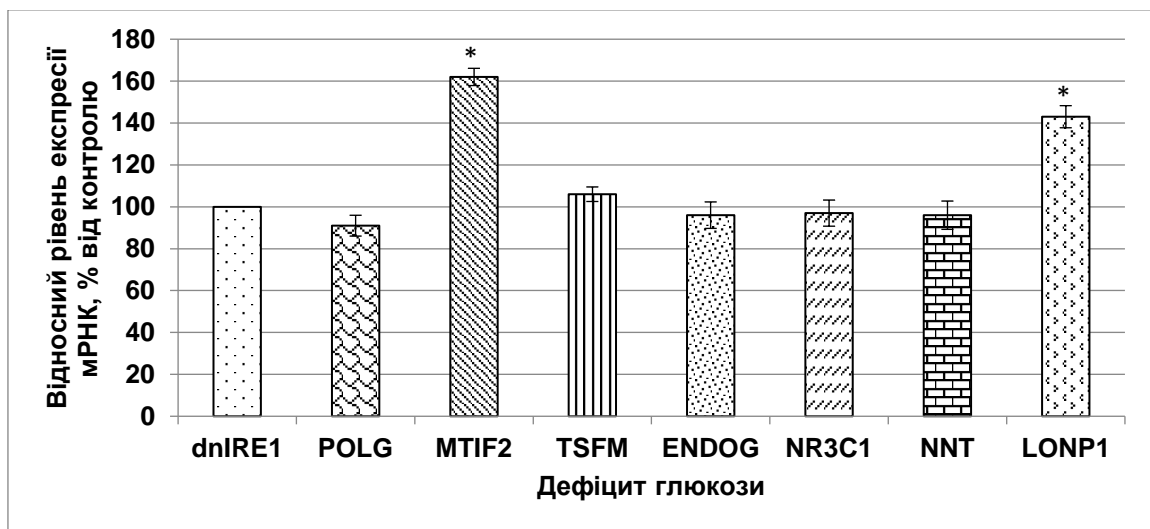


Рис. 3.38. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Було показано, що дефіцит глютаміну по-різному змінював рівень експресії усіх досліджених генів у контрольних клітинах гліоми, стабільно трансфікованих вектором рсDNA3.1, а саме: посилював експресію мРНК *MTIF2* (+18 %), *NNT* (+33 %), *LONP1* (+39 %) та пригнічував – *POLG* (-24 %), *TSMF* (-18 %), *ENDOG* (-36 %), *NR3C1* (-21 %), у порівнянні з клітинами гліоми за стандартних умов вирощування (Рис. 3.39).

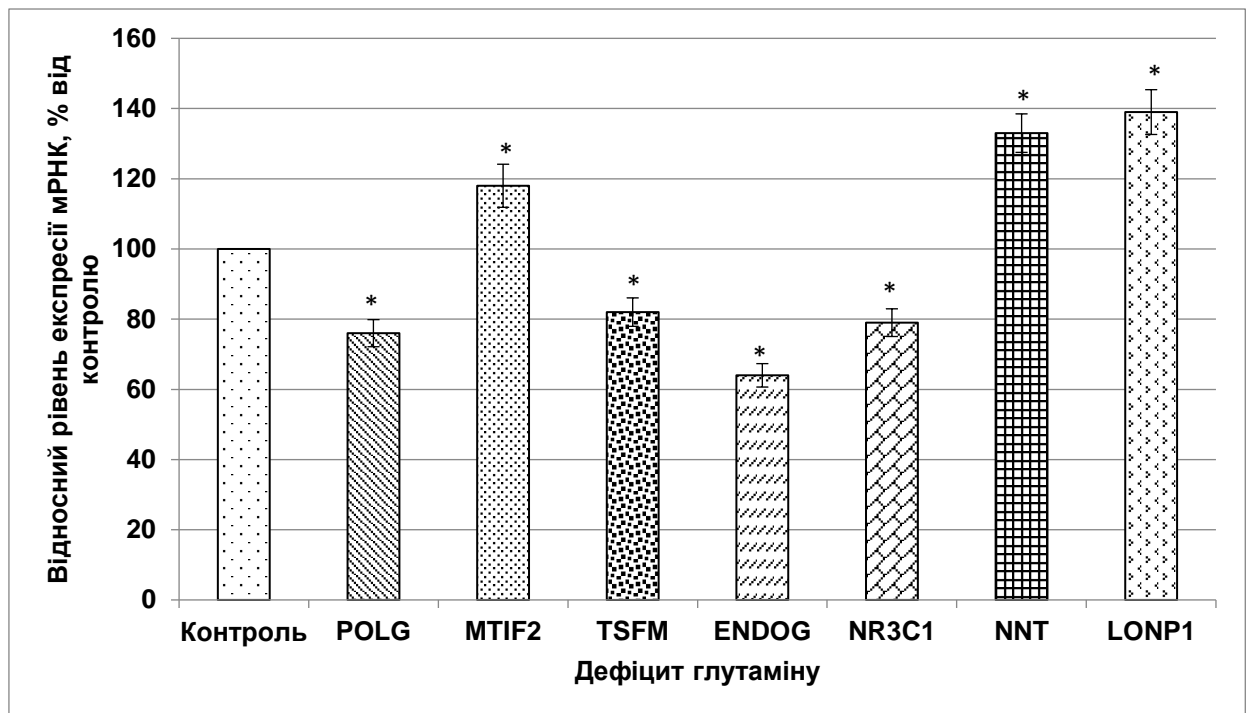


Рис. 3.39. Ефект дефіциту глютаміну на експресію мРНК *POLG*, *MTIF2*, *TSMF*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором рсDNA3.1 (Контроль). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. n = 3. * - p<0,05 у порівнянні з контролем.

На Рис 3.40 показано, що інгібування обох ензиматичних активностей сенсорно-сигнального ензиму IRE1 вимикало вплив дефіциту глютаміну у середовищі на експресію гена *POLG*, значно посилювало ефект відсутності глютаміну на експресію гена *MTIF2* (+18 % в контрольних клітинах і +96 % - в dnIRE1-клітинах) та *LONP1* (+39 % і +59 %, відповідно) і навпаки, деякою мірою послаблювало – на експресію мРНК *ENDOG* (-36 % і -16 %) та *NNT*

(+33 % і +18 %). В той же час, блокада IRE1 змінювала напрямок змін експресії мРНК *TSMF* (-18 % в контрольних клітинах і +26 % - в dnIRE1-клітинах) і *NR3C1* (-21 % і +14 %) за умов дефіциту глутаміну.

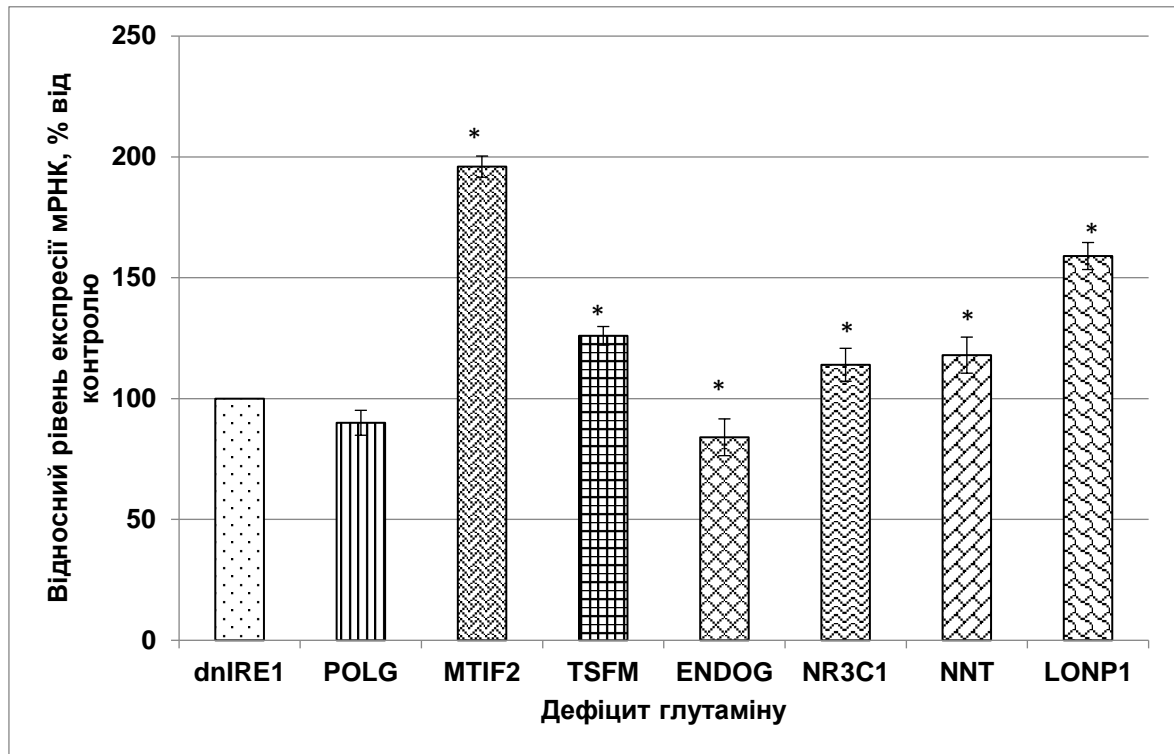


Рис. 3.40. Ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *POLG*, *MTIF2*, *TSMF*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Отже, експресія генів *MTIF2*, *NNT* та *LONP1* була чутливою до умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми, а виключення функціональної активності IRE1 модифікувало ефект відсутності глюкози у середовищі на експресію цих генів. Крім того, експресія усіх досліджених генів була залежною від дефіциту глутаміну у контрольних клітинах гліоми, тоді як блокада

ензиматичних активностей IRE1 модифікувала зміни в експресії цих генів за даних експериментальних умов.

3.5. Експресія ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси апоптозу, в клітинах гліоми з пригніченою функцією сигнального ензиму IRE1, а також за умов гіпоксії в залежності від функціонування IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума

На Рис. 3.41 – 3.44 наведені результати досліджень експресії генів *AIFM1*, *FAM162A*, *ATG7* та *TRADD*, що є залученими в різноманітні шляхи апоптозу та автофагії, у клітинах гліоми лінії U87 із повним та частковим пригніченням функції IRE1, а також за умов індукції стресу EP тунікамідіном у *dnrIRE1*-клітинах гліоми.

Було показано, що виключення обох ензиматичних активностей IRE1 призводить до значного зниження рівня експресії мРНК про-апоптичного протеїну *AIFM1* (- 56 %), тоді як блокада лише ендорибонуклеази IRE1 не призводила до суттєвих змін в експресії даного гена. Дія тунікамідіну на клітини гліоми із виключеною ендорибонуклеазною активністю посилювала експресію мРНК *AIFM1* на 36 % (*dnrIRE1+t* у порівнянні з *dnrIRE1* на Рис. 3.41). Таким чином, стрес-залежна регуляція експресії *AIFM1* опосередкована, головним чином, протеїнкіназною активністю IRE1 та, в деякій мірі, функціонуванням інших систем стресу ендоплазматичного ретикулума.

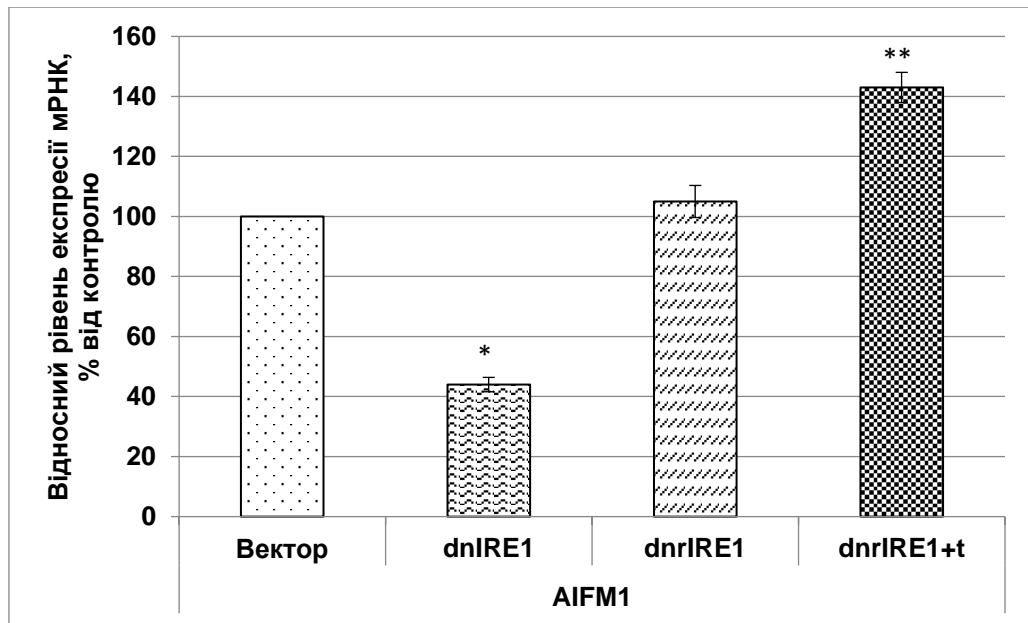


Рис. 3.41. Відносний рівень експресії мРНК *AIFM1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnrIRE1+t). Значення експресії *AIFM1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; n = 3, * - P < 0,05 у порівнянні з контролем (Вектор), ** - P < 0,05 у порівнянні з dnrIRE1.

Рівень експресії мРНК FAM162A, що є HIF- та естроген-залежним про-апоптичним фактором, зростає майже в 3 рази у клітинах гліоми з повним пригніченням функції IRE1, тоді як виключення лише ендорибонуклеази IRE1 посилювало експресію мРНК FAM162A лише на 50%. В той же час, за умов індукції стресу ЕР тунікаміцином спостерігали зниження експресії даного гена (-32 %, Рис. 3.42) Отримані результати свідчать про те, що стрес-залежна регуляція експресії гена FAM162A опосередкована як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активністю сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також іншими сигнальними системами стресу ЕР.

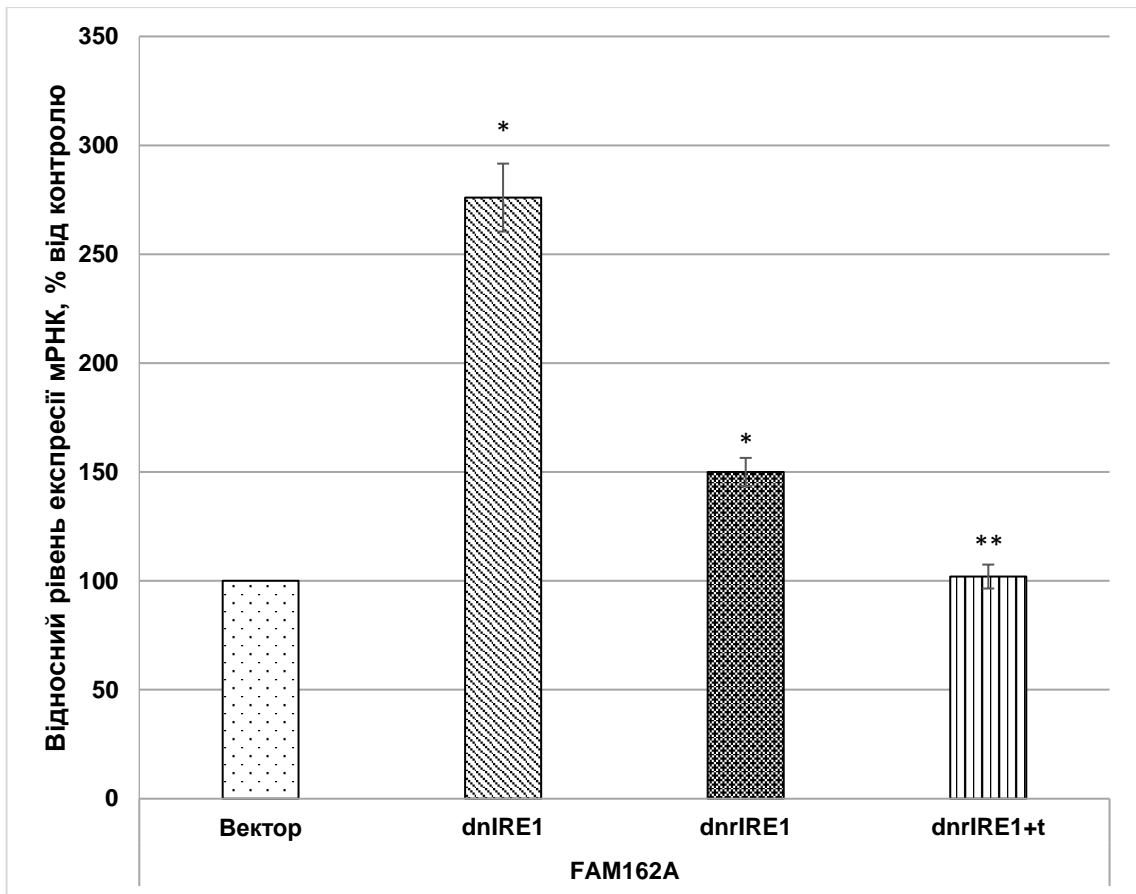


Рис. 3.42. Відносний рівень експресії мРНК *FAM162A* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулума тунікамідіном (dnrIRE1+t). Значення експресії *FAM162A* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 %; $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (Вектор), ** - $P < 0,05$ у порівнянні з dnrIRE1.

