

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

**СЛЮСАР
Мирослава Юріївна**

УДК 577.112.7:616

ДИСЕРТАЦІЯ

**Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину
у клітинах гліоми**

091 – Біологія

09 – 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

_____ / М. Ю. Слюсар/

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

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Слюсар М. Ю. Молекулярні механізми регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліоми. – 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, 2025.

Дисертація присвячена вивченню механізмів регуляції експресії генів синтезу серину, який відіграє важливу роль у рості різних злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, оскільки задіяний у багатьох метаболічних циклах. Головна увага була зосереджена на з'ясуванні ролі стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії у регуляції експресії генів синтезу серину, оскільки саме ці чинники є важливими для пухлинного росту. Для цього були проведені експерименти із використанням генетично модифікованих клітин гліобластоми лінії U87MG, що мали пригнічену ензиматичну активність ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol-requiring enzyme 1), основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, і знижену проліферативну активність. Було також досліджено вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у залежності від функціональної активності сигнального протеїну ERN1.

Актуальність цієї теми пов'язана з тим, що онкологічні захворювання посідають друге місце у світі за рівнем смертності і їх кількість постійно зростає при відчутній недостатності ефективного їх лікування. Гліобластоми є найбільш злоякісними і досить поширеними первинними пухлинами головного мозку, які надто важко піддаються лікуванню та характеризуються короткою тривалістю життя пацієнтів. І саме тому, інтенсивний пошук принципово нових підходів до вияснення молекулярних основ патогенезу гліобластом, як і інших злоякісних пухлин, є важливим і необхідним для

покращення існуючих та створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

Надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин є стрес ендоплазматичного ретикулума і гіпоксія, які перепрограмовують геном пухлинних клітин для посиленого забезпечення пухлин поживними речовинами шляхом активації ангіогенезу, розвитку резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до ефектів гіпоксії. У зв'язку з цим, детальне вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих процесів, буде сприяти більш глибокому розумінню молекулярних механізмів росту злоякісних пухлин та пошуку принципово нових підходів боротьби з ними.

Не менш важливим фактором росту злоякісних пухлин є також амінокислота серин, яка задіяна у регуляції численних метаболічних процесів як у нормальних, так і пухлинних клітинах. Більше того, для інтенсивного росту багатьох злоякісних пухлин важливим є посилений синтез серину. І тому пізнання молекулярних механізмів регуляції синтезу серину за злоякісного росту сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за гіпоксії є досить важливим у пошуку молекулярних мішеней для боротьби зі злоякісним ростом.

Важливим і принципово новим моментом цієї роботи було виявлення причетності ERN1/IRE1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума до регуляції експресії генів, що контролюють синтез серину, у тому числі і ролі ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей цього сигнального протеїну в реалізації його впливу на експресію генів. Окремим завданням роботи було дослідити дію гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення ERN1, оскільки це пригнічення призводить до зниження проліферації пухлинних клітин і має виражений анти-пухлинний ефект.

У ході виконання роботи були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології. Це культивування трьох стабільно трансфікованих субліній: 1) трансфіковані порожнім вектором контрольні клітини, 2) клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 і 3) клітини без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної), а також методи виділення РНК із клітин гліобластоми, визначення концентрації і спектральних характеристик препаратів РНК за допомогою нано-спектрофотометра. Для визначення експресії генів спочатку проводили синтез комплементарних ДНК шляхом зворотної транскрипції, а потім методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі визначали рівень експресії мРНК ензимів синтезу серину, а також транскрипційного фактора ATF4, який контролює транскрипцію *PSAT1*. Спеціальний метод був застосований для визначення експресії мікроРНК, що включав поліаденилювання мікроРНК, їх зворотну транскрипцію і ампліфікацію. Були використані також методи сайленсінгу мРНК ERN1 та XBP1 для створення моделі пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 або лише головної функції ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну, а саме сайленсінгу XBP1. Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом в агарозному гелі. Для аналізу можливих механізмів регуляції експресії досліджених генів використовували методи біоінформатики, а отримані результати опрацьовані статистично.

Для з'ясування ролі сигнального протеїну ERN1 та його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) нами було досліджено експресію генів, що кодують такі ензими синтезу серину як PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), PSAT1 (phosphoserine aminotransferase 1), PSPH (phosphoserine phosphatase), SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1) і SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2). Для виявлення механізмів регуляції рівня експресії гена *PSAT1* було досліджено експресію транскрипційного фактора ATF4 (activating transcription factor 4), який

контролює експресію гена *PSAT1* і є залежним від стресу ендоплазматичного ретикулума.

З метою вивчення молекулярних механізмів залежності експресії генів синтезу серину від стресу ендоплазматичного ретикулума і зокрема його сигнального шляху ERN1/IRE1 у клітинах гліобластоми були проведені дослідження на клітинах з пригніченими ензиматичними активностями (протеїнкінази та ендорибонуклеази) ERN1 та за умов інгібування лише ендорибонуклеази цього сигнального протеїну. Виявлена залежність експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми від функціональної активності ERN1 і можливий вклад цих генів у анти-проліферативний ефект пригнічення ERN1, а також роль протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей цього сигнального протеїну в опосередкованій стресом ендоплазматичного ретикулума регуляції експресії досліджених генів. Встановлено також, що експресія генів синтезу серину є чутливою до умов гіпоксії і дефіциту як глутаміну, так і глюкози в залежності від функціональної активності сигнального протеїну ERN1.

Отримані результати продемонстрували, що експресія генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1*, *SHMT2* та *ATF4*, які контролюють синтез серину, залежить від ERN1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума і впливає на проліферацію клітин гліобластоми. Була виявлена залежність ефектів гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози, які є важливими факторами контролю пухлинного росту, на експресію цих генів від функціональної активності сигнального протеїну ERN1. Так, було показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми лінії U87MG змінювало рівень експресії всіх досліджених нами генів, які контролюють синтез серину. Встановлено також, що виявлені зміни були різними як по величині, так і по напрямку, і що це обумовлено особливостями регуляції експресії досліджених генів сигнальним протеїном ERN1, а також їх функціональним значенням, причому це відображає

перепрограмування геному в результаті інгібування одного із сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Так, рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4* знижувався, а гена *SHMT1* – істотно збільшувався у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1. Подібні зміни в експресії генів, що контролюють синтез серину, були виявлені і за умов сайленсінгу ERN1, що вказує на залежність змін в експресії досліджених нами генів саме від ERN1, а не від способу його пригнічення. Проведено також визначення ензиматичної активності PHGDH, ключового ензиму синтезу серину, і показано зниження активності цього ензиму у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1.