Встановлено, що повне пригнічення IRE1 знижувало рівень експресії мРНК *TRADD* вдвічі у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (Рис. 3.43). У випадку виключення лише ендорибонуклеазної активності IRE1 експресія цього гена також пригнічувалась, але меншою мірою (-33 %), що вказує на провідну роль ендорибонуклеази IRE1 у регуляції функції даного гена за фізіологічних умов. В той же час, індукція стресу тунікамідіном змінювала напрямок змін експресії мРНК *TRADD* у dnrIRE1-клітинах гліоми, підсилюючи

її на 90 %, що може свідчити про участь протеїнкіназної активності IRE1 та інших сигнальних мереж у регуляції експресії даного гена за умов стресу ER.

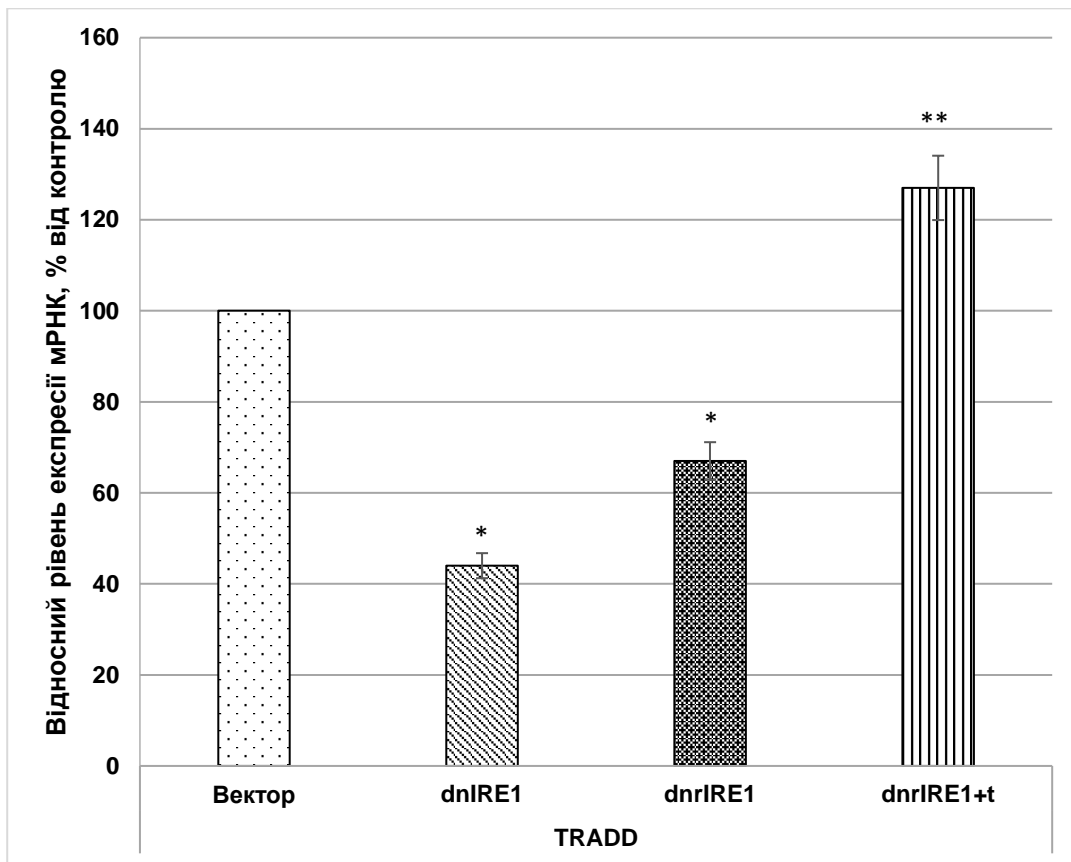


Рис. 3.43. Відносний рівень експресії мРНК *TRADD* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікамідіном (dnrIRE1+t). Значення експресії *TRADD* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). n = 3, * - P < 0,05 у порівнянні з контролем, ** - P < 0,05 у порівнянні з dnIRE1.

На Рис. 3.44 показано, що експресія мРНК протеїну 7, пов'язаного з автофагією (ATG7) знижувалась на 56 % у клітинах гліоми із повною блокадою IRE1 у порівнянні з контрольними клітинами гліоми, що експресували функціонально активний ензим IRE1. Схожі зміни експресії мРНК *ATG7* спостерігали у клітинах гліоми з частковим пригніченням IRE1 (-35 %), що

свідчить про важливу роль ендорибонуклеази IRE1 у регуляції функції гена *ATG7*. Дія тунікаміцину на *dnIRE1*-клітини не змінювала рівень експресії даного гена (*dnIRE1+t* у порівнянні з *dnIRE1* на Рис. 3.44).

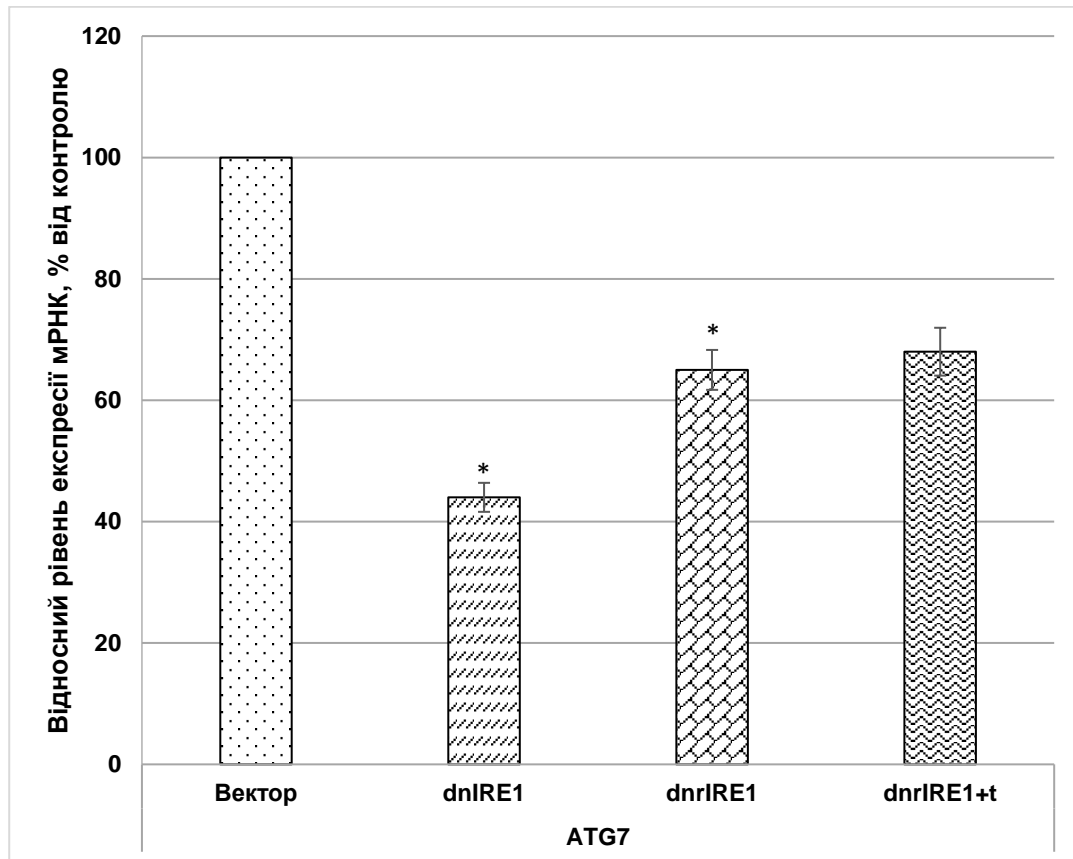


Рис. 3.44. Відносний рівень експресії мРНК *ATG7* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і сублініях клітин гліоми з повним (*dnIRE1*) та частковим (*dnIRE1*) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (*dnIRE1+t*). Значення експресії *ATG7* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали у відсотках від контролю, прийнятого за 100 % (Вектор). $n = 3$, * - $P < 0,05$ у порівнянні з контролем.

Біоінформаційний аналіз 3'-последовностей мРНК ядерних генів, що кодують фактори, залучені в різноманітні шляхи апоптозу, виявив сайти зв'язування мікроРНК miR-588, miR-361-3p та miR-107 у последовностях мРНК *ATG7* та *TRADD* (Рис. 3.45).

Position 149-155 of ATG7 3' UTR	5' ...CUCUGCUGCCCAGGAGUGGCCAG...
hsa-miR-588	3' CAAGAUUGGGUAA-CACCGGUU
Position 162-168 of TRADD 3' UTR	5' ...CCAGGAGCCAGACCACUGGGGGU...
hsa-miR-361-3p	3' UUUAGUCUUAGUGUGGACCCCCU
Position 340-346 of TRADD 3' UTR	5' ...GGACUUCAUCCUGGG---UGCUGCAG...
hsa-miR-107	3' ACUAUCGGGACAUGUUACGACGA

Рис. 3.45. Сайти зв'язування мікроРНК miR-588, miR-361-3p та miR-107 в 3'-послідовностях мРНК *ATG7* та *TRADD*.

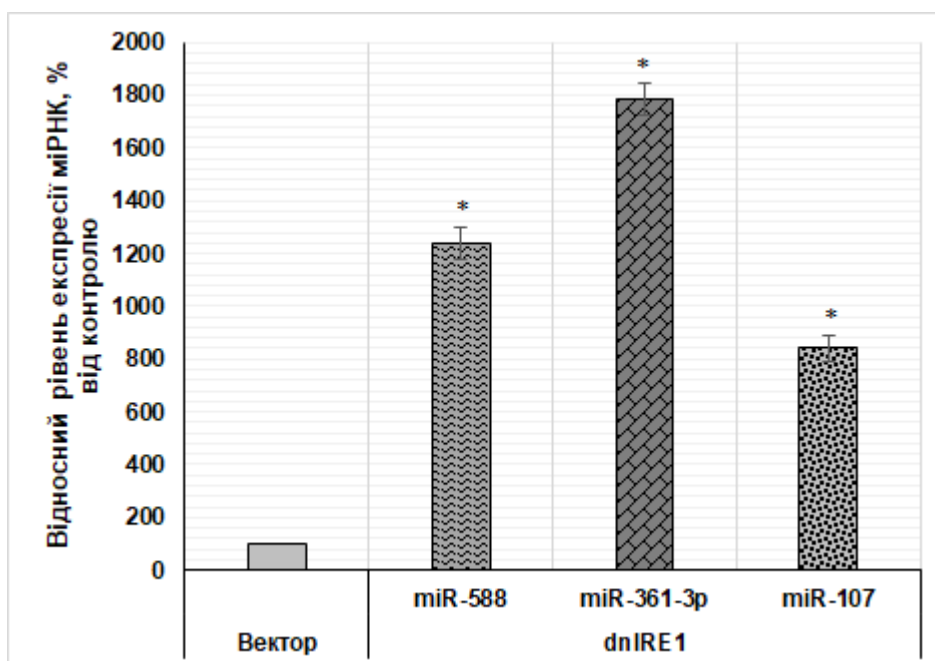


Рис. 3.46. Рівень експресії мікроРНК miR-588, miR-361-3p та miR-107 у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (Контроль), та у сублінії цих клітин з пригніченою за допомогою домінант-негативної конструкції IRE1 обох ензиматичних активностей IRE1 (dnIRE1). Інтенсивність експресії мікроРНК нормалізували по рівню експресії мРНК GAPDH та RNU6 РНК і виражали в % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %; n = 3.

Показано, що рівень мікроРНК miR-588, miR-361-3p та miR-107 у клітинах з пригніченим IRE1 значно зростає у порівнянні з контрольними

клітинами гліоми. Оскільки зниження рівня експресії мРНК *ATG7* і *TRADD* супроводжується посиленням експресії даних мікроРНК, можна зробити висновок про можливість регуляції експресії даних генів на пост-транскрипційному рівні (Рис. 3.46).

Наступна серія досліджень була присвячена вивченню ефекту гіпоксії на експресію ядерних генів мітохондріальних протеїнів, що контролюють процеси апоптозу, у клітинах гліоми в залежності від функціонування IRE1-залежного шляху стресу ER (Рис. 3.47-3.51).

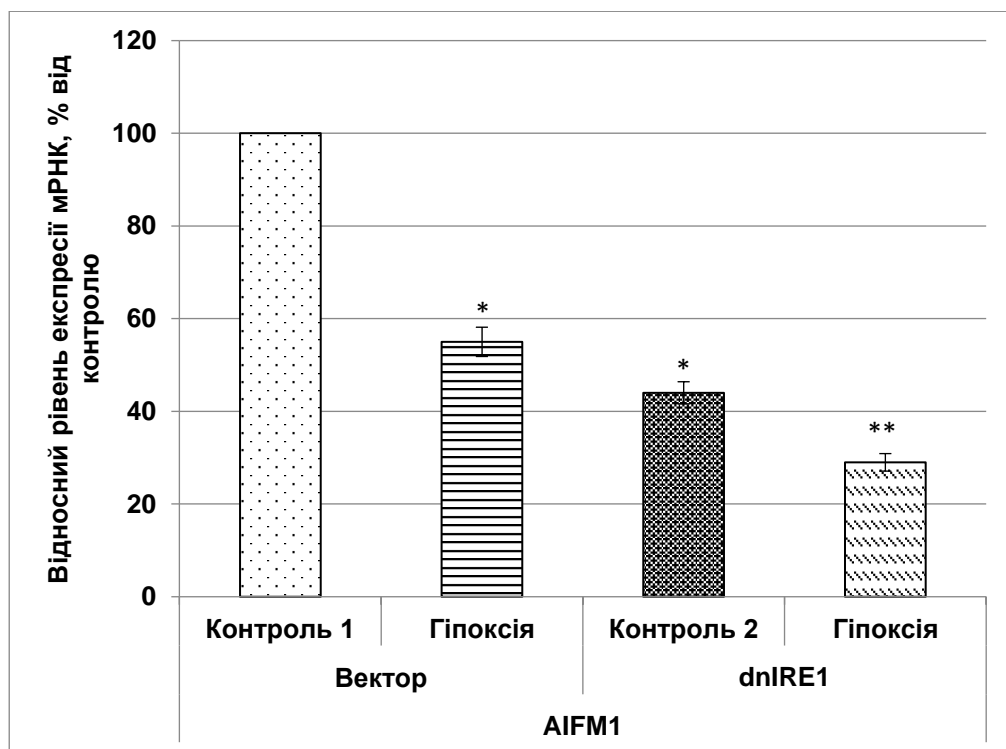


Рис. 3.47. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *AIFM1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *AIFM1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Було встановлено, що експресія мРНК *AIFM1*, що індукує процес апоптозу, суттєво пригнічується (-45%) за умов гіпоксії у контрольних клітинах гліоми. Крім того, гіпоксія також знижувала рівень експресії мРНК даного гена (-34%) в клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю IRE1. Таким чином, інгібування IRE1 в незначній мірі знижує вплив гіпоксії на експресію гена *AIFM1* у клітинах гліоми лінії U87 (Рис. 3.47).

За умов гіпоксії рівень експресії мРНК *FAM162A* зростав у 4 рази в контрольних клітинах гліоми, в той час як виключення функції сигнального ензиму IRE1 послаблювало ефект гіпоксії на експресію цього гена (+108 % у порівнянні з Контролем 2) (Рис. 3.48).

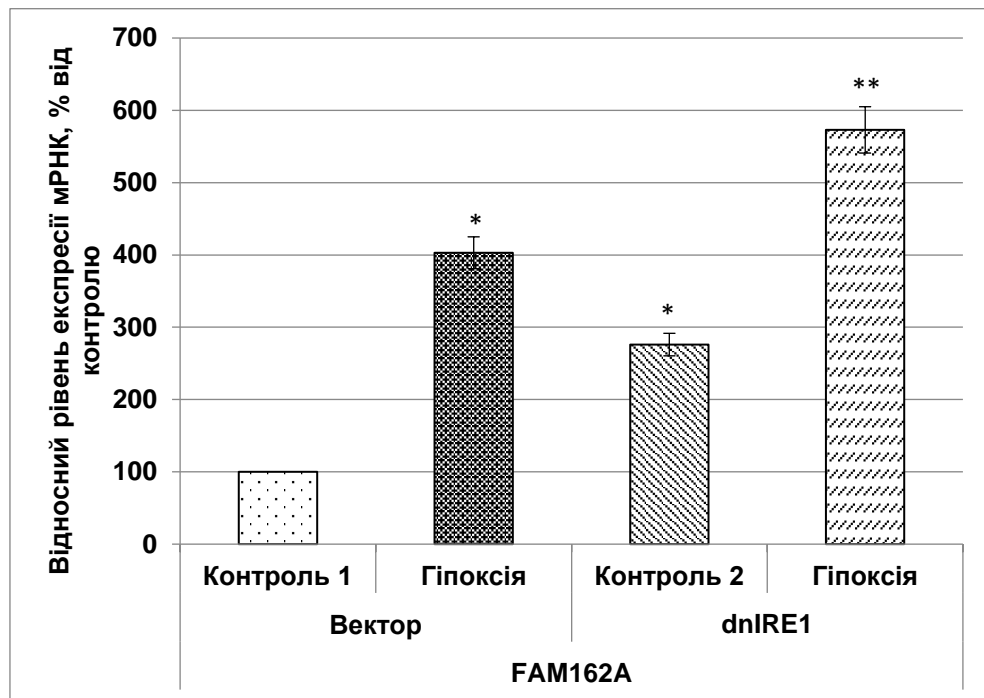


Рис. 3.48. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *FAM162A* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *FAM162A* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

На Рис. 3.49 показано, що гіпоксія у середовищі призводила до незначного підвищення рівня експресії мРНК адапторного протеїну TRADD у контрольних клітинах гліоми. Разом з тим, виключення функціональної активності IRE1 посилювало вплив гіпоксії на експресію даного гена (+23 % - у контрольних клітинах та +30 % - у dnIRE1-клітинах).

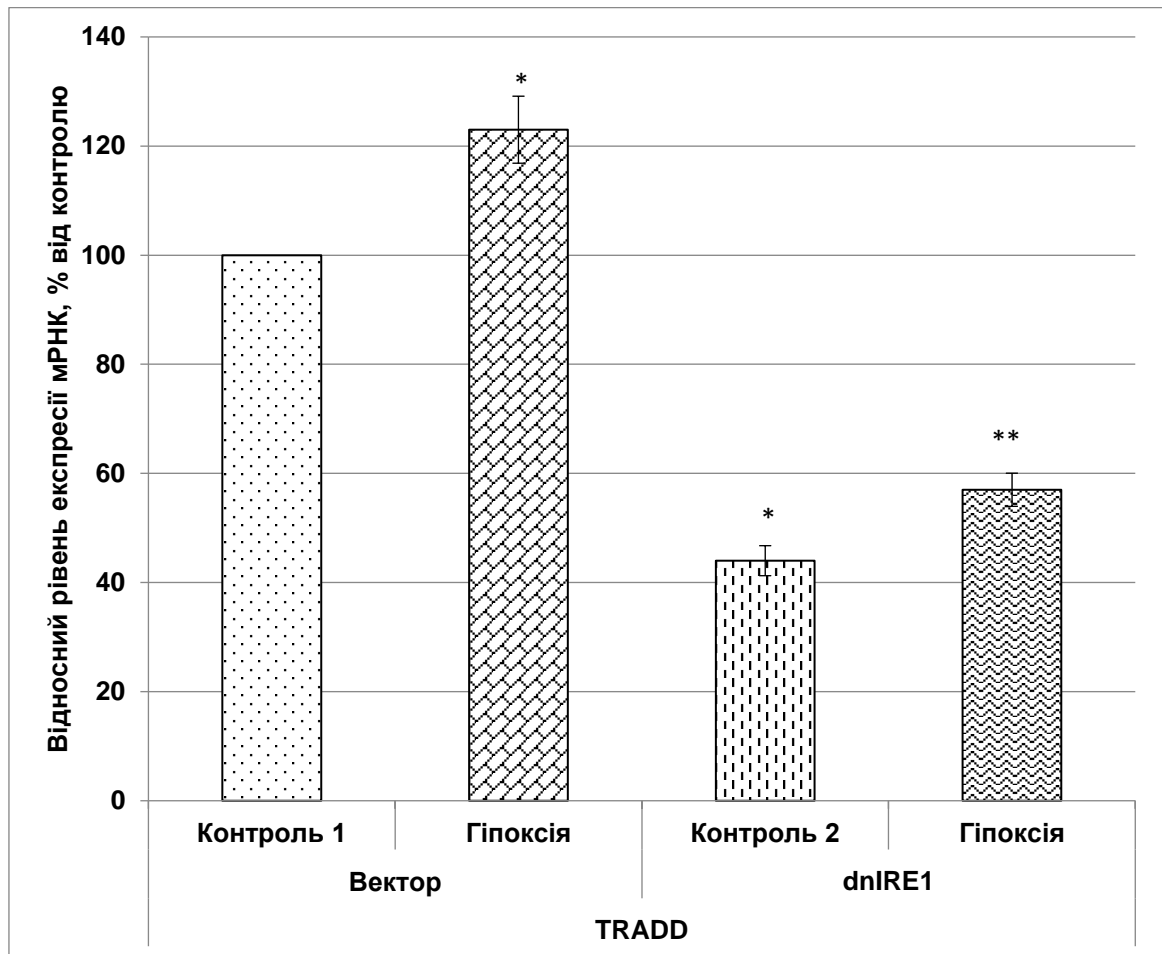


Рис. 3.49. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *TRADD* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *TRADD* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Показано, що гіпоксія призводила до зниження рівня експресії мРНК *ATG7* у контрольних клітинах гліоми (-35% у порівнянні з Контролем 1), а виключення функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1 в незначній мірі зменшувало вплив гіпоксії у середовищі (-25% у порівнянні з Контролем 2) на експресію даного гена (Рис. 3.50).

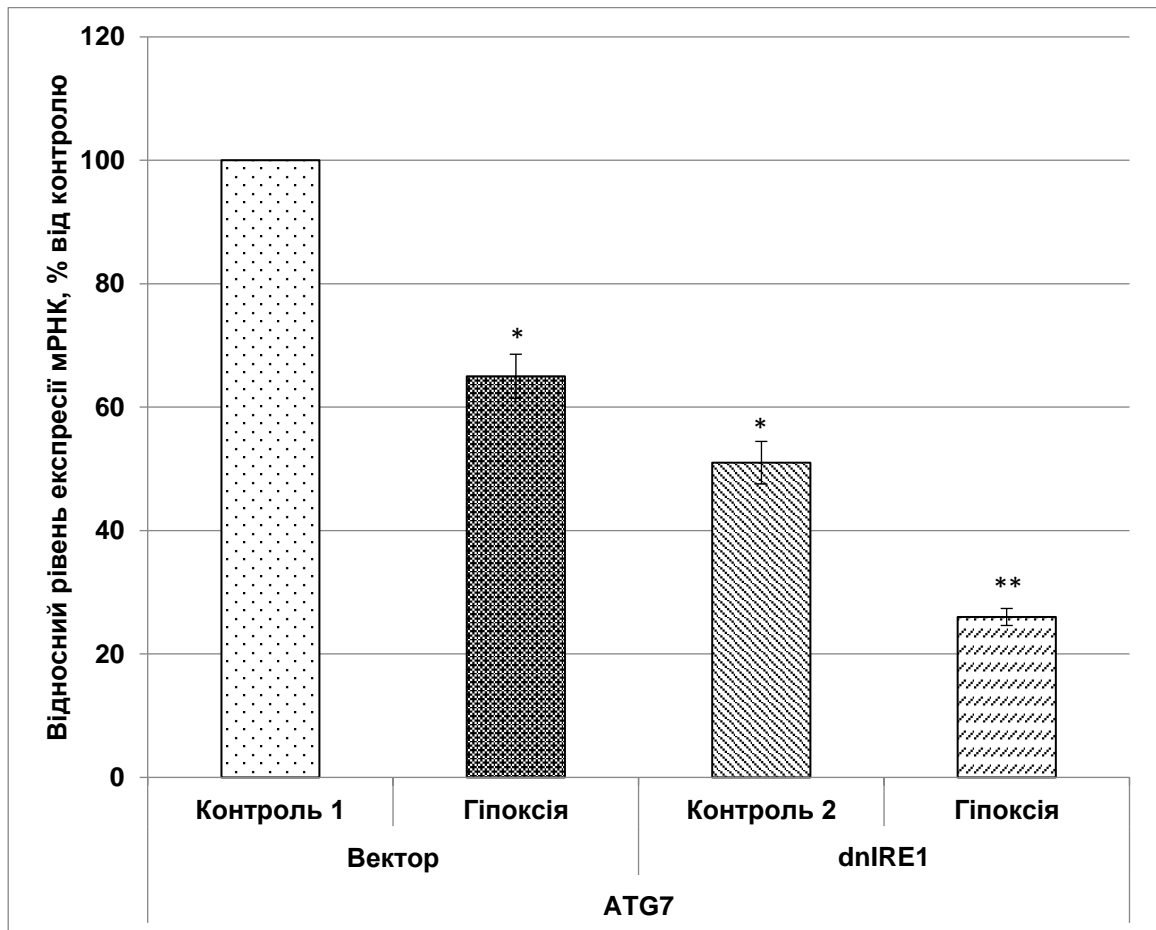


Рис. 3.50. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *ATG7* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та сублінії цих клітин з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму (dnIRE1). Значення експресії *ATG7* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100% (Контроль 1). $n = 3$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з Контролем 1 (Вектор); ** – $p < 0,05$ порівняно з Контролем 2 (клітини, стабільно трансфіковані кДНК-конструкцією dnIRE1).

Результати вестерн-блот аналізу рівня протеїну ATG7 у клітинах гліоми лінії U87 повністю узгоджуються із наведеними вище даними рівня мРНК, отриманими за допомогою кількісної полімеразної реакції в реальному часі (Рис. 3.51).

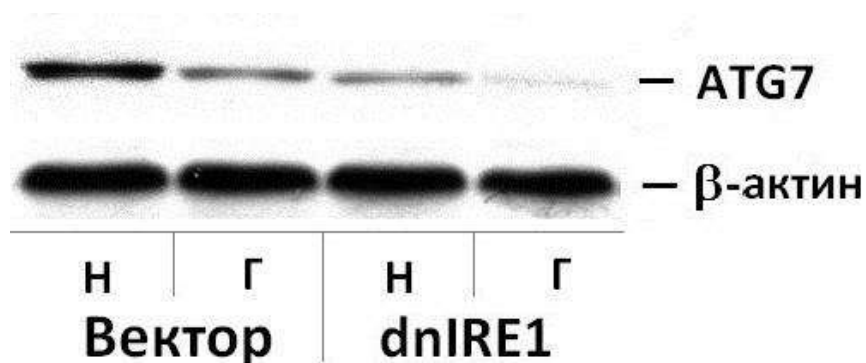


Рис. 3.51. Вплив гіпоксії на експресію протеїну ATG7 у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Вектор), та сублінії цих клітин із пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1, стабільно трансфікованої домінант-негативною конструкцією (dnIRE1), визначений з допомогою вестерн-блот аналізу. Н – контроль (нормоксія), Г – умови гіпоксії. Визначення бета-актину (β-актин) слугувало контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

Таким чином, експресія ядерних генів *AIFM1*, *TRADD* та *ATG7*, залучених у регуляцію процесів апоптозу та автофагії, є залежною від функціональної активності IRE1-сигнального шляху стресу ER та умов гіпоксії, що є облігатним фактором росту пухлин, причому пригнічення обох ензиматичних активностей модифікує вплив дефіциту кисню у середовищі на експресію даних генів.

3.6. Експресія ядерних генів факторів мітохондрій, що контролюють процеси апоптозу, в клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози і глутаміну в залежності від функції IRE1

Результати досліджень, що стосуються впливу дефіциту глюкози та глутаміну на експресію ядерно-кодованих мітохондріальних протеїнів AIFM1, FAM162A, TRADD та ATG7, що контролюють апоптоз та автофагію, у клітинах гліоми в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1 представлені на Рис. 3.52-3.55 .

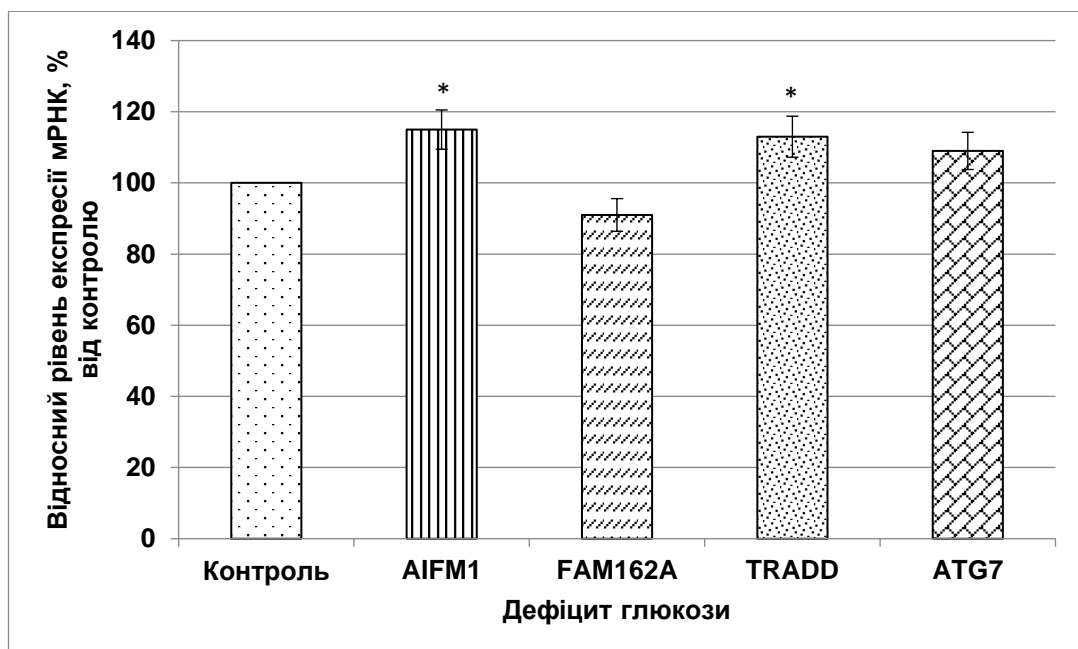


Рис. 3.52. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pCDNA3.1 (Контроль). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. n = 3. * - p<0,05 у порівнянні з контролем.

Нами було встановлено, що дефіцит глюкози викликав невелике, але статистично значиме збільшення рівня експресії мРНК *AIFM1* (+15 %) та *TRADD* (+13 %) у контрольних клітинах гліоми, стабільно трансфікованих

порожнім вектором рсDNA3.1. У той же час, експресія генів *FAM162A* та *ATG7* була резистентною до умов відсутності глюкози у середовищі в клітинах гліоми, що експресували функціонально активний ензим IRE1 (Рис. 3.52).

Виключення обох ензиматичних активностей IRE1 модифікувало вплив дефіциту глюкози на експресію досліджених генів, пов'язаних із апоптозом і автофагією, наступним чином: посилювало ефект відсутності глюкози на експресію мРНК *AIFM1* (+15 % в контрольних клітинах та +84 % - у dnIRE1-клітинах) і *TRADD* (+13 % та +34 %, відповідно) та індукувало чутливість експресії генів *FAM162A* і *ATG7* до цих умов культивування клітин, знижуючи їх рівень експресії відповідно на 29% та 14 % у порівнянні з контрольними клітинами гліоми (Рис. 3.53).

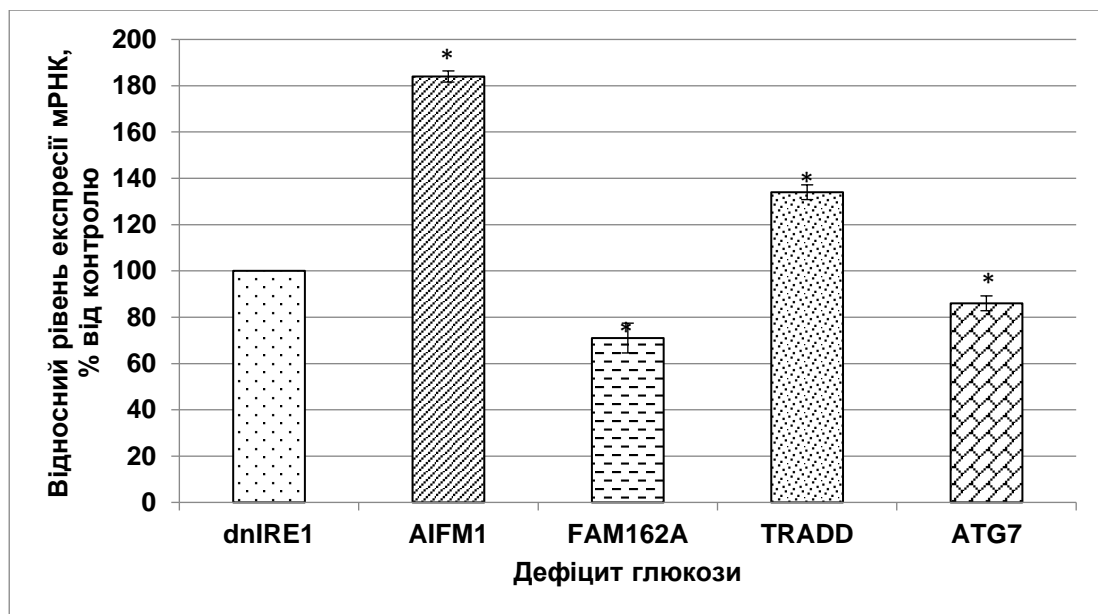


Рис. 3.53. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. n = 3. * - p < 0,05 у порівнянні з контролем (dnIRE1).