У той же час, за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 рівень експресії генів *PSAT1* і *PSPH* змінювався по-різному у клітинах гліобластоми із різним типом пригнічення ензиматичних активностей протеїну ERN1, а це свідчить про участь обох ензиматичних активностей ERN1 у цій регуляції, їх взаємодію через опосередковані ними сигнальні шляхи. Разом з тим, зміни рівня експресії гена *ATF4* у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 і клітинах з пригніченими обома його ензиматичними активностями істотно не відрізнялися за величиною, що свідчило про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Серед досліджених нами генів, які контролюють синтез серину, були виявлені і такі, рівень експресії яких змінювався лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 і не змінювався у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1. Це гени *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*. Отримані результати вказують на опосередкованість виявлених змін в їх експресії саме протеїнкіназною активністю протеїну ERN1. Подібні зміни в експресії генів *PHGDH*, *SHMT1*

та *SHMT2* були також виявлені за умов сайленсінгу лише ERN1, а не XBP1, що вказує на залежність виявлених змін в експресії цих генів саме від протеїнкіназної активності ERN1. А от зміни рівня експресії гена *ATF4* у клітинах гліобластоми після сайленсінгу ERN1 і XBP1 істотно не відрізнялися за величиною, що свідчило про опосередкованість виявлених змін в експресії цього гена саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1, шляхом утворення XBP1s за участі ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну.

Вестерн блот-аналіз протеїнів PSAT1, PSPH і ATF4 показав зниження рівня всіх цих протеїнів як у клітинах гліобластоми з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну, що узгоджується із виявленими нами змінами рівня експресії відповідних мРНК.

Була проведена оцінка проліферативного потенціалу клітин гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 двома методами (протоковою цитометрією на BD Accuri C6 Flow Cytometer та по рівню ДНК у клітинах) і показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну знижувало проліферативний потенціал таких клітин більше ніж у два рази, а пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 мало значно більший ефект.

Методами біоінформатики було встановлено, що 3'-послідовності мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1 містять сайти зв'язування мікроРНК: miR-145-5p в мРНК PSAT1, miR-429-3p в мРНК PSPH, а miR-218-5p в мРНК SHMT1, причому виявлені зміни в експресії цих мікроРНК є протилежно направлені до змін в експресії відповідних мРНК і можуть бути причетними до регуляції експресії мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1 сигнальними шляхами протеїну ERN1 на пост-трансляційному рівні.

Показано також, що експресія більшості генів, що контролюють синтезу серину, є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії більшості із них збільшується, особливо таких генів як *PHGDH* і *ATF4*, а інших генів –

зменшується у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Разом з тим, у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною та протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1 чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4* до впливу гіпоксії змінюється, що переконливо свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії цих генів. Отримані результати є підґрунтям для вивчення механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулула.

Було також показано, що рівень експресії майже всіх досліджених нами генів, що контролюють синтез серину, змінюється як за умов дефіциту глютаміну, так і глюкози, але по-різному, і що пригнічення обох ензиматичних (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної) активностей сигнального протеїну ERN1 істотно модифікує їх ефект, але ці модифікації мають генно-специфічний характер. Так, у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми за умов дефіциту глютаміну збільшується рівень експресії таких генів як *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4*. Разом з тим, рівень експресії гена *SHMT1* різко знижується у контрольних клітинах гліобластоми за цих умов. Встановлено також, що чутливість експресії усіх досліджених генів до дефіциту глютаміну змінюється у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) активностей протеїну ERN1. Так, чутливість таких генів як *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4* до дефіциту глютаміну різко посилюється за умов пригнічення ERN1, а особливо *PSAT1*, тоді як гена *SHMT1* – зменшується. Менш виражені зміни в експресії генів, що контролюють синтезу серину, були виявлені за умов дефіциту глюкози у середовищі у порівнянні з дефіцитом глютаміну. Так, дефіцит глюкози у середовищі призводив до збільшення рівня експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *SHMT2* та *ATF4* у контрольних клітинах гліобластоми, тоді як експресія гена *PSPH* істотно не змінювалася, а гена *SHMT1* – зменшувалася. Разом з тим, пригнічення ERN1 також істотно змінювало

чутливість експресії усіх досліджених генів до дефіциту глюкози у середовищі, а особливо *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2* та *ATF4*. Ці результати чітко вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Наукова новизна цієї роботи в тому, що вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів, що контролюють синтезу серину, у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, та що виявлені зміни в експресії досліджених генів були генно-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Виявлена також посилена експресія генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами, яка є важливою умовою посиленого росту злоякісних пухлин, а виявлене нами зниження експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах з пригніченою функціональною активністю ERN1 добре узгоджується зі зниженим їх проліферативним потенціалом. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеазної активності ERN1 у регуляції експресії гена *ATF4*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цього гена істотно не відрізнявся за величиною. Вперше показано, що саме протеїнкізна активність ERN1 є важливим регулятором експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*, оскільки інгібування ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотно не впливало на рівень їх експресії і лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей протеїну ERN1 змінювався рівень експресії цих генів.

Вперше показано, що експресія всіх генів, що контролюють синтез серину, є чутливою до гіпоксії у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін. Встановлено також, що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкізнаї

активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* і *ATF4* до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі й клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні чутливості експресії генів, які забезпечують синтезу серину, до дефіциту як глютаміну, так і глюкози, і що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, посилює чутливість усіх досліджених генів до цих експериментальних умов за винятком гена *SHMT1*. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глютаміном.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні ролі ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей ERN1 у регуляції експресії генів, задіяних у синтезі і метаболізмі серину, пригнічення яких може бути причетним до зниження проліферативного потенціалу клітин гліобластоми, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК *PSAT1*, *PSPH* та *SHMT1* на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, що важливо для розробки нових підходів до терапії злоякісних пухлин.

Ключові слова: синтез серину, експресія генів, РНК, гліобластома, ендоплазматичний ретикулум, пригнічення ERN1, гіпоксія, глютамін, глюкоза, промотор, пухлинні клітини, мембрана, АСТВ, ПЛР, ядро.

ANNOTATION

Sliusar M.Y. Molecular mechanisms of the serine synthesis gene regulation in glioma cells.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to the study of the mechanisms of regulating the expression of serine synthesis genes, which plays an important role in the growth of various malignant tumors, including glioblastoma, as it is involved in many metabolic cycles. The main attention was focused on elucidating the role of endoplasmic reticulum stress and hypoxia in regulating the expression of serine synthesis genes, since these factors are important for tumor growth. For this, experiments were conducted using genetically modified glioblastoma cells of the U87MG line, which had suppressed enzymatic activity of ERN1/IRE1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1/inositol-requiring enzyme 1), the main sensor-signaling protein of endoplasmic reticulum stress, and reduced proliferative activity. This is due to the need to clarify the molecular mechanisms of reducing the intensity of proliferation of such glioblastoma cells. The effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the expression of serine synthesis genes in glioma cells was also investigated, depending on the functional activity of the ERN1 signaling protein.

The relevance of this topic is due to the fact that oncological diseases rank second in the world in terms of mortality and their number is constantly increasing with a noticeable lack of effective treatment. Glioblastomas are the most malignant and quite common primary brain tumors, which are difficult to treat and are characterized by a short life expectancy of patients. And that is why intensive search for fundamentally new approaches to deciphering the molecular bases of the pathogenesis of glioblastoma, as well as other malignant tumors, is important and

necessary for improving existing and creating new promising strategies for anticancer therapy.

Endoplasmic reticulum stress and hypoxia are extremely important factors in the intensive growth of malignant tumors, which reprogram the genome of tumor cells to increase the supply of nutrients to tumors by activating angiogenesis, developing resistance of tumor cell to various toxic substances, including the toxic effects of hypoxia. In this regard, a detailed study of the regulatory mechanisms underlying these processes will contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms of the growth of malignant tumors and the search for fundamentally new approaches to combating them.