Було встановлено, що дефіцит глутаміну у середовищі призводив до незначного зниження рівня експресії мРНК *FAM162A* (-21 %) і *ATG7* (-19 %) у контрольних клітинах гліоми та істотно не впливав на рівень експресії генів *AIFM1* і *TRADD* у цих клітинах (Рис. 3.54).

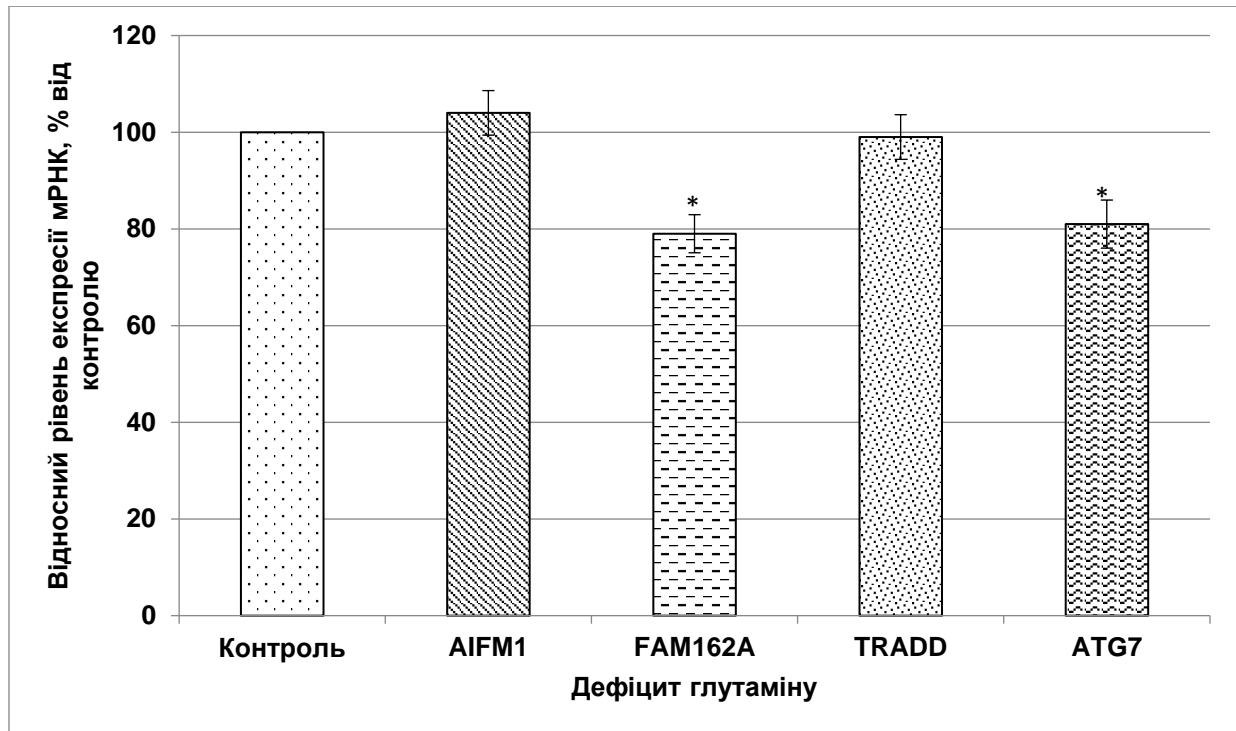


Рис. 3.54. Ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* у контрольних клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Контроль). Значення рівня експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

З даних, наведених на Рис. 3.55, видно, що повна блокада функції IRE1 вмикала чутливість експресії генів *AIFM1* та *TRADD* до умов дефіциту глутаміну, підвищуючи її рівень на 70 % і 32 % відповідно, та посилювала ефект відсутності глутаміну на експресію мРНК *FAM162A* (-21% - у контрольних клітинах і -60 % - у dnIRE1-клітинах). Разом з тим, експресія мРНК гена *ATG7* змінювалася схожим чином в обох типах клітин гліоми за цих експериментальних умов (-19 % та -22 %).

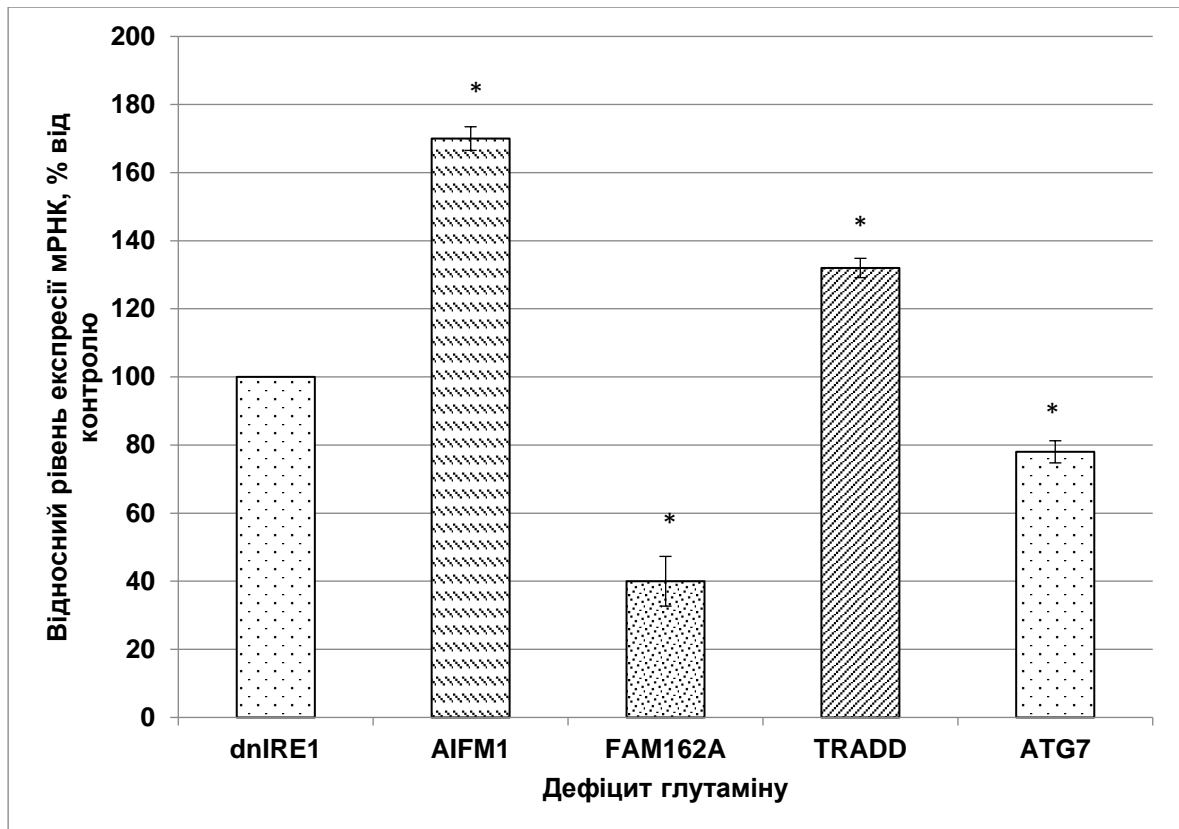


Рис. 3.55. Ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* у клітинах гліоми лінії U87 з повним пригніченням функціональної активності сигнального ензиму IRE1 за допомогою домінант-негативної конструкції кДНК-конструкції (dnIRE1). Значення рівня експресії генів нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятого за 100%. $n = 3$. * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем (dnIRE1).

Таким чином, нами було продемонстровано наявність різної чутливості експресії генів *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* до умов дефіциту глюкози або глутаміну у середовищі, а також її залежність від функціональної активності IRE1-залежного шляху стресу ER.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції експресії ядерних генів локалізованих у мітохондріях протеїнів

Біфункціональний трансмембранний ензим IRE1 виступає ключовим модулятором злоякісного росту, оскільки є залученим у тотальне репрограмування функціонального стану пухлинних клітин, що охоплює біоенергетичні та біосинтетичні процеси, клітинну трансформацію, проліферацію, епітеліально-мезенхімальний перехід, метастазування, васкуляризацію, а також розвиток імунно- та хеморезистентності [10, 209, 229].

Таке перепрограмування геному реалізується, зокрема, через транскрипційний фактор XBP1, який активується ендорибонуклеазою IRE1 та регулює експресію сотень генів, залучених у процеси трансляції, фолдингу, а також ER-залежної деградації неправильно згорнутих протеїнів, що в результаті сприяє зниженню протеїнового навантаження та виходу клітини зі стану стресу ER [224, 225]. Численні гени, що кодують мітохондріальні протеїни, також є цільовими мішенями для XBP1-опосередкованого транскрипційного репрограмування, що вказує на участь мітохондрій у відповіді на стрес ER [20]. Дані гени-мішені кодують компоненти дихального ланцюга та фактори, що відповідають за його формування, а також гем- та O₂-залежний транскрипційний фактор Hnf1 [241]. Інші мішені UPR беруть участь у антиоксидантному захисті та мітохондріальному контролі якості протеїнів [20, 243, 244].

Ще одним механізмом IRE1-залежної регуляції клітинного гомеостазу, опосередкованим ендорибонуклеазною активністю IRE1, виступає шлях RIDD - IRE1-залежної деградації, який контролює стабільність численних мРНК та

мікроРНК, що виконують регуляторну роль у метаболізмі глюкози, розвитку запальних процесів та клітинній загибелі [227].

Хронічна активація систем стресу ER є характерною рисою багатьох злоякісних пухлин, в тому числі і гліом, забезпечуючи швидку проліферацію, активний ріст та виживання пухлинних клітин навіть в екстремальних умовах мікрооточення [13]. Тісний взаємозв'язок між IRE1 та процесами проліферації та злоякісного росту був також показаний рядом досліджень, в яких зміна активності IRE1 за допомогою технології домінант-негативних кДНК-конструкцій, призводила до суттєвого зниження інтенсивності росту гліоми через активацію експресії генів про-апоптичних факторів і пухлинних супресорів та пригнічення – про-проліферативних та про-ангіогенних генів [15, 16, 249].

Важливо зазначити, що сигнальний шлях IRE1 тісно взаємопов'язаний з іншими системами стресу ER – ATF6 та PERK, що підтверджується спільною регуляцією цими сигнальними мережами важливих транскрипційних факторів CHOP, FOXO1 та XBP1 [14, 221]. Більше того, усі ці сигнальні шляхи перебувають під контролем специфічних протеїнкіназ та регуляторних факторів [250, 251], що демонструє надзвичайну складність молекулярних механізмів, які лежать в основі інтегральної відповіді на стрес ER.

Нами було показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 змінювало рівень експресії всіх досліджених ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій. Разом з тим, враховуючи комплексність механізмів стрес-залежного репрограмування геному клітини, в деяких випадках складно визначити конкретний спосіб, у який ці зміни відбуваються. У Табл. 4.1-4.3 представлений напрямок змін відносної експресії мРНК ядерних генів мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми з повним (dnIRE1) та частковим (dnrIRE1) пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1, а також за умов активації стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (dnrIRE1+t).

Таблиця 4.1

Зміни рівня експресії ядерних генів мітохондріальних ензимів трикарбонового циклу за умов повного та часткового пригнічення ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87

Гени	Контроль	dnIRE1	dnrIRE1	dnrIRE1+t
<i>ME2</i>	100 %	↓ (-60 %)	-	↑ (+29 %)
<i>MDH2</i>	100 %	↓ (-48 %)	-	↑ (+26 %)
<i>GOT2</i>	100 %	↓ (-38 %)	↑ (+72 %)	↑ (-18 %)
<i>IDH2</i>	100 %	↑ (+262 %)	-	↓ (-37 %)
<i>SDHB</i>	100 %	↓ (-32 %)	-	-
<i>SDHD</i>	100 %	↓ (-32 %)	↓ (-24 %)	↓ (-17 %)

Примітки: dnIRE1 – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1 – клітини гліоми із виключенням лише ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1+t – індукція стресу ER тунікаміцином у dnrIRE1-клітинах; Контроль – клітини гліоми, трансфіковані порожнім вектором; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Зниження рівня експресії мРНК малік-ензиму ME2 у клітинах гліоми із пригніченою функцією IRE1 цілком корелює із літературними даними, згідно з якими нокдаун цього ензиму знижує ріст пухлин *in vivo*, а інгібування його активності ембоною кислотою призводить до індукції клітинного старіння (Табл. 4.1) [95, 97]. Наступні два ензими – глутамат-оксалоацетат-трансаміназа GOT та малатдегідрогеназа MDH залучені у роботу малат-аспартатного шунта, що є постачальником цитозольного NADH до мітохондрій, необхідного для підтримання високої інтенсивності гліколітичного шляху і швидкої проліферації пухлинних клітин [98]. За умов блокади IRE1 у клітинах гліоми ми спостерігали суттєве пригнічення експресії мРНК *GOT2* та *MDH2*, що може свідчити про позитивну роль даних ензимів у розвитку клітин гліоми. Експресія мРНК субодиниць В і D сукцинатдегідрогеназного комплексу, мутації яких

було виявлено у багатьох типах солідних пухлин [93, 103], також знижувалась у клітинах гліоми із функціонально неактивним ензимом IRE1.

Таким чином, виключення IRE1 призводить до пригнічення експресії мРНК усіх ключових ензимів циклу Кребса, окрім IDH2, що корелює із даними про зниження інтенсивності росту гліом [15, 16], оскільки більшість цих генів надекспресуються або є мутантними у багатьох типах пухлин, а їх нокдаун пов'язаний із пригніченням процесів проліферації та індукцією різноманітних шляхів апоптозу [92, 96-98, 100, 106].

Мітохондріальна ізоцитратдегідрогеназа IDH2 відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті та клітинній диференціації, а її недостатність призводить до порушення функціонування мітохондрій та посиленої продукції активних форм кисню [91, 92]. Тому різке підвищення (майже втричі у порівнянні з контролем) рівня експресії гена *IDH2* у клітинах гліоми за умови блокади ензиму IRE1 цілком узгоджується з існуючими літературними даними.

Було встановлено, що повна блокада IRE1 у клітинах гліоми призводила до зниження рівня експресії мРНК генів, що кодують мітохондріальні фактори POLG, MTIF2 та TSFM, які контролюють функціональну активність мітохондріального геному, тим самим пригнічуючи процеси транскрипції та трансляції в цих органелах (Табл. 4.2). В той же час, цілком ймовірно, що посилення експресії ендонуклеази мітохондрій ENDOG, залученої у різноманітні шляхи апоптозу та ініціацію реплікації мтДНК [65, 66], у клітинах гліоми із виключеною активністю IRE1 може мати свій вклад у IRE1-залежному пригніченні росту пухлин гліоми.

Зростання експресії мРНК глюкокортикоїдного рецептора NR3C1 узгоджується з літературними даними про участь цього протеїну у зупинці росту та запуску апоптозу у клітинах В-лімфоми за дезоксаметазонової анти-пухлинної терапії [24, 70, 73]. Одночасне посилення експресії мРНК *NNT* має стимулювати активність глюкокортикоїдного рецептора, оскільки мутації даного гена призводять до розвитку глюкокортикоїдної недостатності [81].

Таблиця 4.2

Зміни рівня експресії ядерних генів мітохондріальних факторів, що контролюють процеси транскрипції та трансляції в мітохондріях, а також біоенергетику цих органел, за умов повного та часткового пригнічення ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87

Гени	Контроль	dnIRE1	dnrIRE1	dnrIRE1+t
<i>POLG</i>	100 %	↓ (-14 %)	-	-
<i>MTIF2</i>	100 %	↓ (-47 %)	↓ (-35 %)	-
<i>TSFM</i>	100 %	↓ (-47 %)	-	↓ (-31 %)
<i>ENDOG</i>	100 %	↑ (+98 %)	-	-
<i>NR3C1</i>	100 %	↑ (+50 %)	-	-
<i>NNT</i>	100 %	↑ (+64 %)	↓ (-52 %)	-
<i>LONP1</i>	100 %	↓ (-20 %)	-	↑ (+141 %)

Примітки: dnIRE1 – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1 – клітини гліоми із виключенням лише ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1+t – індукція стресу ER тунікаміцином у dnrIRE1-клітинах; Контроль – клітини гліоми, трансфіковані порожнім вектором; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Згідно з літературними даними [83, 90], пригнічення експресії мРНК *LONP1* у клітинах гліоми, що експресували функціонально неактивний ензим IRE1, може призводити до індукції клітинного старіння та активації шляхів апоптозу, сприяючи у такий спосіб IRE1-залежному інгібуванню росту гліом.