An equally important factor in the growth of malignant tumors is the amino acid serine, which is involved in the regulation of numerous metabolic processes in both normal and tumor cells. Moreover, for the intensive growth of many malignant tumors, it is not so much the level of this amino acid in cells that is important, but its enhanced synthesis. Therefore, knowledge of the molecular mechanisms of regulation of serine synthesis during malignant growth by signaling pathways of endoplasmic reticulum stress and hypoxia is quite important in the search for molecular targets to combat malignant tumor growth.

An important and fundamentally new moment of this work was the clarification of the involvement of the ERN1/IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of the expression of genes that control the synthesis of serine, including the role of endoribonuclease and protein kinase activities of this signaling protein in realizing its effect on gene expression. A separate task of the work was to investigate the effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the gene expression level of key enzymes of serine synthesis in glioblastoma cells depending on IRE1 inhibition, as this inhibition leads to a decrease in tumor cell proliferation and has a pronounced anti-tumor effect.

In the course of the work, modern methods of biochemistry and molecular biology were used. This is the cultivation of three stably transfected sublines: 1)

control U87MG glioblastoma cells transfected with an empty vector, 2) U87MG cells with only the endoribonuclease activity of ERN1 inhibited, and 3) cells without both enzymatic activities of this signaling protein (endoribonuclease and protein kinase), as well as methods of RNA isolation from these glioblastoma cells, measurement of RNA concentration, and their spectral characteristics using a nano-spectrophotometer. To determine the expression of genes, complementary DNA synthesis was first carried out by reverse transcription, and then the mRNA expression level of serine synthesis enzymes, as well as the transcription factor ATF4, which controls the transcription of PSAT1, was determined by the method of real time quantitative polymerase chain reaction. A special method was used to determine miRNA expression, including microRNA polyadenylation, reverse transcription, and amplification. ERN1 and XBP1 mRNA silencing methods were also used to create a model of inhibition of both enzymatic activities of ERN1 or only the main function of the endoribonuclease activity of this protein, namely XBP1 splicing. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Bioinformatics methods were used to analyze the possible mechanisms of expression regulation of the studied genes, and the obtained results were processed statistically.

To find out the role of the signaling protein ERN1 and its enzymatic activities (endoribonuclease and protein kinase), we studied the expression of genes encoding such enzymes of serine synthesis as PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), PSAT1 (phosphoserine aminotransferase 1), PSPH (phosphoserine phosphatase), SHMT1 (serine hydroxymethyltransferase 1) and SHMT2 (serine hydroxymethyltransferase 2). To find out the mechanisms of regulation of the expression level of the PSAT1 gene, the expression of the transcription factor ATF4 (activating transcription factor 4), which controls *PSAT1* gene expression and is dependent on endoplasmic reticulum stress, was studied.

To study the molecular mechanisms of the dependence of the expression of serine synthesis genes on the stress of the endoplasmic reticulum and in particular its signaling pathway ERN1 in glioblastoma cells, studies were carried out on cells

with suppressed enzymatic activities (protein kinase and endoribonuclease) of ERN1 and under conditions of inhibition of only the endoribonuclease of this signaling pathway protein. The dependence of the expression of serine synthesis genes in glioblastoma cells on the functional activity of IRE1 and the possible contribution of these genes to the anti-proliferative effect of IRE1 inhibition was revealed. It was also established that the expression of serine synthesis genes is sensitive to hypoxia conditions and glutamine and glucose deficiency, depending on the functional activity of the signaling protein ERN1.

The obtained results demonstrated that the expression of PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1, SHMT2 and ATF4 genes, which control serine synthesis, depends on the ERN1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress and affects the proliferation of glioblastoma cells.

Also, the dependence of the effects of hypoxia and glutamine or glucose deficiency, which are important factors in tumor growth control, on the expression of these genes on the functional activity of the IRE1 signaling protein was established. Thus, it was shown that inhibition of both enzymatic activities of this signaling protein of endoplasmic reticulum stress in glioblastoma cells of the U87MG line changed the expression level of all the genes we studied genes controlling the synthesis of serine. It was established that the detected changes were different both in magnitude and direction, and that this is due to the peculiarities of the regulation of the expression of the studied genes by the signaling protein IRE1, as well as their functional value, and this reflects the reprogramming of the genome as a result of the inhibition of one of the endoplasmic reticulum stress signaling pathways.

Thus, the level of expression of the PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT2, and ATF4 genes decreased, and the SHMT1 gene significantly increased in glioblastoma cells under conditions of inhibition of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein. Similar changes in the expression of genes controlling the synthesis of serine were also detected under conditions of ERN1 silencing, which indicates the dependence of changes in the expression of the genes we studied on

ERN1, and not on the method of its suppression. The enzymatic activity of PHGDH was also determined and the activity of this enzyme decreased in glioblastoma cells under the conditions of inhibition of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein.

At the same time, under the conditions of inhibition of only the endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein, the expression level of PSAT1 and PSPH genes changed differently in glioma cells with different types of inhibition of the enzymatic activities of the ERN1 signaling protein, which indicates the participation of both ERN1 enzymatic activities in this regulation, their interaction through signaling pathways mediated by them. At the same time, changes in the expression level of the ATF4 gene in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein did not differ significantly in value, which indicated that the detected changes in the expression of these genes were mediated by endoribonuclease rather than protein kinase activity of ERN1. Among the genes we studied, which control the synthesis of serine, there were also those whose expression level changed only under conditions of suppression of both enzymatic activities of ERN1 and did not change in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein. These are the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes. These results indicate that the detected changes in their expression are mediated by the protein kinase activity of the ERN1 protein. Similar changes in the expression of the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes were also detected under the conditions of silencing only ERN1, but not XBP1, which indicates the dependence of the detected changes in the expression of these genes precisely on the protein kinase activity of ERN1. However, the changes in the expression level of the ATF4 gene in glioblastoma cells after ERN1 and XBP1 silencing did not differ significantly in magnitude, which indicated that the detected changes in the expression of this gene were mediated by the endoribonuclease, and not the protein kinase, activity of ERN1, through the formation of XBP1s with the participation of the endoribonuclease activity of this signaling protein.

Western blot analysis of PSAT1, PSPH, and ATF4 proteins showed a decrease in the level of all these proteins both in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of ERN1 and in cells without both enzymatic activities of this signaling protein, which is consistent with the changes in the expression level of the corresponding mRNAs we detected.

The proliferative potential of glioblastoma cells with suppressed ERN1 was evaluated by two methods (flow cytometry on a BD Accuri C6 Flow Cytometer and by the level of DNA in the cells) and it was shown that inhibition of both enzymatic activities of this signaling protein reduced the proliferative potential of such cells by more than two times and inhibition of ERN1 endoribonuclease activity alone had a significantly greater effect.

Using bioinformatics methods, it was established that the 3'-sequences of PSAT1, PSPH, and SHMT1 mRNAs contain microRNA binding sites: miR-145-5p in PSAT1 mRNA, miR-429-3p in PSPH mRNA, and miR-218-5p in SHMT1 mRNA, and the detected changes in the expression of these microRNAs are oppositely directed to the changes in the expression of the corresponding mRNAs and may be involved in the regulation of mRNA expression of PSAT1, PSPH, and SHMT1 signaling pathways of the ERN1 protein at the post-translational level.