Дослідження експресії ядерно-кодованих генів протеїнів мітохондрій, що контролюють процеси апоптозу, у клітинах гліоми із виключеним шляхом стресу ER IRE1 встановили її гено-специфічну залежність від функціонування сигнального ензиму IRE1. Зокрема, зниження рівня мРНК апоптоз-індукуючого фактора AIFM1 корелює із літературними даними про його надекспресію у клітинах карциноми, а також про його роль у регуляції пухлинного росту через

активацію кінази JNK [54, 107]. В той же час різке зростання (майже в 3 рази) рівня експресії анти-проліферативного протеїну FAM162A у поєднанні з одночасним інгібуванням обох ензиматичних активностей IRE1 може відігравати вагомую роль у пригніченні процесів проліферації у клітинах гліом [108, 109].

Таблиця 4.3

Зміни рівня експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів, що контролюють процеси апоптозу та автофагії, за умов повного та часткового пригнічення ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87

Гени	Контроль	dnIRE1	dnrIRE1	dnrIRE1+t
<i>AIFM1</i>	100 %	↓ (-56 %)	-	↑ (+36 %)
<i>FAM162A</i>	100 %	↑ (+173 %)	↑ (+50 %)	↓ (-32 %)
<i>TRADD</i>	100 %	↓ (-56 %)	↓ (-33 %)	↑ (+90 %)
<i>ATG7</i>	100 %	↓ (-56 %)	↓ (-35 %)	-

Примітки: dnIRE1 – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1 – клітини гліоми із виключенням лише ендорибонуклеази IRE1; dnrIRE1+t – індукція стресу ЕР тунікаміцином у dnrIRE1-клітинах; Контроль – клітини гліоми, трансфіковані порожнім вектором; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Спостережене IRE1-залежне пригнічення експресії ще одного важливого про-апоптичного протеїну – TRADD, корелює із нещодавніми дослідженнями, які виявили, що нокдаун гена *TRADD* за допомогою мікроРНК призводив до значного зниження рівня відповідного протеїну, що викликало одночасне посилення апоптозу та негативну регуляцію клітинної прогресії у клітинах раку молочної залози [120]. Таким чином, зниження рівнів експресії *TRADD* може сприяти пригніченню клітинної проліферації та росту гліоми шляхом посилення процесів апоптозу та негативної регуляції клітинної прогресії.

Відомо, що нокдаун ATG7, важливого компонента машинерії автофагії, призводить до розвитку цитотоксичності та запуску апоптозу в пухлинних клітинах [111-114]. Тому зниження експресії мРНК цього гена у клітинах гліоми із блокадою IRE1 цілком узгоджується із цими даними.

Таким чином, отримані результати вперше продемонстрували наявність диференціального характеру змін експресії ядерних генів ключових мітохондріальних протеїнів у клітинах гліоми за різних умов пригнічення IRE1 і переконливо свідчать про роль досліджених генів у IRE1-залежній регуляції процесів проліферації та апоптозу шляхом репрограмування функціонального стану мітохондрій. Разом із тим, молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії цих генів є різними та опосередковані як ендорибонуклеазою IRE1, так і протеїнкіназою активністю цього сигнального ензиму, а у деяких випадках й іншими сигнальними системами стресу ендоплазматичного ретикулума.

4.2. Гіпоксична регуляція експресії генів локалізованих в мітохондріях протеїнів в залежності від функціональної активності сигнального ензиму IRE1

Гіпоксія є облігатною рисою гліобластом та їхнього мікрооточення, оскільки вона асоційована із проліферацією і ростом пухлин, прогресією та стійкістю до традиційної анти-ракової терапії. Зокрема, у тканинах гліобластом було виявлено обширні області гіпоксії, що сприяють посиленому ангиогенезу та скеровують гліомні клітини у бік більш агресивної та злоякісної поведінки [125].

Здатність пухлинних клітин адаптуватись до умов гіпоксії та виживання регулюється родиною транскрипційних факторів HIF, що індукуються гіпоксією. Гіпоксія через фактори HIF полегшує метастазування, сприяє утворенню рецидивів пухлин, підвищує стійкість до хемотерапії та опромінення, а також підтримує популяцію гліомних стовбурових клітин [124,

125]. Більше того, у клітинах гліобластом виявлено надекспресію великої групи генів, чутливих до гіпоксії, серед яких – фактор росту ендотелію судин VEGF, численні ензими гліколізу та гени, що кодують, важливі для підтримання внутрішньоклітинного, локального та системного гомеостазу протеїни [142].

Відомо, що IRE1-залежний шлях стресу ER також сприяє виживанню пухлинних клітин та їх адаптації до умов гіпоксії, зокрема через активацію важливого транскрипційного фактора XBP1 [252]. Зокрема, було показано, що виключення ензиматичних активностей IRE1 у клітинах гліоми призводило до пригнічення неоваскуляризації пухлини [16]. У зв'язку з цим, нами було досліджено вплив блокади IRE1 на гіпоксичну регуляцію експресії ядерних генів, що кодують мітохондріальні протеїни з різними функціями, у клітинах гліоми лінії U87.

Відомо, що пухлинні клітини підтримують свій метаболізм за рахунок аеробного гліколізу (явище, що отримало назву ефект Варбурга), що є менш енергетично вигідним, ніж окисне фосфорилування, але разом з тим забезпечує клітини пухлин усіма біосинтетичними молекулами, необхідними для швидкої проліферації і росту [6]. Разом з цим, пригнічення експресії генів, асоційованих із метаболізмом мітохондрій, було встановлено для багатьох типів пухлин та корелювало із поганим клінічним прогнозом і високою інвазивністю та міграцією пухлинних клітин [35]. Таким чином, спостережене зниження рівня експресії мРНК усіх ядерних генів, що кодують ензими циклу трикарбонових кислот, окрім *IDH2*, у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії цілком узгоджується із цими літературними даними (Табл. 4.4).

В той же час, виключення ензиматичних активностей IRE1 по-різному модифікувало вплив гіпоксії на експресію генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD*, що свідчить про наявність молекулярних механізмів гіпоксичної регуляції експресії даних генів, опосередкованих функціональною активністю сенсорно-сигнального ензиму IRE1. Зокрема, блокада IRE1 знімала ефект гіпоксії на експресію мРНК *MDH2* і *SDHD* та індукувала чутливість

експресії гена *IDH2* до цих умов, а також послаблювала вплив гіпоксії на експресію генів *ME2*, *GOT2* і *SDHB* (Табл. 4.4).

Табл. 4.4

Вплив гіпоксії на рівень експресії генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *IDH2*, *SDHB* та *SDHD* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1

Гени	U87*	dnIRE1**
Ключові ензими циклу трикарбонових кислот		
<i>ME2</i>	↓ (-40 %)	↓ (-22 %)
<i>MDH2</i>	↓ (-17 %)	-
<i>GOT2</i>	↓ (-46 %)	↓ (-35%)
<i>IDH2</i>	-	↓ (-50 %)
<i>SDHB</i>	↓ (-37 %)	↓ (-16 %)
<i>SDHD</i>	↓ (-14 %)	-

Примітки: U87 – контрольні клітини гліоми, стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1; dnIRE1-клітини – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; ↓ - рівень експресії знижується; * - у порівнянні з контрольними клітинами гліоми за нормоксії; ** - у порівнянні із dnIRE1-клітинами за нормоксії; $p < 0,05$ для всіх значень.

Наступна серія досліджень виявила, що гіпоксія по-різному впливала на експресію усіх ядерних генів, що кодують ензими та фактори, залучені у регуляцію транскрипції і трансляції в мітохондріях, а також беруть участь у підтримці біоенергетики в цих органелах, а саме: знижувала рівень мРНК *MTIF2* та *TSMF* і підвищувала – *POLG*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* (Табл. 4.5).

Табл. 4.5

Вплив гіпоксії на рівень експресії генів *POLG*, *MTIF2*, *TSFM*, *NR3C1*, *NNT* та *LONP1* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1

Гени	U87*	dnIRE1**
Фактори, що контролюють мітохондріальний геном та біоенергетику цих органел		
<i>POLG</i>	↑ (+15 %)	↑ (+32 %)
<i>MTIF2</i>	↓ (-21 %)	-
<i>TSFM</i>	↓ (-25 %)	-
<i>ENDOG</i>	↑ (+58 %)	↑ (+110 %)
<i>NR3C1</i>	↑ (+91 %)	↑ (+64 %)
<i>NNT</i>	↑ (+ 16 %)	↑ (+42 %)
<i>LONP1</i>	↑ (+ 52 %)	-

Примітки: U87 – контрольні клітини гліоми, стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1; dnIRE1-клітини – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; * - у порівнянні з контрольними клітинами гліоми за нормоксії; ** - у порівнянні із dnIRE1-клітинами за нормоксії; $p < 0,05$ для всіх значень.

Виключення функції IRE1 модифікувало гіпоксичний вплив на експресію усіх досліджених генів у гено-специфічний спосіб. Зокрема, блокада IRE1 усувала вплив гіпоксії на експресію генів *MTIF2*, *TSFM* та *LONP1*, послаблювала чутливість експресії мРНК *NR3C1* і, навпаки, посилювала – для генів *ENDOG* та *NNT*. Цікаво, що пригнічення IRE1 не лише посилює експресію мРНК про-апоптичної ендонуклеази *ENDOG* у 2 рази в порівнянні з контрольними клітинами гліоми, а й збільшує чутливість її експресії до умов гіпоксії, що може мати значення у IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації клітин гліоми (Табл. 4.5).

Табл. 4.6

Вплив гіпоксії на рівень експресії генів *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* та *ATG7* у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціонування сигнального ензиму IRE1

Гени	U87*	dnIRE1**
Фактори, залучені в регуляцію апоптозу та автофагії		
<i>AIFM1</i>	↓ (-45 %)	↓ (-34 %)
<i>FAM162A</i>	↑ (+303 %)	↑ (+107 %)
<i>TRADD</i>	↑ (+23 %)	↑ (+30 %)
<i>ATG7</i>	↓ (-35 %)	↓ (-49 %)

Примітки: U87 – контрольні клітини гліоми, стабільно трансфіковані вектором pcDNA3.1; dnIRE1-клітини – клітини гліоми із виключенням кінази та ендорибонуклеази IRE1; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; * - у порівнянні з контрольними клітинами гліоми за нормоксії; ** - у порівнянні із dnIRE1-клітинами за нормоксії; $p < 0,05$ для всіх значень.

Ми також дослідили вплив гіпоксії на експресію ядерних генів, що кодують мітохондріальні протеїни, пов'язані з апоптозом та автофагією у клітинах гліоми лінії U87 із пригніченою активністю ензиму IRE1 (Табл. 4.6). Отримані результати продемонстрували залежність експресії генів *AIFM1*, *FAM162A*, *TRADD* і *ATG7* від умов гіпоксії та функціонування IRE1-залежного шляху стресу ER, оскільки виключення обох ензиматичних активностей IRE1 модифікувало ефект дефіциту кисню на експресію даних генів.

Методом біоінформаційного аналізу вперше було виявлено, що послідовності A(G)CGTGG(C)/C(G)CACGC(T), які зв'язують транскрипційний фактор HIF, ідентифіковані у промоторних ділянках генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *SDHD*, *POLG*, *MTIF2*, *ENDOG*, *NR3C1* та *LONP*, водночас містили у своїй структурі сайти зв'язування XBP1 (CGTGG/CCACG). Спостережений феномен

ілюструє механізм кооперативної регуляції експресії частини ядерних генів, що кодують полі-функціональні протеїни мітохондрій, шляхом розпізнавання специфічних сайтів зв'язування різними транскрипційними факторами. Більше того, це явище пояснює залежність гіпоксичної регуляції від функціонування сигнального ензиму IRE1, ендорибонуклеазна активність якого відповідає за альтернативний сплайсинг мРНК ХВР1, що призводить до зсуву рамки зчитування та продукції стабільного і функціонально активного транскрипційного фактора ХВР1. Таким чином, більш виражені зміни в експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів, які спостерігали у контрольних клітинах гліоми за умов гіпоксії, можна пояснити спільною дією транскрипційних факторів HIF та ХВР1, а послаблення або виключення ефекту гіпоксії у клітинах гліоми із блокадою IRE1 – відсутністю транскрипційно активної форми ХВР1.

Отже, гіпоксія, що відіграє важливу роль у проліферації і рості злоякісних пухлин, змінює рівень експресії більшості ядерних генів, що кодують мітохондріальні протеїни, а виключення обох ензиматичних активностей IRE1 може по-різному, гено-специфічно, модифікувати ефект гіпоксії на експресію цих генів. Більше того, отримані результати свідчать про існування складної інтегральної мережі, що контролює гіпоксичну регуляцію експресії різних генів, в тому числі і через активацію IRE1-залежного шляху стресу ER.

4.3. Залежність експресії генів локалізованих у мітохондріях протеїнів від дефіциту глутаміну та глюкози контролюється сигнальним ензимом IRE1

Однією із загальноприйнятих метаболічних змін, яка слугує маркером злоякісного росту є підвищене споживання глюкози – основного джерела енергії і вуглецю для синтезу багатьох органічних речовин. Посилення аеробного гліколізу є виграшною стратегією пухлинних клітин, оскільки постачає більшу кількість вуглецевих інтермедіатів для біосинтезу нуклеотидів,

амінокислот та ліпідів, що дозволяє забезпечити високу швидкість проліферації та їх агресивну поведінку [160].

Ще однією характерною рисою пухлинних клітин є посилений глутаміноліз. Глутамін – це протеїногенна амінокислота, що забезпечує поповнення пулу інтермедіатів для циклу трикарбонових кислот та бере участь у біосинтезі багатьох органічних сполук, необхідних для проліферації та виживання пухлинних клітин. Так, багато пухлинних клітинних ліній, у тому числі і гліобластоми, демонструють феномен «глутамінової залежності» [253]. Дослідження Tardito et al. [254] показали, що проліферація гліобластоми за умов дефіциту глутаміну є залежною від синтезу глутаміну *de novo* за участі глутамінсинтетази, що забезпечує біосинтез пуринових нуклеотидів та підтримує ріст гліобластоми в разі відсутності екзогенного глутаміну.

Відомо, що абнормальна васкуляризація пухлинного мікрооточення призводить до порушення кровопостачання пухлини, що є головною причиною розвитку тривалої гіпоксії та дефіциту ключових поживних речовин – глюкози і глутаміну [255]. Такі екстремальні умови мікрооточення призводять до метаболічного репрограмування пухлинних клітин, що забезпечує їх виживання та адаптацію до цих несприятливих умов. У зв'язку з цим, дослідження пухлинної відповіді на дефіцитні стани розглядають в якості ефективного методу вивчення метаболічних шляхів, що є критичними для виживання пухлини [253].

Саме тому, в цій роботі ми дослідили вплив дефіциту глюкози і глутаміну на експресію ядерних генів протеїнів мітохондрій у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціонування сенсорно-сигнального ензиму IRE1. Результати наших досліджень продемонстрували, що ступінь чутливості експресії усіх вивчених генів, що кодують протеїни мітохондрій, до умов відсутності глутаміну та глюкози у середовищі значною мірою залежить від активності IRE1-залежного шляху стресу ER. Більше того, ефект дефіциту глюкози та глутаміну не зводив нанівець вплив пригнічення IRE1 на експресію усіх досліджених генів, окрім *MTIF2* та *LONP1*, у клітинах гліоми.

Зупинимось детальніше на найбільш цікавих результатах, що були отримані для генів *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* і *ATG7*. Показано, що експресія мРНК *IDH2* знижувалась як за умов дефіциту глюкози, так і за нестачі глутаміну в обох типах клітин гліоми, але у клітинах із блокадою IRE1 ефект дефіциту глутаміну на експресію цього гена був більш вираженим. Згідно з літературними даними, мітохондріальна ізоцитратдегідрогеназа відіграє важливу роль у захисті клітин від оксидативного стресу, а недостатність цього ензиму призводить до порушення функціонування мітохондрій та продукції високих рівнів АФК у пухлинних клітинах [101]. Більше того, значне посилення (в 2,5 рази) експресії мРНК *IDH2*, яке спостерігали у клітинах гліоми із пригніченим ензимом IRE1, корелює із інгібуванням росту цих клітин *in vivo* [16, 230] і, можливо, вносить свій вклад у цей процес.

Було встановлено, що експресія гена апоптичної ендонуклеази *ENDOG* не змінювалась за умов дефіциту глюкози та пригнічувалась – за нестачі глутаміну в обох типах клітин гліоми, причому блокада IRE1 зменшувала вплив дефіциту глутаміну на експресію даного гена. Різке зростання експресії *ENDOG*, викликане виключенням функції IRE1, може відігравати вагомую роль у IRE1-залежному пригніченні росту пухлин гліоми шляхом індукції різноманітних шляхів апоптозу [65, 66].