It was also shown that the expression of most genes controlling serine synthesis is sensitive to hypoxia, and the expression level of most of them increases, especially genes such as PHGDH and ATF4, and other genes decrease in control glioblastoma cells transfected with an empty vector. At the same time, in cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1, the sensitivity of the PHGDH, PSAT1, PSPH, and ATF4 genes to the influence of hypoxia changes, which convincingly indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of these genes. The obtained results are the basis for elucidating the mechanisms of tumor cell resistance to the toxic effects of hypoxia under conditions of endoplasmic reticulum stress.

It was also shown that the level of expression of almost all the genes we studied, which control the synthesis of serine, changes both under conditions of glutamine and glucose deficiency, but differently, and that inhibition of both enzymatic (endoribonuclease and protein kinase) activities of the signaling protein ERN1 significantly modifies their effect, but these modifications are gene-specific. Thus, in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, the level of expression of such genes increases under conditions of glutamine deficiency of *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4*. However, the *SHMT1* gene expression level is dramatically reduced in control glioblastoma cells under conditions of glutamine deficiency. It was also established that the sensitivity of the expression of all these genes to glutamine deficiency changes in glioblastoma cells under conditions of suppression of both (endoribonuclease and protein kinase) activities of the ERN1 protein. Thus, the sensitivity of such genes as *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4* to glutamine deficiency is sharply increased under the conditions of suppression of ERN1, and especially *PSAT1*, while the *SHMT1* gene is decreased. Less pronounced changes in the expression of genes that control the synthesis of serine were detected under conditions of glucose deficiency in the medium compared to glutamine deficiency. Thus, the lack of glucose in the environment led to an increase in the level of expression of the *PHGDH*, *PSAT1*, *SHMT2* and *ATF4* genes in control glioblastoma cells, while the expression of the *PSPH* gene did not change significantly, and the expression of the *SHMT1* gene decreased. However, suppression of ERN1 also significantly changed the sensitivity of expression of all studied genes to glucose deficiency in the medium, especially *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT2*, and *ATF4*. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The scientific novelty of this work is that, for the first time, pronounced changes in the level of expression of genes controlling the synthesis of serine were detected in the culture of glioblastoma cells of the U87MG line under conditions of suppression of IRE1/ERN1, of the main endoplasmic reticulum stress signaling

pathway, and the detected changes in the expression of the studied genes were gene-specific and depended on the type of ERN1 knockdown. Increased expression of serine synthesis genes in glioblastoma cells compared to normal astrocytes was also detected, which is an important condition for enhanced growth of malignant tumors, and the decrease in expression of genes that control serine synthesis in cells with suppressed functional activity of ERN1 is well consistent with their reduced proliferative potential. The obtained results demonstrated the important role of endoribonuclease ERN1 in the regulation of ATF4 gene expression, because both in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1, and in cells without both enzymatic activities of ERN1, the level of expression of this gene did not differ significantly in size. It was shown for the first time that the protein kinase ERN1 is the key regulator of the expression of the PHGDH, SHMT1, and SHMT2 genes, since their expression level changed only under the conditions of inhibition of both (endoribonuclease and protein kinase) activities of the ERN1 protein, and inhibition of the endoribonuclease activity of this signaling protein did not significantly affect their level expression.

It is also shown for the first time that the expression of all genes controlling the synthesis of serine is sensitive to hypoxia in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, and the level of expression of these genes changes differently both in the magnitude of the effect and in the direction of changes. It was also established that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1 changes the sensitivity of the PHGDH, PSAT1, PSPH, and ATF4 genes to hypoxia, and this indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes we studied. The basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells, including glioblastoma cells, to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

Fundamentally new results were obtained when studying the sensitivity of the expression of genes that ensure the synthesis of serine to the deficiency of both glutamine and glucose, and that inhibition of both enzymatic activities of ERN1,

the main signaling protein of endoplasmic reticulum stress, increases the sensitivity to these experimental conditions of all genes under except SHMT1. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The practical significance of the obtained results lies in revealing the role of protein kinase ERN1 in the regulation of the expression of genes controlling the synthesis of serine, the suppression of which may be involved in reducing the proliferative potential of glioma cells, as well as in the identification of microRNAs that control the expression of PSAT1, PSPH and SHMT1 mRNA at the post-translational level and can be potential targets for inhibiting the proliferation of glioblastoma cells. The ERN1-dependent sensitivity of glioblastoma cells to hypoxia revealed by us is the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under conditions of endoplasmic reticulum stress, which is important for the development of new approaches to the therapy of malignant tumors.

Keywords: serine synthesis, gene expression, RNA, glioblastoma, endoplasmic reticulum, ERN1 inhibition, hypoxia, glutamine, glucose, promoter, tumor cells, membrane, ACTB, PCR, nuclei.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації:

1. **Slusar MY**, Minchenko DO, Khita OO, Tsymbal DO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Ratushna OO, Minchenko OH. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. *Endocrine Regulations*, 2023, 57(4): 252-261. doi:10.2478/enr-2023-0028. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті).* Дмитро Мінченко і Олена Хіта допомагали у

вивченні експресії генів *SHMT1* та *ATF4*. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Юлія Вілецька, Сергій Даніловський та Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

Scopus i PubMed (Q3)

2. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khikhlo YP, Halkin OV, Viletska YM, Khita OO, Minchenko DO. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. Arch Biochem Biophys, 2024, 759: 110104. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104>. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко і Євген Хіхло допомагали у вивченні експресії генів *PHGDH* та *ATF4*. Олена Хіта, Олег Галкін та Юлія Вілецька приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus, Web of Sciences (Q1)**

3. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Minchenko DO, Viletska YM, Halkin OV, Levadna LO, Cherednychenko AA, Khikhlo YP. Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells. Endocrine Regulations, 2024, 58(1): 91-100. doi:10.2478/enr-2024-0010. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка даних та участь у написанні статті)*. Анастасія Чередниченко і Євген Хіхло допомагали у вивченні експресії генів *SHMT1* та *ATF4*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Олег Галкін, Людмила Левадна та Дмитро Мінченко приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed (Q3)**

4. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Minchenko DO. Endoplasmic reticulum stress-dependent

regulation of the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. *Endocr Reg*, 2024, 58(2): 1-9. doi:10.2478/enr-2024-001x. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена SHMT2 за умов пригнічення ERN1, гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози, обробка даних та участь у написанні статті*). Дмитро Мінченко допомагав у вивченні регуляції експресії цього гена за дефіциту глюкози. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Лузіна та Сергій Даніловський приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed (Q3)**

5. **Слюсар М.**, Хіта О. Вплив гіпоксії на експресію генів, що відповідають за біосинтез серину, у клітинах гліоми з пригніченим ERN1. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 42-43.

6. Khita O, **Slusar M**, Viletska Y, Minchenko O. Downregulation of the expression of genes responsible for serine synthesis may contribute to suppression of glioma cell proliferation introduced by ERN1 inhibition. *FEBS Open Bio*, 2023, 13 (Suppl. S2):64. doi: 10.1002/2211-5463.13646. The 47th FEBS Congress, July 8-12, 2023, Tours, France.

7. Minchenko DO, Khita OO, **Slusar MY**, Krasnytska DA, Viletska YM, Cherednychenko AA, KhikhloYP, Minchenko OH. Hydrocortisone modifies the impact of tunicamycin, thapsigargin, and hypoxia on the expression of ATF3 and other transcription factors in normal human astrocytes and U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 73.

8. **Slusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of PSAT1, PSPH, and PHGDH mRNA expressions in U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 79.

9. **Sliusar MY**, Minchenko OH. The endoplasmic reticulum stress controls the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 54.

10. Abramchuk AI, **Sliusar MY**, Minchenko OH. Regulation of carboxypeptidase E expression in glioblastoma cells is controlled by ERN1. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology", Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 48-50.

11. Khikhlo EP, **Sliusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown disrupts the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and associated genes in glioblastoma cells. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology", Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 53-54.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	25
Вступ	27
Розділ 1. Огляд літератури	36
1.1. Синтез серину та його роль у регуляції метаболізму за злоякісного росту	36
1.2. Ключова роль транскрипційних факторів у регуляції синтезу серину	41
1.3. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в рості злоякісних пухлин	43
1.4. Роль гіпоксії в онкогенезі і молекулярні основи гіпоксичної регуляції експресії генів	51
1.5. Залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від стресу ендоплазматичного ретикулума	54
1.6. Роль глюкози і глутаміну в рості злоякісних пухлин	56
1.7. МікроРНК як важливі регулятори експресії генів та метаболічних процесів, їх участь в онкогенезі	57
Розділ 2. Матеріали та методи	59
2.1. Матеріали та умови проведення експериментів	59
2.2. Методи дослідження	60
2.2.1. Культивування клітин гліобластоми	60
2.2.2. Виділення РНК з культури клітин	61
2.2.3. Нано-спектрофотометричне визначення концентрації РНК та її спектральних характеристик	61
2.2.4. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції	62
2.2.5. Ампліфікація кДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі	63
2.2.6. Визначення рівня експресії мікроРНК за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі	65
2.2.7. Сайленсінг мРНК ERN1 та XBP1	66

	24
2.2.8. Визначення ензиматичної активності PHGDH	67
2.2.9. Вестерн-блот аналіз	67
2.2.10. Дослідження інтенсивності проліферації клітин	68
2.2.11. Біоінформаційний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК та транскрипційних факторів із промоторними ділянками генів	68
2.2.12. Статистична обробка отриманих результатів	69
Розділ 3. Результати досліджень	70
3.1. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами людини	70
3.2. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1	72
3.3. Вплив гіпоксії на рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми	95
3.4. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну	102
3.5. Особливості експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози	109
3.6. Біоінформаційний аналіз молекулярних механізмів регуляції експресії генів біосинтезу серину у клітинах гліобластоми	115
3.7. Рівень експресії мікроРНК у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1	119
Розділ 4. Обговорення результатів	121
Висновки	131
Список використаних джерел	133
Додаток 1.	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF6	– activating transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)
ATF4	– activating transcription factor 4 (активуючий транскрипційний фактор 4)
ERN1/IRE1	– endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 / inositol-requiring enzyme 1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1 / ензим, залежний від інозитулу 1)
dnERN1	– dominant negative ERN1 (генетично модифікований варіант сигнального протеїну ERN1, позбавлений протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей)
dnrERN1	– dominant negative ERN1 (генетично модифікований варіант сигнального протеїну ERN1, позбавлений ендорибонуклеазної активності)
siERN1	– small interfering RNA against human ERN1 (мала інтерферуюча РНК проти ERN1 людини)
ERAD	– endoplasmic reticulum associated degradation (асоційована з ендоплазматичним ретикуломом деградація)
PERK	– PRK-like endoplasmic reticulum kinase (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума)
PHGDH	– phosphoglycerate dehydrogenase (фосфогліцератдегідрогеназа)
PSAT1	– phosphoserine aminotransferase 1 (фосфосеринамінотрансфераза 1)
PSPH	– phosphoserine phosphatase (фосфосеринфосфатаза)
PHD1	– HIF-Prolyl Hydroxylase 1 (HIF-пролілгідроксилаза 1)
PHD2	– HIF-пролілгідроксилаза 2
PHD3	– HIF-пролілгідроксилаза 3
SHMT1	– serine hydroxymethyltransferase 1

	(серингідроксиметилтрансфераза 1)
SHMT2	– serine hydroxymethyltransferase 2
	(серингідроксиметилтрансфераза 2)
XBP1	– X-box binding protein 1 (Х-бокс зв'язуючий протеїн)
XBP1s	– alternative splice variant of the X-box binding protein 1 (альтернативний сплайс-варіант Х-бокс зв'язуючого протеїну)
siXBP1	– small interfering RNA against human XBP1 (мала інтерферуюча РНК проти XBP1 людини)
UPR	– unfolding protein response (відповідь на незгорнуті протеїни)

ВСТУП

Актуальність теми. Вияснення молекулярних механізмів регуляції біохімічних і фізіологічних процесів на рівні експресії генів за різноманітних патологічних станів є надзвичайно важливим напрямком досліджень, оскільки виявляє молекулярні основи розвитку порушень метаболізму в організмі та сприяє пошуку принципово нових шляхів профілактики і терапії численних захворювань, у тому числі й онкологічних патологій, які посідають друге місце за рівнем захворюваності та смертності у світі. Важливо відмітити, що кількість онкологічних захворювань, і гліобластом зокрема, увесь час зростає, а ефективного лікування так і не вдалося розробити.

Гліобластома є найпоширенішою та найагресивнішою злоякісною первинною пухлиною головного мозку з обмеженою реакцією на стандартне лікування та супутню хімічну і променеву терапію [1, 2]. На даний час, для лікування хворих з гліобластомою проводять операційне видалення пухлин з подальшим опроміненням та терапією хімічними препаратами, головним із яких є темозоломід, але тривалість життя таких хворих пацієнтів є короткою і не перевищує навіть трьох років [3-5]. Варто відмітити, що гліобластома відносно рідко метастазує з мозку, а злоякісні пухлини з інших органів набагато частіше метастазують у мозок [5]. А тому, для покращення існуючих і створення нових перспективних підходів терапії та профілактики цих злоякісних пухлин важливим є детальне вияснення молекулярно-генетичних механізмів, які лежать в основі патогенезу гліобластом, цих найбільш злоякісних пухлин головного мозку.

Клітини різних злоякісних пухлин, у тому числі й клітини гліобластоми, характеризуються нестабільністю геному і тотальним перепрограмування процесів обміну речовин, що необхідно для забезпечення різноманітних синтетичних та енергетичних потреб пухлинних клітин [6-8].

Оскільки всі пухлинні клітини постійно перебувають під впливом підвищеної експресії генів синтезу серину та численних онкогенів, а також гіпоксії, нестачі поживних речовин, зокрема глюкози і глутаміну, то це призводить до виражених порушень гомеостазу [9-11]. У свою чергу, порушення гомеостазу призводить до акумуляції неправильно згорнутих чи незгорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума (ЕР), розвитку стресового стану в ньому та запуску адаптивних реакцій, котрі відомі як UPR (відповідь на незгорнуті протеїни), шляхом активації сенсорно-сигнальних систем стресу ЕР [10, 12, 13]. Саме ендоплазматичний ретикулум є тим спеціалізованим органоїдом клітин, який чітко контролює пост-трансляційні модифікації трансмембранних та секреторних протеїнів і правильне формування їх просторової структури, причому саме ензими, що відповідають за пост-трансляційну модифікацію, і є сенсорами змін клітинного гомеостазу [10, 14].