Разом з тим, пригнічення IRE1 модифікувало напрямок змін експресії гена *NR3C1* за умов дефіциту глутаміну, та деякою мірою послаблювало чутливість експресії мРНК *NNT* до цих умов. Водночас, відсутність глюкози не впливала на експресію гена глюкокортикоїдного рецептора в обох типах клітин гліоми, тоді як у випадку гена *NNT* блокада IRE1 усувала вплив дефіциту глюкози на експресію даного гена. Такі результати корелюють із літературними даними, згідно яких посилення експресії *NR3C1* індукує зупинку росту і запуск апоптозу в пухлинних клітинах [70, 73], а одночасне зростання експресії *NNT* має стимулювати активність глюкокортикоїдного рецептора [79].

У випадку гена *ATG7*, що є важливим компонентом машинерії автофагії, повна блокада IRE1 індукувала чутливість його експресії до умов дефіциту глюкози і посилювала ефект нестачі глютаміну на експресію мРНК *ATG7*, знижуючи її рівень в обох випадках. Відомо, що інгібування автофагії шляхом нокдауну *ATG7* призводило до розвитку цитотоксичності та індукції апоптозу в пухлинних клітинах [111-114]. У зв'язку з цим, пригнічення експресії *ATG7* у клітинах гліоми із виключеним IRE1 корелює із даними про зниження інтенсивності росту гліом за цих умов [15, 16].

Таким чином, нами було продемонстровано наявність різної чутливості експресії досліджених генів мітохондріальних ензимів та факторів, залучених у регуляцію важливих клітинних процесів, що включають біоенергетику, проліферацію та апоптоз, до умов дефіциту глюкози або глютаміну у клітинах гліоми, а також її виражену залежність від функціональної активності IRE1-залежного шляху стресу ER.

4.4. Можлива роль мітохондрій в опосередкованому IRE1 репрограмуванні клітин гліоми

Узагальнені результати досліджень експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів та їх роль у клітинному метаболізмі та важливих життєвих функціях схематично представлені на Рис. 4.1. Спостережені різнонапрямлені зміни в експресії досліджених генів переконливо свідчать про IRE1-залежне репрограмування функціонального стану мітохондрій, що вказує на можливу участь даних генів у пригніченні проліферації пухлинних клітин, опосередкованому активністю IRE1.

Було показано, що інгібування IRE1 знижує рівень експресії генів *POLG*, *MTIF* і *TSMF*, що контролюють функцію мітохондріального геному, тим самим пригнічуючи процеси транскрипції та трансляції в цих органелах. Експресія мРНК генів *ME2*, *MDH2*, *GOT2*, *SDHB* та *SDHD*, що кодують ключові ензими

трикарбонного циклу, також пригнічувалась, що вказує на зниження цього процесу в мітохондріях.

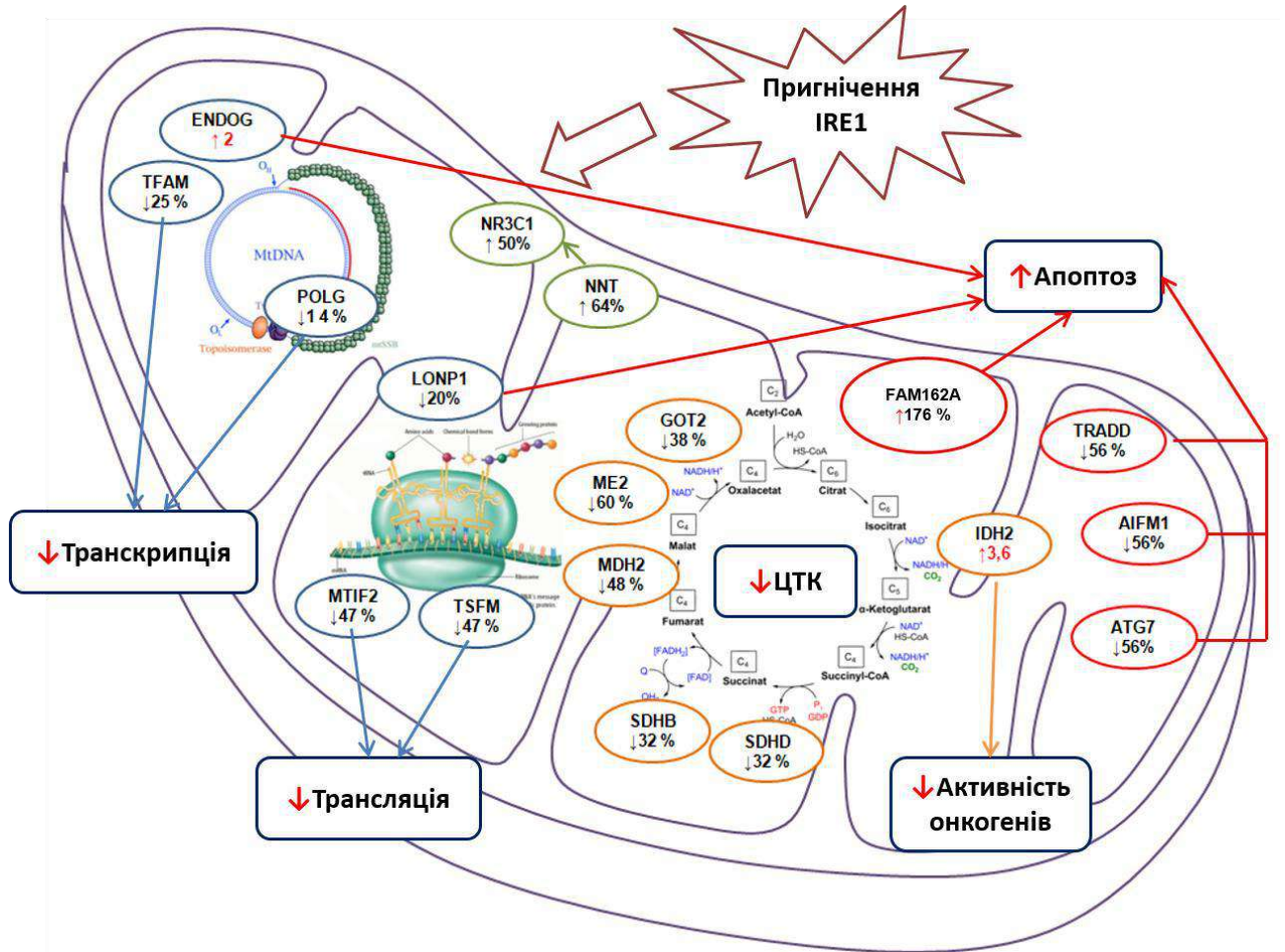


Рис. 4.1. Зміни в експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів, що відображають репрограмування функціонального стану мітохондрій за умов повного (як кінази, так і ендорибонуклеази) пригнічення ERN1, основного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума; ЦТК – цикл трикарбонних кислот, ↑ - зростання та ↓ - зниження рівня експресії мРНК досліджених генів.

З іншого боку, за умов пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 функція мітохондрій репрограмується в бік активації різних шляхів апоптозу. Такий висновок можна зробити, базуючись на аналізі спостережених змін рівня експресії про-апоптичних генів: зростання рівнів мРНК *ENDOG* і *FAM162A* та пригнічення - *AIFM1*, *ATG7* і *TRADD*, що корелює з існуючими літературними даними [56, 65, 114, 120]. Більше того, одночасне пригнічення експресії мРНК

LONP1 у клітинах гліоми, що експресували функціонально неактивний ензим IRE1, може призводити до індукції клітинного старіння та активації шляхів апоптозу [87, 90], сприяючи у такий спосіб IRE1-залежному інгібуванню росту гліом.

Цікавим є різке зростання (майже втричі у порівнянні з контролем) експресії мРНК мітохондріальної ізоцитратдегідрогенази *IDH2*, що окрім основної функції, пригнічує активність онкогенів, а також відіграє важливу роль у антиоксидантному захисті та регуляції клітинної диференціації [91, 92].

Посилення експресії глюкокортикоїдного рецептора NR3C1 узгоджується з літературними даними про участь цього протеїну у зупинці росту та запуску апоптозу у клітинах В-лімфоми за дезоксметазоновою анти-пухлинної терапії [70, 73]. Одночасне посилення експресії мРНК *NNT* має стимулювати активність глюкокортикоїдного рецептора, оскільки мутації даного гена призводять до розвитку глюкокортикоїдної недостатності [79].

Таким чином, вперше було виявлено диференційний характер змін відносного рівня експресії генів ключових мітохондріальних ензимів та факторів, що залучені до регуляції численних метаболічних шляхів, а також процесів проліферації та апоптозу, у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1, основного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз і експериментальне вирішення актуальної наукової проблеми щодо ролі деяких ядерних генів протеїнів мітохондрій, що відповідають за метаболічне репрограмування цих органел, у зниженні інтенсивності проліферації клітин гліоми за умови пригнічення функціональної активності IRE1, ключового медіатора відповіді на неправильно згорнуті протеїни. Отримані результати поглиблюють розуміння молекулярних механізмів пригнічення росту гліом, опосередкованого інгібуванням IRE1 та можуть бути використані для ідентифікації потенційних генів-мішеней для створення нових перспективних протипухлинних препаратів.

1. Встановлено, що за умов пригнічення функції IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 рівень експресії ядерних генів, що кодують ключові ензими мітохондрій та фактори, які контролюють мітохондріальний геном і процеси апоптозу, знижується у клітинах гліоми, тоді як експресія генів *IDH2*, *ENDOG*, *NR3C1*, *NNT* та *FAM162A* – зростає.

2. Показано, що зміни в експресії більшості ядерних генів, що кодують протеїни мітохондрій, опосередковані, головним чином, протеїнкіназною активністю IRE1, в той час як зниження експресії генів *SDHD*, *MTIF2* та *ATG7* за умови часткового пригнічення IRE1 вказує на важливу роль ендорибонуклеази IRE1 у стрес-залежній регуляції експресії цих генів.

3. Встановлено, що стрес-залежні механізми регуляції експресії генів *GOT2*, *TRADD*, *NNT* та *FAM162A* є більш складними та опосередковуються як протеїнкіназною, так і ендорибонуклеазною активностями ензиму IRE1.

4. Виявлено різні молекулярні механізми стрес-залежної регуляції експресії ядерних генів мітохондріальних протеїнів, що опосередковуються як кіназою, так і ендорибонуклеазою IRE1, а у випадку генів *GOT2*, *TRADD*, *FAM162A* та *NNT* – обома ензиматичними активностями IRE1, що вказує на

залежність функціональної активності мітохондрій від стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема сигнального ензиму IRE1.

5. Встановлено, що дефіцит кисню в середовищі змінює рівень експресії більшості ядерних генів, які кодують протеїни мітохондрій, а пригнічення функціональної активності IRE1 модифікує вплив гіпоксії на їх експресію.

6. Показано, що блокада активності IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 модифікує вплив дефіциту глюкози та глутаміну на експресію більшості досліджених генів, а це свідчить про IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму клітин і лежить в основі анти-проліферативного ефекту пригнічення IRE1.

7. Виявлено різноспрямований характер змін експресії ядерних генів, які кодують протеїни мітохондрій, у клітинах гліоми лінії U87 з виключеною функціональною активністю IRE1, що свідчить про IRE1-залежне репрограмування функціонального стану мітохондрій та вказує на можливу участь цих генів у пригніченні проліферації пухлинних клітин, опосередкованому активністю IRE1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. Vol. 131, N 6. P. 803-820.
2. Xu W., Li T., Gao L., et al. Efficacy and safety of long-term therapy for high-grade glioma with temozolomide: A meta-analysis. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, N 31. P. 51758-51765.
3. Tipping M., Eickhoff J., Ian Robins H. Clinical outcomes in recurrent glioblastoma with bevacizumab therapy: An analysis of the literature. *J Clin Neurosci.* 2017. Vol. 44. P. 101-106.
4. Schiera G., Di Liegro C.M., Di Liegro I. Molecular Determinants of Malignant Brain Cancers: From Intracellular Alterations to Invasion Mediated by Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* 2017. Vol. 18, N 12.
5. Masui K., Onizuka H., Cavenee W.K., et al. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology.* 2019. Vol. 39, N 1. P. 3-13.
6. Pavlova N.N., Thompson C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* 2016. Vol. 23, N 1. P. 27-47.
7. Obacz J., Avril T., Le Reste P.J., et al. Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci Signal.* 2017. Vol. 10, N 470.
8. Moon H.W., Han H.G., Jeon Y.J. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018. Vol. 19, N 10.
9. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011. Vol. 144, N 5. P. 646-74.
10. Chevet E., Hetz C., Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* 2015. Vol. 5, N 6. P. 586-97.
11. Onishi M., Ichikawa T., Kurozumi K., et al. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol.* 2011. Vol. 28, N 1. P. 13-24.

12. Parzych K., Saavedra-Garcia P., Valbuena G.N., et al. The coordinated action of VCP/p97 and GCN2 regulates cancer cell metabolism and proteostasis during nutrient limitation. *Oncogene*. 2019. Vol. 38, N 17. P. 3216-3231.
13. Wang M., Kaufman R.J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016. Vol. 529, N 7586. P. 326-35.
14. Almanza A., Carlesso A., Chinthia C., et al. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*. 2019. Vol. 286, N 2. P. 241-278.
15. Auf G., Jabouille A., Delugin M., et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1alpha and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*. 2013. Vol. 13. P. 597.
16. Auf G., Jabouille A., Guerit S., et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, N 35. P. 15553-8.
17. Logue S.E., McGrath E.P., Cleary P., et al. Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nat Commun*. 2018. Vol. 9, N 1. P. 3267.
18. Giannattasio S., Mirisola M.G., Mazzoni C. Editorial: Cell Stress, Metabolic Reprogramming, and Cancer. *Front Oncol*. 2018. Vol. 8. P. 236.
19. Picard M., Wallace D.C., Burelle Y. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 2016. Vol. 30. P. 105-16.
20. Knupp J., Arvan P., Chang A. Increased mitochondrial respiration promotes survival from endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2019. Vol. 26, N 3. P. 487-501.
21. Lipinski K.A., Barber L.J., Davies M.N., et al. Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer*. 2016. Vol. 2, N 1. P. 49-63.
22. Pertega-Gomes N., Felisbino S., Massie C.E., et al. A glycolytic phenotype is associated with prostate cancer progression and aggressiveness: a role for

- monocarboxylate transporters as metabolic targets for therapy. *J Pathol.* 2015. Vol. 236, N 4. P. 517-30.
23. Torrano V., Valcarcel-Jimenez L., Cortazar A.R., et al. The metabolic co-regulator PGC1alpha suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2016. Vol. 18, N 6. P. 645-656.
 24. Hakimi A.A., Reznik E., Lee C.H., et al. An Integrated Metabolic Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016. Vol. 29, N 1. P. 104-116.
 25. Kerr E.M., Gaude E., Turrell F.K., et al. Mutant Kras copy number defines metabolic reprogramming and therapeutic susceptibilities. *Nature.* 2016. Vol. 531, N 7592. P. 110-3.
 26. Zhao Y., Zeng X., Tang H., et al. Combination of metformin and paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis of human prostate cancer cells via oxidative stress and targeting the mitochondria-dependent pathway. *Oncol Lett.* 2019. Vol. 17, N 5. P. 4277-4284.
 27. Zong W.X., Rabinowitz J.D., White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.* 2016. Vol. 61, N 5. P. 667-676.
 28. Burke P.J. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends Cancer.* 2017. Vol. 3, N 12. P. 857-870.
 29. Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018. Vol. 500, N 1. P. 26-34.
 30. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. Vol. 460, N 1. P. 72-81.
 31. Valcarcel-Jimenez L., Gaude E., Torrano V., et al. Mitochondrial Metabolism: Yin and Yang for Tumor Progression. *Trends Endocrinol Metab.* 2017. Vol. 28, N 10. P. 748-757.
 32. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M.C. Mitochondria and Cancer. *Cell.* 2016. Vol. 166, N 3. P. 555-566.

33. Sullivan L.B., Gui D.Y., Vander Heiden M.G. Altered metabolite levels in cancer: implications for tumour biology and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016. Vol. 16, N 11. P. 680-693.
34. Mullen A.R., Hu Z., Shi X., et al. Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects. *Cell Rep*. 2014. Vol. 7, N 5. P. 1679-1690.
35. Nieto M.A., Huang R.Y., Jackson R.A., et al. Emt: 2016. *Cell*. 2016. Vol. 166, N 1. P. 21-45.
36. Loriot C., Burnichon N., Gadessaud N., et al. Epithelial to mesenchymal transition is activated in metastatic pheochromocytomas and paragangliomas caused by SDHB gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012. Vol. 97, N 6. P. E954-62.
37. Sciacovelli M., Goncalves E., Johnson T.I., et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*. 2016. Vol. 537, N 7621. P. 544-547.
38. Reznik E., Miller M.L., Senbabaoglu Y., et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife*. 2016. Vol. 5.
39. Joshi S., Tolkunov D., Aviv H., et al. The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis. *Cell Rep*. 2015. Vol. 13, N 9. P. 1895-908.
40. Guo J.Y., Teng X., Laddha S.V., et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev*. 2016. Vol. 30, N 15. P. 1704-17.
41. Jeon S.M., Chandel N.S., Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature*. 2012. Vol. 485, N 7400. P. 661-5.
42. Piskounova E., Agathocleous M., Murphy M.M., et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. 2015. Vol. 527, N 7577. P. 186-91.

43. Jiang L., Shestov A.A., Swain P., et al. Reductive carboxylation supports redox homeostasis during anchorage-independent growth. *Nature*. 2016. Vol. 532, N 7598. P. 255-8.
44. Porporato P.E., Payen V.L., Perez-Escuredo J., et al. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep*. 2014. Vol. 8, N 3. P. 754-66.
45. Santidrian A.F., Matsuno-Yagi A., Ritland M., et al. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest*. 2013. Vol. 123, N 3. P. 1068-81.
46. Mannava S., Moparthy K.C., Wheeler L.J., et al. Depletion of deoxyribonucleotide pools is an endogenous source of DNA damage in cells undergoing oncogene-induced senescence. *Am J Pathol*. 2013. Vol. 182, N 1. P. 142-51.
47. Rizvi N.A., Hellmann M.D., Snyder A., et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015. Vol. 348, N 6230. P. 124-8.
48. Snyder A., Makarov V., Merghoub T., et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014. Vol. 371, N 23. P. 2189-2199.
49. Wang H., Nicolay B.N., Chick J.M., et al. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*. 2017. Vol. 546, N 7658. P. 426-430.
50. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, N 19. P. 8788-93.
51. Dong L.F., Kovarova J., Bajzikova M., et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *Elife*. 2017. Vol. 6.
52. Hensen F., Cansiz S., Gerhold J.M., et al. To be or not to be a nucleoid protein: a comparison of mass-spectrometry based approaches in the identification of

- potential mtDNA-nucleoid associated proteins. *Biochimie*. 2014. Vol. 100. P. 219-26.
53. Vega R.B., Horton J.L., Kelly D.P. Maintaining ancient organelles: mitochondrial biogenesis and maturation. *Circ Res*. 2015. Vol. 116, N 11. P. 1820-34.
54. Linkowska K., Jawien A., Marszalek A., et al. Mitochondrial DNA Polymerase gamma Mutations and Their Implications in mtDNA Alterations in Colorectal Cancer. *Ann Hum Genet*. 2015. Vol. 79, N 5. P. 320-328.
55. Swan E.J., Maxwell A.P., McKnight A.J. Distinct methylation patterns in genes that affect mitochondrial function are associated with kidney disease in blood-derived DNA from individuals with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2015. Vol. 32, N 8. P. 1110-5.
56. Zhao H., Wang C., Lu B., et al. Pristimerin triggers AIF-dependent programmed necrosis in glioma cells via activation of JNK. *Cancer Lett*. 2016. Vol. 374, N 1. P. 136-148.
57. Lee W.T., St John J. The control of mitochondrial DNA replication during development and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2015. Vol. 1350. P. 95-106.
58. Lee W.T., St John J.C. Mitochondrial DNA as an initiator of tumorigenesis. *Cell Death Dis*. 2016. Vol. 7. P. e2171.
59. Wallace D.C. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012. Vol. 12, N 10. P. 685-98.
60. Kelly R.D., Mahmud A., McKenzie M., et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res*. 2012. Vol. 40, N 20. P. 10124-38.
61. Lee W., Johnson J., Gough D.J., et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. *Cell Death Dis*. 2015. Vol. 6. P. e1664.

62. Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., et al. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*. 2012. Vol. 149, N 6. P. 1393-406.
63. Overman R.G., Jr., Enderle P.J., Farrow J.M., 3rd, et al. The human mitochondrial translation initiation factor 2 gene (MTIF2): transcriptional analysis and identification of a pseudogene. *Biochim Biophys Acta*. 2003. Vol. 1628, N 3. P. 195-205.
64. Vedrenne V., Galmiche L., Chretien D., et al. Mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs results in severe infantile liver failure. *J Hepatol*. 2012. Vol. 56, N 1. P. 294-7.
65. Gole B., Baumann C., Mian E., et al. Endonuclease G initiates DNA rearrangements at the MLL breakpoint cluster upon replication stress. *Oncogene*. 2015. Vol. 34, N 26. P. 3391-401.
66. Parrish J., Li L., Klotz K., et al. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*. 2001. Vol. 412, N 6842. P. 90-4.
67. Wiehe R.S., Gole B., Chatre L., et al. Endonuclease G promotes mitochondrial genome cleavage and replication. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, N 26. P. 18309-18326.
68. de Guia R.M., Herzig S. How Do Glucocorticoids Regulate Lipid Metabolism? *Adv Exp Med Biol*. 2015. Vol. 872. P. 127-44.
69. Kim I.K., Kim B.S., Koh C.H., et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. *Nat Med*. 2015. Vol. 21, N 9. P. 1010-7.
70. Pufall M.A. Glucocorticoids and Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2015. Vol. 872. P. 315-33.
71. Thomas A.L., Coarfa C., Qian J., et al. Identification of potential glucocorticoid receptor therapeutic targets in multiple myeloma. *Nucl Recept Signal*. 2015. Vol. 13. P. e006.

72. Vonlanthen J., Okoniewski M.J., Menigatti M., et al. A comprehensive look at transcription factor gene expression changes in colorectal adenomas. *BMC Cancer*. 2014. Vol. 14. P. 46.
73. Huang Y., Zhou J., Huang Y., et al. SARI, a novel target gene of glucocorticoid receptor, plays an important role in dexamethasone-mediated killing of B lymphoma cells. *Cancer Lett*. 2016. Vol. 373, N 1. P. 57-66.
74. Psarra A.M., Sekeris C.E. Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta*. 2011. Vol. 1813, N 10. P. 1814-21.
75. Dasgupta S., Putluri N., Long W., et al. Coactivator SRC-2-dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *J Clin Invest*. 2015. Vol. 125, N 3. P. 1174-88.
76. Khan S.H., Ling J., Kumar R. TBP binding-induced folding of the glucocorticoid receptor AF1 domain facilitates its interaction with steroid receptor coactivator-1. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 7. P. e21939.
77. Li M.D., Ruan H.B., Singh J.P., et al. O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *J Biol Chem*. 2012. Vol. 287, N 16. P. 12904-12.
78. Jackson J.B., Leung J.H., Stout C.D., et al. Review and Hypothesis. New insights into the reaction mechanism of transhydrogenase: Swivelling the dIII component may gate the proton channel. *FEBS Lett*. 2015. Vol. 589, N 16. P. 2027-33.
79. Meimaridou E., Kowalczyk J., Guasti L., et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nat Genet*. 2012. Vol. 44, N 7. P. 740-2.
80. Ho H.Y., Lin Y.T., Lin G., et al. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) deficiency dysregulates mitochondrial retrograde signaling and impedes proliferation. *Redox Biol*. 2017. Vol. 12. P. 916-928.

81. Meimaridou E., Goldsworthy M., Chortis V., et al. NNT is a key regulator of adrenal redox homeostasis and steroidogenesis in male mice. *J Endocrinol.* 2018. Vol. 236, N 1. P. 13-28.
82. Li S., Zhuang Z., Wu T., et al. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase-mediated redox homeostasis promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer. *Redox Biol.* 2018. Vol. 18. P. 246-255.
83. Gibellini L., Pinti M., Bartolomeo R., et al. Inhibition of Lon protease by triterpenoids alters mitochondria and is associated to cell death in human cancer cells. *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, N 28. P. 25466-83.
84. Kaufman R.J., Malhotra J.D. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2014. Vol. 1843, N 10. P. 2233-9.
85. Quiros P.M., Espanol Y., Acin-Perez R., et al. ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep.* 2014. Vol. 8, N 2. P. 542-56.
86. Bezawork-Geleta A., Brodie E.J., Dougan D.A., et al. LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins. *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. P. 17397.
87. Gibellini L., Losi L., De Biasi S., et al. LonP1 Differently Modulates Mitochondrial Function and Bioenergetics of Primary Versus Metastatic Colon Cancer Cells. *Front Oncol.* 2018. Vol. 8. P. 254.
88. Pinti M., Gibellini L., Nasi M., et al. Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochim Biophys Acta.* 2016. Vol. 1857, N 8. P. 1300-1306.
89. Quiros P.M., Barcena C., Lopez-Otin C. Lon protease: A key enzyme controlling mitochondrial bioenergetics in cancer. *Mol Cell Oncol.* 2014. Vol. 1, N 4. P. e968505.

90. Pinti M., Gibellini L., Liu Y., et al. Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2015. Vol. 72, N 24. P. 4807-24.
91. Flavahan W.A., Drier Y., Liao B.B., et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature.* 2016. Vol. 529, N 7584. P. 110-4.
92. Viswanath P., Chaumeil M.M., Ronen S.M. Molecular Imaging of Metabolic Reprogramming in Mutant IDH Cells. *Front Oncol.* 2016. Vol. 6. P. 60.
93. Williamson S.R., Eble J.N., Amin M.B., et al. Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2015. Vol. 28, N 1. P. 80-94.
94. Jiang P., Du W., Mancuso A., et al. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature.* 2013. Vol. 493, N 7434. P. 689-93.
95. Ren J.G., Seth P., Everett P., et al. Induction of erythroid differentiation in human erythroleukemia cells by depletion of malic enzyme 2. *PLoS One.* 2010. Vol. 5, N 9.
96. Ren J.G., Seth P., Clish C.B., et al. Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling. *Sci Rep.* 2014. Vol. 4. P. 5414.
97. Hsieh J.Y., Li S.Y., Tsai W.C., et al. A small-molecule inhibitor suppresses the tumor-associated mitochondrial NAD(P)⁺-dependent malic enzyme (ME2) and induces cellular senescence. *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, N 24. P. 20084-98.
98. Yang H., Zhou L., Shi Q., et al. SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth. *EMBO J.* 2015. Vol. 34, N 8. P. 1110-25.
99. Yang S., Hwang S., Kim M., et al. Mitochondrial glutamine metabolism via GOT2 supports pancreatic cancer growth through senescence inhibition. *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, N 2. P. 55.

100. Eleftheriadis T., Pissas G., Antoniadis G., et al. Malate dehydrogenase-2 inhibitor LW6 promotes metabolic adaptations and reduces proliferation and apoptosis in activated human T-cells. *Exp Ther Med.* 2015. Vol. 10, N 5. P. 1959-1966.
101. Park J.B., Nagar H., Choi S., et al. IDH2 deficiency impairs mitochondrial function in endothelial cells and endothelium-dependent vasomotor function. *Free Radic Biol Med.* 2016. Vol. 94. P. 36-46.
102. Scholz S.L., Horn S., Murali R., et al. Analysis of SDHD promoter mutations in various types of melanoma. *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, N 28. P. 25868-82.
103. Saxena N., Maio N., Crooks D.R., et al. SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *J Natl Cancer Inst.* 2016. Vol. 108, N 1.
104. Huang Y.P., Chang N.W. PPARalpha modulates gene expression profiles of mitochondrial energy metabolism in oral tumorigenesis. *Biomedicine (Taipei).* 2016. Vol. 6, N 1. P. 3.
105. Maio N., Singh A., Uhrigshardt H., et al. Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell Metab.* 2014. Vol. 19, N 3. P. 445-57.
106. Niemeijer N.D., Papathomas T.G., Korpershoek E., et al. Succinate Dehydrogenase (SDH)-Deficient Pancreatic Neuroendocrine Tumor Expands the SDH-Related Tumor Spectrum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015. Vol. 100, N 10. P. E1386-93.
107. Cobanoglu B., Ceyran A.B., Simsek M., et al. Immunohistochemical analysis of Bax and AIF in colorectal tumors. *Int J Clin Exp Med.* 2015. Vol. 8, N 9. P. 16071-6.
108. Lee M.J., Kim J.Y., Suk K., et al. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha-responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol Cell Biol.* 2004. Vol. 24, N 9. P. 3918-27.

109. Mazzi E., Soliman K.F. Whole genome expression profile in neuroblastoma cells exposed to 1-methyl-4-phenylpyridine. *Neurotoxicology*. 2012. Vol. 33, N 5. P. 1156-69.
110. Pedram A., Razandi M., Wallace D.C., et al. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2006. Vol. 17, N 5. P. 2125-37.
111. Catalano M., D'Alessandro G., Lepore F., et al. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol*. 2015. Vol. 9, N 8. P. 1612-25.
112. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Kroemer G. Autophagy Mediates Tumor Suppression via Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2016. Vol. 26, N 1. P. 1-3.
113. Mortensen M., Soilleux E.J., Djordjevic G., et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*. 2011. Vol. 208, N 3. P. 455-67.
114. Ye Y., Tan S., Zhou X., et al. Inhibition of p-IkappaBalpha Ubiquitylation by Autophagy-Related Gene 7 to Regulate Inflammatory Responses to Bacterial Infection. *J Infect Dis*. 2015. Vol. 212, N 11. P. 1816-26.
115. Antonucci L., Fagman J.B., Kim J.Y., et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. Vol. 112, N 45. P. E6166-74.
116. Gammoh N., Fraser J., Puente C., et al. Suppression of autophagy impedes glioblastoma development and induces senescence. *Autophagy*. 2016. Vol. 12, N 9. P. 1431-9.
117. Guo X., Yin H., Li L., et al. Cardioprotective Role of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2 by Suppressing Apoptosis and Necroptosis. *Circulation*. 2017. Vol. 136, N 8. P. 729-742.
118. Pobezinskaya Y.L., Liu Z. The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11, N 5. P. 871-6.

119. Swarup V., Das S., Ghosh S., et al. Tumor necrosis factor receptor-1-induced neuronal death by TRADD contributes to the pathogenesis of Japanese encephalitis. *J Neurochem.* 2007. Vol. 103, N 2. P. 771-83.
120. Shukla K., Sharma A.K., Ward A., et al. MicroRNA-30c-2-3p negatively regulates NF-kappaB signaling and cell cycle progression through downregulation of TRADD and CCNE1 in breast cancer. *Mol Oncol.* 2015. Vol. 9, N 6. P. 1106-19.
121. Ao J.E., Kuang L.H., Zhou Y., et al. Hypoxia-inducible factor 1 regulated ARC expression mediated hypoxia induced inactivation of the intrinsic death pathway in p53 deficient human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012. Vol. 420, N 4. P. 913-7.
122. Keith B., Simon M.C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 2007. Vol. 129, N 3. P. 465-72.
123. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist.* 2004. Vol. 9 Suppl 5. P. 10-7.
124. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J.* 2017. Vol. 36, N 3. P. 252-259.
125. Yang L., Lin C., Wang L., et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp Cell Res.* 2012. Vol. 318, N 19. P. 2417-26.
126. Gabriely G., Wheeler M.A., Takenaka M.C., et al. Role of AHR and HIF-1alpha in Glioblastoma Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017. Vol. 28, N 6. P. 428-436.
127. Heddleston J.M., Wu Q., Rivera M., et al. Hypoxia-induced mixed-lineage leukemia 1 regulates glioma stem cell tumorigenic potential. *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19, N 3. P. 428-39.
128. Lu H., Li Y., Shu M., et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha blocks differentiation of malignant gliomas. *FEBS J.* 2009. Vol. 276, N 24. P. 7291-304.

129. Mendez O., Zavadil J., Esencay M., et al. Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Mol Cancer*. 2010. Vol. 9. P. 133.
130. Mabweesh N.J., Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 2007. Vol. 22, N 5. P. 559-72.
131. Kaur B., Khwaja F.W., Severson E.A., et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2005. Vol. 7, N 2. P. 134-53.
132. Li Z., Bao S., Wu Q., et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009. Vol. 15, N 6. P. 501-13.
133. Rong Y., Durden D.L., Van Meir E.G., et al. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006. Vol. 65, N 6. P. 529-39.
134. Womeldorff M., Gillespie D., Jensen R.L. Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2014. Vol. 37, N 6. P. E8.
135. Palazon A., Goldrath A.W., Nizet V., et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity*. 2014. Vol. 41, N 4. P. 518-28.
136. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012. Vol. 148, N 3. P. 399-408.
137. Maynard M.A., Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007. Vol. 64, N 16. P. 2170-80.
138. Amoroso F., Falzoni S., Adinolfi E., et al. The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis*. 2012. Vol. 3. P. e370.
139. Colegio O.R., Chu N.Q., Szabo A.L., et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014. Vol. 513, N 7519. P. 559-63.
140. Quintana F.J., Sherr D.H. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev*. 2013. Vol. 65, N 4. P. 1148-61.