Відомо, що проліферація та виживання пухлинних клітин залежить від численних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, їх багатогранної взаємодії, а також перебудови енергетичного метаболізму у клітинах злоякісних пухлин і тісної їх взаємодії з мікрооточенням [10, 12, 14]. Разом з тим, тривалий час зусилля вчених у пошуку молекулярних підходів цілеспрямованої терапії злоякісних пухлин були направлені на виявлення індивідуальних генів-мішеней. Численними дослідженнями встановлено, що стрес ЕР та гіпоксія є важливими факторами росту різних злоякісних пухлин, оскільки вони індукують ангіогенез та контролюють розвиток резистентності клітин до апоптозу, а саме це і є необхідним для забезпечення посиленої проліферації та виживання пухлинних клітин, у тому числі й клітин гліобластоми, навіть у жорстких умовах їх мікрооточення [12-15].

Для вияснення детальних молекулярних механізмів прогресії злоякісних пухлин і пошуку принципово нових шляхів боротьби з ними доцільно провести більш глибоке вивчення регуляторних механізмів, які опосередковують стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксію і є критично важливими факторами посиленого росту злоякісних пухлин

шляхом перепрограмування геному для неоангіогенезу, посиленого забезпечення пухлини поживними речовинами, резистентності пухлинних клітин до різноманітних токсичних сполук, у тому числі і до лікарських препаратів та токсичних ефектів гіпоксії [10, 14, 15].

Протеїн ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1), який ще часто називають IRE1 (ензим, залежний від інозитулу 1), представляє собою дуже важливий сенсорно-сигнальний шлях стресу ЕР і має дві ензиматичні активності (протеїнкіназу та ендорибонуклеазу) [10, 14]. Саме цей сигнальний шлях стресу ЕР контролює проліферацію клітин та ангіогенез і є відповідальним за розвиток резистентності клітин гліобластоми, як і інших пухлинних клітин, до різних впливів, то зусилля вчених були направлені на пригнічення росту пухлин шляхом інгібування ензиматичних активностей цього сенсорно-сигнального шляху стресу ЕР [15-21]. Було показано, що зниження ензиматичних активностей ERN1 зменшує інтенсивність проліферації клітин гліобластоми і ріст пухлин із таких клітин на курячих ембріонах та у мозку мишей, а також посилює чутливість до хіміотерапії [15-17, 19, 21]. У зв'язку з цим, на сьогоднішній день специфічні інгібітори ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 є перспективними кандидатами для створення лікарських препаратів, націлених на пригнічення росту гліобластом та інших злоякісних пухлин [17, 19, 20].

Відомо, що стрес ендоплазматичного ретикулума і гіпоксія перепрограмовують геном у клітинах злоякісних пухлин шляхом змін в експресії ключових регуляторних факторів та ензимів, що контролюють інтенсивність протікання численних метаболічних процесів [10, 17, 21, 22]. У цьому плані важливу роль відіграє також забезпечення пухлинних клітин підвищеним синтезом серину, а також глюкозою і глутаміном, які важливі для росту більшості злоякісних пухлин і в першу чергу гліобластом [23-29]. Більше того, для деяких злоякісних пухлин показано, що їх ріст вимагає не

стільки певного рівня серину у клітинах, скільки наявності ефективного синтезу цієї амінокислоти [30, 31].

Саме тому, для в'ясування ролі синтезу серину у проліферації клітин гліобластоми було актуальним провести дослідження по експресії генів, відповідальних за синтез серину, у нормальних і пухлинних клітинах за умов пригнічення активності сигнального протеїну ERN1, а також за гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози.

Мета і завдання роботи

Мета роботи: дослідити експресію генів синтезу серину у контрольних клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами, а також у генетично модифікованих клітинах гліобластоми з пригніченою функціональною активністю ERN1 та за дії гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Визначити рівень експресії генів синтезу серину у контрольних клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами людини.
2. Дослідити вплив пригнічення функціональної активності ERN1 у клітинах гліобластоми на рівень експресії генів синтезу серину.
3. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення сигнального протеїну ERN1.
4. Дослідити вплив дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів синтезу серину у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення активності ERN1.
5. Провести біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів синтезу серину на сайти зв'язування HIF і XBP1s та 3'-нетранслюємих ділянок мРНК цих транскрипційних факторів на наявність сайтів зв'язування

мікроРНК. Дослідити вплив пригнічення активності ERN1 на експресію мікроРНК.

Об’єкт дослідження: молекулярні механізми регуляції експресії генів, причетних до синтезу серину, та деяких мікроРНК за умов пригнічення активності ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за гіпоксії, дефіциту глутаміну чи глюкози.

Предмет дослідження: рівень експресії генів синтезу серину і деяких мікроРНК у клітинах гліобластоми U87MG в залежності від пригнічення активності ERN1, а також за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну.

Методи дослідження. У ході виконання дисертаційної роботи була використана низка сучасних методів біохімії і молекулярної біології: культивування генетично модифікованих клітин гліобластоми (з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною та протеїнкіназною) і клітини лише без ендорибонуклеазної активності, сайленсінг мРНК, виділення РНК, визначення її концентрації та спектральних характеристик за допомогою нано-спектрофотометра, синтез комплементарних ДНК зворотною транскриптазою. Для визначення рівня експресії мРНК і мікроРНК були використані методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, підбору специфічних праймерів, електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації в агарозному гелі та статистичної обробки результатів. Для виявлення можливих механізмів регуляції експресії генів були використані методи біоінформатики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше була виявлена залежність рівня експресії генів, що контролюють синтезу серину, від пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума. Встановлено, що виявлені зміни в експресії досліджених генів у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG були генно-специфічними, причому для більшості генів були різними у клітинах без обох ензиматичних

активностей ERN1 і клітинах без ендорибонуклеази ERN1. Виявлене нами зниження експресії генів, які контролюють синтез серину, у клітинах з пригніченою функціональною активністю ERN1 добре узгоджуються з їх зниженим проліферативним потенціалом, оскільки посилення експресії ензимів синтезу серину є важливою умовою посиленого росту злоякісних пухлин. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 у регуляції експресії гена *ATF4*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цього гена істотно не відрізнявся за величиною. Вперше показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є важливим регулятором експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*, оскільки інгібування ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотно не впливало на рівень їх експресії, і лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей протеїну ERN1 (протеїнкіназної і ендорибонуклеазної) рівень експресії цих генів змінювався.

Вперше показано, що експресія всіх генів, що контролюють синтез серину, є чутливою до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих порожнім вектором, причому зміни рівня їх експресії були різними як за величиною ефекту, так і за напрямком змін для всіх цих генів. Встановлено також, що пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4* до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі і клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні чутливості експресії генів, які забезпечують синтез серину, до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1

посилює чутливість усіх генів до цих експериментальних умов за винятком *SHMT1*. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні ролі протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей ERN1 у регуляції експресії генів, причетних до синтезу серину, пригнічення яких може бути причетним до зниження проліферативного потенціалу клітин гліоми, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1 на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за стресу ендоплазматичного ретикулума, що має важливе значення при розробці нових підходів до лікування злоякісних новоутворень.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене авторкою відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2022 – 2025 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження по вивченню рівня експресії генів, причетних до синтезу серину, у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і його залежності від типу пригнічення ензиматичних активностей протеїну ERN1. Авторкою були проведені дослідження по виявленню можливої ролі ERN1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у гіпоксичній регуляції експресії генів, відповідальних за синтез серину, та за умов дефіциту глюкози і глутаміну, а також здійснено біоінформаційний аналіз промоторів досліджених генів на наявність сайтів зв'язування транскрипційних факторів NIF та XBP1s, статистичну обробку отриманих результатів і їх узагальнення. Студентка Анастасія ЧЕРЕДНИЧЕНКО допомагала у проведенні деяких

досліджень. Окремі дослідження по визначенню рівня експресії певних генів проводилися за участі к.м.н. Дмитра МІНЧЕНКА і доктора філософії Олени ХІТИ. Олег ГАЛКІН, Дарія ЦИМБАЛ, Ольга ЛУЗІНА, Дмитро МІНЧЕНКО, Юлія ВІЛЕЦЬКА, Ольга РУДНИЦЬКА, Сергій ДАНИЛОВСЬКИЙ, Людмила ЛЕВАДНА, Оксана РАТУШНА та Євген ХІХЛО приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статей до друку. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра МІНЧЕНКА.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2022–2025 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетною темою: “Молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в перепрограмуванні геному клітин гліоми”, № ДР 0121U100662 (2021–2025 рр.).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях: The 5th and 6th Int. Sci. Conf. “Current Problems Biochem., Cell Biol. Physiol”, Dnipro, October, 2022 і 2024; The 47th FEBS Congress, July 8-12, 2023, Tours, France; 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023, BRIC, Bordeaux University, Talence, France, 2023; та XVIII Всеукраїнська конференція молодих вчених ІМБіГ НАН України, 21-22 травня, 2024, Київ.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 робіт, з них 4 статті в іноземних фахових наукових виданнях, представлених у базах Scopus, WoS і PubMed, та 7 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і конгресі.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 166 сторінках друкованого тексту, складається із анотації, вступу, огляду

літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних джерел літератури, що включає 205 посилань. Робота містить 53 рисунки та 4 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Стрес ендоплазматичного ретикулума, гіпоксія та посилене забезпечення злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, поживними речовинами є надзвичайно важливими факторами інтенсивного їх росту [8, 10, 11]. Ці фактори змінюють метаболізм пухлинних клітин шляхом перепрограмування геному для ангіогенезу і посиленого гліколізу, а також для розвитку резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до лікарських препаратів [6, 11, 14, 21, 22]. Відомо, що серин є дуже важливим для підтримання пухлинного росту, він багатогранно задіяний у процесах їх росту, причому для деяких злоякісних пухлин було встановлено, що їх ріст вимагає не стільки певного рівня серину у клітинах, скільки наявність ефективного синтезу цієї амінокислоти, а пригнічення ензимів синтезу серину істотно знижує інтенсивність проліферації пухлинних клітин [27-34]. Відомо, що пригнічення стресу ендоплазматичного ретикулума, як і дефіцит глюкози та глутаміну знижують інтенсивність росту пухлин і зменшують резистентність пухлинних клітин до лікарських препаратів та токсичних ефектів гіпоксії [11, 15, 21, 23, 24, 26].

1.1. Синтез серину та його роль у регуляції метаболізму у злоякісних пухлинах

Серин є незамінною амінокислотою, яка відіграє важливу роль у численних клітинних процесах як у нормі, так і за різноманітних патологій, у тому числі й онкопатологій. Ця амінокислота може утворюватися у клітинах організму з гліцину за участі серингідроксиметилтрансферази (SHMT), що каталізує перенесення одного вуглецю з 5,10-метилентетрагідрофолату (5,10-MTHF) на гліцин, утворюючи тетрагідрофолат (THF) і L-серин, причому ця реакція є зворотною, а також із 3-фосфогліцерату (3-PG). Синтез серину з 3-

фосфогліцерату відбувається в три кроки за участі таких ензимів як фосфогліцератдегідрогеназа (PHGDH), фосфосеринамінотрансфераза (PSAT1) та фосфосеринфосфатаза (PSPH) [35, 36].

Першим кроком синтезу серину *de novo* з 3-PG є його перетворення у 3-фосфогідроксипіруват, що каталізується фосфогліцератдегідрогеназою PHGDH. Подальший синтез 3-фосфосерину з 3-фосфогідроксипірувату відбувається за участі ензиму PSAT1. На завершення фосфосеринфосфатаза каталізує утворення L-серину із 3-фосфосерину [36].

Вважається, що серин має унікальне фізіологічне значення і його роль є більшою за багато інших амінокислот (Рис. 1.1) [35]. Так, добре відомою є участь L-серину в регуляції нейротрансмісії, циклу фолієвої кислоти, синтезу протеїнів, сфінголіпідів, фосфатидилсерину, тощо [35].

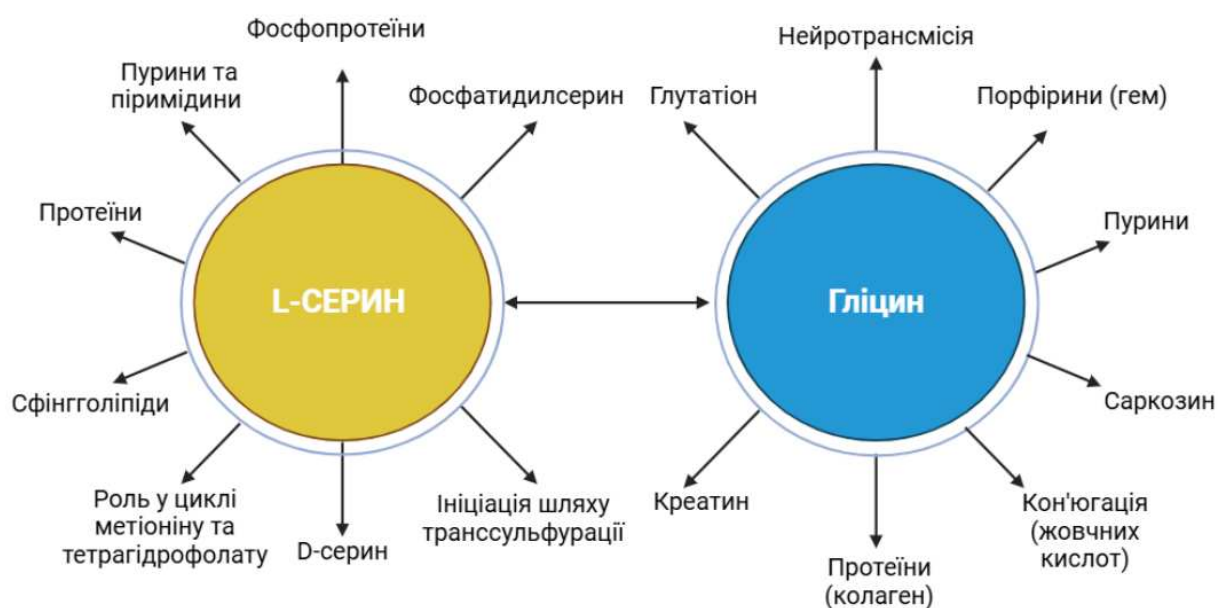


Рис. 1.1. Схематичне зображення основних функцій L-серину у клітинах організму [35].