141. Wenger R.H., Stiehl D.P., Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*. 2005. Vol. 2005, N 306. P. re12.
142. Semenza G.L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002. Vol. 8, N 4 Suppl. P. S62-7.
143. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J., et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med*. 2011. Vol. 208, N 2. P. 313-26.
144. Wolf A., Agnihotri S., Munoz D., et al. Developmental profile and regulation of the glycolytic enzyme hexokinase 2 in normal brain and glioblastoma multiforme. *Neurobiol Dis*. 2011. Vol. 44, N 1. P. 84-91.
145. Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L., et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006. Vol. 3, N 3. P. 177-85.
146. McLendon R F.A., Bigner D, Van Meir EG, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008. Vol. 455, N 7216. P. 1061-1068.
147. Dimitrov L., Hong C.S., Yang C., et al. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. *Int J Med Sci*. 2015. Vol. 12, N 3. P. 201-213.
148. Wang G., Sai K., Gong F., et al. Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 induces glioma cell proliferation via nuclear factor-kappaB activation in a hypoxia-inducible factor 1-alpha dependent manner. *Mol Med Rep*. 2014. Vol. 9, N 5. P. 1799-1805.
149. Zhao S., Lin Y., Xu W., et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science*. 2009. Vol. 324, N 5924. P. 261-5.
150. Jensen R.L. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J Neurooncol*. 2009. Vol. 92, N 3. P. 317-35.

151. Semenza G.L. Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life*. 2008. Vol. 60, N 9. P. 591-7.
152. Chigurupati S., Venkataraman R., Barrera D., et al. Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res*. 2010. Vol. 70, N 1. P. 418-27.
153. Ponnala S., Veeravalli K.K., Chetty C., et al. Regulation of DNA repair mechanism in human glioma xenograft cells both in vitro and in vivo in nude mice. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, N 10. P. e26191.
154. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K., et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010. Vol. 17, N 5. P. 510-22.
155. Boroughs L.K., DeBerardinis R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015. Vol. 17, N 4. P. 351-9.
156. Cantor J.R., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov*. 2012. Vol. 2, N 10. P. 881-98.
157. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008. Vol. 7, N 1. P. 11-20.
158. Li Z., Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci*. 2016. Vol. 73, N 2. P. 377-92.
159. Wellen K.E., Lu C., Mancuso A., et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev*. 2010. Vol. 24, N 24. P. 2784-99.
160. Vander Heiden M.G., Lunt S.Y., Dayton T.L., et al. Metabolic pathway alterations that support cell proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011. Vol. 76. P. 325-34.
161. Dang C.V. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*. 2012. Vol. 26, N 9. P. 877-90.

162. Mikawa T., ME L.L., Takaori-Kondo A., et al. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci.* 2015. Vol. 72, N 10. P. 1881-92.
163. Li F., Wang Y., Zeller K.I., et al. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol.* 2005. Vol. 25, N 14. P. 6225-34.
164. Huang D., Li C., Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014. Vol. 46, N 3. P. 214-9.
165. Zhang J.Y., Zhang F., Hong C.Q., et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med.* 2015. Vol. 12, N 1. P. 10-22.
166. Schwartzenberg-Bar-Yoseph F., Armoni M., Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, N 7. P. 2627-33.
167. Zhang C., Liu J., Wu R., et al. Tumor suppressor p53 negatively regulates glycolysis stimulated by hypoxia through its target RRAD. *Oncotarget.* 2014. Vol. 5, N 14. P. 5535-46.
168. German N.J., Haigis M.C. Sirtuins and the Metabolic Hurdles in Cancer. *Curr Biol.* 2015. Vol. 25, N 13. P. R569-83.
169. Yuan H., Su L., Chen W.Y. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *Onco Targets Ther.* 2013. Vol. 6. P. 1399-416.
170. Hallows W.C., Yu W., Denu J.M. Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation. *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, N 6. P. 3850-8.
171. Tsusaka T., Guo T., Yagura T., et al. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells.* 2014. Vol. 19, N 10. P. 766-77.
172. Xu Y., Li F., Lv L., et al. Oxidative stress activates SIRT2 to deacetylate and stimulate phosphoglycerate mutase. *Cancer Res.* 2014. Vol. 74, N 13. P. 3630-3642.

173. Zwaans B.M., Lombard D.B. Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech.* 2014. Vol. 7, N 9. P. 1023-1032.
174. Houtkooper R.H., Pirinen E., Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. Vol. 13, N 4. P. 225-238.
175. Gao P., Sun L., He X., et al. MicroRNAs and the Warburg Effect: new players in an old arena. *Curr Gene Ther.* 2012. Vol. 12, N 4. P. 285-291.
176. Herranz D., Ambesi-Impiombato A., Sudderth J., et al. Metabolic reprogramming induces resistance to anti-NOTCH1 therapies in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* 2015. Vol. 21, N 10. P. 1182-9.
177. Yuneva M.O., Fan T.W., Allen T.D., et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* 2012. Vol. 15, N 2. P. 157-70.
178. Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.C., et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009. Vol. 458, N 7239. P. 762-5.
179. Altman B.J., Stine Z.E., Dang C.V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016. Vol. 16, N 10. P. 619-34.
180. Mates J.M., Segura J.A., Martin-Rufian M., et al. Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med.* 2013. Vol. 13, N 4. P. 514-34.
181. Faubert B., Vincent E.E., Griss T., et al. Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014. Vol. 111, N 7. P. 2554-9.
182. Jung C.H., Ro S.H., Cao J., et al. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584, N 7. P. 1287-95.
183. Kato Y., Maeda T., Suzuki A., et al. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev.* 2018. Vol. 54, N 1. P. 8-21.

184. Metallo C.M., Gameiro P.A., Bell E.L., et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*. 2011. Vol. 481, N 7381. P. 380-4.
185. Mullen A.R., Wheaton W.W., Jin E.S., et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*. 2011. Vol. 481, N 7381. P. 385-8.
186. Sun R.C., Denko N.C. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab*. 2014. Vol. 19, N 2. P. 285-92.
187. Cetinbas N.M., Sudderth J., Harris R.C., et al. Glucose-dependent anaplerosis in cancer cells is required for cellular redox balance in the absence of glutamine. *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 32606.
188. Golani-Armon A., Arava Y. Localization of Nuclear-Encoded mRNAs to Mitochondria Outer Surface. *Biochemistry (Mosc)*. 2016. Vol. 81, N 10. P. 1038-1043.
189. Wiedemann N., Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2017. Vol. 86. P. 685-714.
190. Abe Y., Shodai T., Muto T., et al. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*. 2000. Vol. 100, N 5. P. 551-60.
191. Chacinska A., Lind M., Frazier A.E., et al. Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*. 2005. Vol. 120, N 6. P. 817-29.
192. Mokranjac D., Neupert W. Cell biology: Architecture of a protein entry gate. *Nature*. 2015. Vol. 528, N 7581. P. 201-2.
193. Harbauer A.B., Opalinska M., Gerbeth C., et al. Mitochondria. Cell cycle-dependent regulation of mitochondrial preprotein translocase. *Science*. 2014. Vol. 346, N 6213. P. 1109-13.

194. Denkert N., Schendzielorz A.B., Barbot M., et al. Cation selectivity of the presequence translocase channel Tim23 is crucial for efficient protein import. *Elife*. 2017. Vol. 6.
195. Fukasawa Y., Tsuji J., Fu S.C., et al. MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol Cell Proteomics*. 2015. Vol. 14, N 4. P. 1113-26.
196. Schendzielorz A.B., Schulz C., Lytovchenko O., et al. Two distinct membrane potential-dependent steps drive mitochondrial matrix protein translocation. *J Cell Biol*. 2017. Vol. 216, N 1. P. 83-92.
197. Varshavsky A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci*. 2011. Vol. 20, N 8. P. 1298-345.
198. Veling M.T., Reidenbach A.G., Freiburger E.C., et al. Multi-omic Mitoprotease Profiling Defines a Role for Oct1p in Coenzyme Q Production. *Mol Cell*. 2017. Vol. 68, N 5. P. 970-977 e11.
199. Ieva R., Schrempp S.G., Opalinski L., et al. Mgr2 functions as lateral gatekeeper for preprotein sorting in the mitochondrial inner membrane. *Mol Cell*. 2014. Vol. 56, N 5. P. 641-52.
200. Stiller S.B., Hopker J., Oeljeklaus S., et al. Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins. *Cell Metab*. 2016. Vol. 23, N 5. P. 901-8.
201. Peleh V., Cordat E., Herrmann J.M. Mia40 is a trans-site receptor that drives protein import into the mitochondrial intermembrane space by hydrophobic substrate binding. *Elife*. 2016. Vol. 5.
202. Koch J.R., Schmid F.X. Mia40 combines thiol oxidase and disulfide isomerase activity to efficiently catalyze oxidative folding in mitochondria. *J Mol Biol*. 2014. Vol. 426, N 24. P. 4087-4098.
203. Weinhaupl K., Lindau C., Hessel A., et al. Structural Basis of Membrane Protein Chaperoning through the Mitochondrial Intermembrane Space. *Cell*. 2018. Vol. 175, N 5. P. 1365-1379 e25.

204. Kruger V., Becker T., Becker L., et al. Identification of new channels by systematic analysis of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol.* 2017. Vol. 216, N 11. P. 3485-3495.
205. Lesnik C., Golani-Armon A., Arava Y. Localized translation near the mitochondrial outer membrane: An update. *RNA Biol.* 2015. Vol. 12, N 8. P. 801-9.
206. Williams C.C., Jan C.H., Weissman J.S. Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science.* 2014. Vol. 346, N 6210. P. 748-51.
207. Braakman I., Bulleid N.J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 71-99.
208. Oakes S.A., Papa F.R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015. Vol. 10. P. 173-94.
209. Wang M., Kaufman R.J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2014. Vol. 14, N 9. P. 581-97.
210. Smith M.H., Ploegh H.L., Weissman J.S. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2011. Vol. 334, N 6059. P. 1086-90.
211. Walter P., Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011. Vol. 334, N 6059. P. 1081-6.
212. Hetz C., Papa F.R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell.* 2018. Vol. 69, N 2. P. 169-181.
213. Urrea H., Dufey E., Lisbona F., et al. When ER stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta.* 2013. Vol. 1833, N 12. P. 3507-3517.
214. Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003. Vol. 11, N 3. P. 619-33.

215. Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S., et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004. Vol. 18, N 24. P. 3066-77.
216. Song B., Scheuner D., Ron D., et al. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest.* 2008. Vol. 118, N 10. P. 3378-89.
217. Lu Y., Liang F.X., Wang X. A synthetic biology approach identifies the mammalian UPR RNA ligase RtcB. *Mol Cell.* 2014. Vol. 55, N 5. P. 758-70.
218. Nagelkerke A., Bussink J., Sweep F.C., et al. The unfolded protein response as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014. Vol. 1846, N 2. P. 277-84.
219. Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001. Vol. 107, N 7. P. 881-91.
220. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., et al. The integrated stress response. *EMBO Rep.* 2016. Vol. 17, N 10. P. 1374-1395.
221. Zhang W., Hietakangas V., Wee S., et al. ER stress potentiates insulin resistance through PERK-mediated FOXO phosphorylation. *Genes Dev.* 2013. Vol. 27, N 4. P. 441-9.
222. Rouschop K.M., van den Beucken T., Dubois L., et al. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest.* 2010. Vol. 120, N 1. P. 127-41.
223. Higa A., Taouji S., Lhomond S., et al. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol Cell Biol.* 2014. Vol. 34, N 10. P. 1839-49.
224. Hassler J.R., Scheuner D.L., Wang S., et al. The IRE1alpha/XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of beta Cells. *PLoS Biol.* 2015. Vol. 13, N 10. P. e1002277.

225. Lee A.H., Iwakoshi N.N., Glimcher L.H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003. Vol. 23, N 21. P. 7448-59.
226. Hollien J., Weissman J.S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* 2006. Vol. 313, N 5783. P. 104-7.
227. Maurel M., Chevet E., Tavernier J., et al. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* 2014. Vol. 39, N 5. P. 245-54.
228. Upton J.P., Wang L., Han D., et al. IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science.* 2012. Vol. 338, N 6108. P. 818-22.
229. Minchenko O.H., Khar'kova A.P., Bakalets T.V., et al. [Endoplasmic reticulum stress, its sensor and signalling systems and the role in regulation of gene expression at malignant tumor growth and hypoxia]. *Ukr Biokhim Zh (1999).* 2013. Vol. 85, N 5. P. 5-16.
230. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, N 14. P. 6700-7.
231. Chen X., Iliopoulos D., Zhang Q., et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1alpha pathway. *Nature.* 2014. Vol. 508, N 7494. P. 103-107.
232. Minchenko D K.K., Hubenya O., Kryvdiuk I., Kharkova A., Herasymenko R., Sulik R. Endoplasmic Reticulum Stress and Angiogenesis in Cancer. *International Journal of Physiology and Pathophysiology.* 2014. Vol. 5, N 3. P. 261-281.
233. Minchenko D.O., Kharkova A.P., Tsymbal D.O., et al. IRE1 inhibition affects the expression of insulin-like growth factor binding protein genes and modifies its sensitivity to glucose deprivation in U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 2015. Vol. 49, N 4. P. 185-97.

234. Minchenko D.O.D., S. V.; Kryvdiuk, I. V.; Bakalets, T. V.; Lypova, N. M.; Karbovskiy, L. L.; Minchenko, O. H. . Inhibition of ERN1 Modifies the Hypoxic Regulation of the Expression of TP53-Related Genes in U87 Glioma Cells. *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases*. 2014. Vol. 1, N 1. P. 18-26.
235. Minchenko D.O.; Ratushna, O. O.; Komisarenko, S. V; Minchenko, O. H. The Vascular Endothelial Growth Factor Genes Expression in Glioma U87 Cells Is Dependent from ERN1 Signaling Enzyme Function. *Advances in Biological Chemistry*. 2012. Vol. 2, N 2. P. 198-206.
236. Dejeans N., Pluquet O., Lhomond S., et al. Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1alpha-mediated cleavage of SPARC mRNA. *J Cell Sci*. 2012. Vol. 125, N Pt 18. P. 4278-87.
237. Song M., Sandoval T.A., Chae C.S., et al. IRE1alpha-XBP1 controls T cell function in ovarian cancer by regulating mitochondrial activity. *Nature*. 2018. Vol. 562, N 7727. P. 423-428.
238. Ji Y.L., Wang H., Zhao X.F., et al. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Sci*. 2011. Vol. 124, N 2. P. 446-59.
239. Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science*. 2006. Vol. 312, N 5773. P. 572-6.
240. Mori T., Hayashi T., Hayashi E., et al. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 10. P. e76941.
241. Kimata Y., Ishiwata-Kimata Y., Yamada S., et al. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells*. 2006. Vol. 11, N 1. P. 59-69.
242. Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 2000. Vol. 101, N 3. P. 249-58.

243. Okreglak V., Walter P. The conserved AAA-ATPase Msp1 confers organelle specificity to tail-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. Vol. 111, N 22. P. 8019-24.
244. Schreiner B., Westerburg H., Forne I., et al. Role of the AAA protease Yme1 in folding of proteins in the intermembrane space of mitochondria. *Mol Biol Cell*. 2012. Vol. 23, N 22. P. 4335-46.
245. Armstead V.E., Minchenko A.G., Campbell B., et al. P-selectin is up-regulated in vital organs during murine traumatic shock. *FASEB J*. 1997. Vol. 11, N 14. P. 1271-9.
246. Гланц С. Медико-Биологическая Статистика. Москва 1999. 459 с.
247. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A., et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*. 2007. Vol. 27, N 1. P. 53-66.
248. Minchenko O., Opentanova I., Minchenko D., et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett*. 2004. Vol. 576, N 1-2. P. 14-20.
249. Minchenko O.H.M., M.; Minchenko, D. O.; Lypova, N. M.; Kovalevska, O. V.; Tsybal, D. O. Inhibition of kinase and endoribonuclease activity of ERN1/IRE1 α affects expression of proliferation-related genes in U87 glioma cells. *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases*. 2015. Vol. 2, N 1. P. 18-29.
250. Lee J., Sun C., Zhou Y., et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat Med*. 2011. Vol. 17, N 10. P. 1251-60.
251. Zhou Y., Lee J., Reno C.M., et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat Med*. 2011. Vol. 17, N 3. P. 356-65.
252. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D., et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*. 2004. Vol. 64, N 17. P. 5943-7.
253. Krall A.S., Christofk H.R. Rethinking glutamine addiction. *Nat Cell Biol*. 2015. Vol. 17, N 12. P. 1515-7.

254. Tardito S., Oudin A., Ahmed S.U., et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat Cell Biol.* 2015. Vol. 17, N 12. P. 1556-68.
255. Ye J., Kumanova M., Hart L.S., et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 2010. Vol. 29, N 12. P. 2082-96.