Відомо, що L-серин є складовою каталітичних центрів більш ніж 200 ензимів, включаючи трипсин, хімотрипсин, ліпопротеїн тощо [35]. Іншою

важливою функцією серину є його участь у циклах фолієвої кислоти і метіоніну, а також він задіяний у метаболізмі фолату, причому за рахунок перетворення серину в гліцин утворюється метилентетрагідрофолат, необхідний для синтезу тимідину та пурину [35, 37]. Ці дані вказують на важливу роль серину в утворенні ДНК і РНК. Фосфатидилсерин та сфінголіпіди, що є похідними серину, забезпечують плинність мембран та правильне функціонування мембранних протеїнів [35].

Результати багатьох досліджень свідчать про важливу роль серину в ініціації та прогресування злоякісних пухлин. Відомо, що метаболічні зміни пухлинних клітин сприяють посиленню синтезу серину, оскільки він є центральним вузлом утворення багатьох молекул [27, 28, 37-40]. І дійсно, активація експресії генів синтезу серину була виявлена у багатьох злоякісних пухлинах, включаючи гліобластому [29, 34, 40]. Оскільки серин задіяний у синтезі пуринових і піримідинових нуклеотидів, для активної проліферації пухлинні клітини потребують його у значно більшій кількості порівняно з нормальними клітинами [29, 30, 32, 33]. Важливо відмітити, що для активного росту деяких злоякісних пухлин потрібен не лише підвищений рівень серину у клітинах, а і активація його синтезу [30, 31].

Посилена експресія ензимів синтезу серину (PHGDH, PSAT1 та PSPH) виявлена у багатьох злоякісних пухлинах, що необхідно для забезпечення їх швидкого росту [30, 41-45]. Було встановлено, що інгібітори PHGDH ефективно пригнічують синтез серину і проліферацію пухлинних клітин, а також ріст та виживання злоякісних пухлин [46, 47]. Клітинний цикл також залежить від ферментів синтезу серину, оскільки активність PHGDH сприяє інгібуванню опосередкованої GSK3 β деградації цикліну D1 в аденокарциномі, а селективне пригнічення PSAT1 зменшує міграцію та інвазію пухлинних клітин, а також експериментальне метастазування [48]. Рівень експресії мРНК PSAT1 контролюється також мікроРНК miR-145-5p, яка специфічно зв'язується з цією мРНК і призводить до пригнічення синтезу серину, а також клітинного циклу та проліферації пухлинних клітин [49].

Значною мірою рівень серину у клітинах злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, контролюється також серингідроксиметилтрансферазами [50-53]. Було показано, що SHMT1 сприяє прогресії гліобластоми шляхом активації сигналювання mTORC1, а під впливом мікроРНК miR-198, яка специфічно взаємодіє з цією гідроксиметилтрансферазою, спостерігається пригнічення проліферації клітин аденокарциноми і посилення їх апоптозу [50, 53]. Але важливу роль у рості злоякісних пухлин відіграє і серингідроксиметилтрансфераза мітохондрій, яка підвищує їх виживання, особливо за умов ішемії, причому нокдаун SHMT2 у різних лініях клітин аденокарциноми шлунку пригнічував їх проліферацію, міграцію, інвазію та утворення колоній [51, 52, 54]. Варто відмітити, що цитозольна ізоформа серингідроксиметилтрансферази (SHMT1) і серингідроксиметилтрансфераза мітохондрій (SHMT2) мають подібні каталітичні властивості, але різну роль у клітині [51, 52]. Рівень їх експресії є сильно збільшеним у різних злоякісних пухлинах, у тому числі й у гліобластомах, а за умов пригнічення цих ензимів спостерігається анти-пухлинний ефект [51-58]. Було встановлено, що серингідроксиметилтрансфераза мітохондрій посилює ріст злоякісних пухлин грудної залози через сигнальні шляхи MAPK та VEGF [59].

Варто зазначити, що SHMT2 відіграє полі-функціональну роль у мітохондріях, оскільки це один із важливих ензимів, що контролюють метаболізм серину і фолієвої кислоти [60]. Він є ензимом, залежним від піридоксальфосфату, який каталізує оборотну реакцію перетворення серину та тетрагідрофолату до гліцину та 5,10-метилентетрагідрофолату, важливого проміжного продукту для біосинтезу пуринів, тимідину і метіоніну, причому пригнічення каталітичної активності серингідроксиметилтрансферази мітохондрій, цього фолатного ензиму, призводить до дефектного окисного фосфорилування у клітинах людини шляхом порушення трансляції у мітохондріях [60, 61]. Показано, що опосередкований цим ензимом катаболізм серину є необхідним для коректної ініціації трансляції на рибосомах мітохондрій та для збереження формілметіоніл-тРНК [61]. Більше

того, було встановлено, що для трансляції на рибосомах мітохондрій необхідним є залежне від фолієвої кислоти метилювання тРНК [60]. Це обумовлено тим, що SHMT2, шляхом утворення 5,10-метилентетрагідрофолату в мітохондріях, забезпечує донори метилу для отримання основи таурінометилуридину для “wobble” положення вибраних тРНК мітохондрій, причому відсутність цієї основи за умов нокауту SHMT2 викликає дефектну трансляцію на рибосомах мітохондрій із зупинками на певних кодонах лізину (AAG) і лейцину (UUG) і призводить до порушення експресії ензимів дихального ланцюга [60].

Таким чином, синтез серину є дуже важливим і багатогранним процесом, необхідним для підтримання метаболічного гомеостазу [62]. Але процеси синтезу серину відіграють вагомую роль також у рості злоякісних пухлин, зокрема гліобластом, і тому є мішенями для пошуку шляхів боротьби із злоякісним ростом.

На даний момент, усі гени синтезу серину розглядаються як мішені для пригнічення злоякісного росту, у тому числі гліобластом, але приділяється також увага і тим генам, які контролюють експресію генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1* і *SHMT2* [46-49, 53, 55, 63]. Окрім того, більшість із цих генів є полі-функціональними і їх значення в регуляції метаболізму в нормі та у злоякісних пухлинах не обмежується лише регуляцією синтезу серину [43, 45, 54, 57, 59-61, 64]. Так, було показано, що інгібування PHGDH збільшує чутливість клітин гліобластоми до темозоломідів [32]. Було також виявлено, що фосфосеринфосфатаза відіграє важливу роль у регуляції апоптозу, а також дефосфорилує не лише 3-фосфосерин, а і такі протеїни як cJUN, p53 та NF-κB [45]. Більше того, PSPH приймає участь у регуляції метастазування, а PSAT1 контролює структуру цитоскелета F-актину, що впливає на морфологію клітин і сприяє міграції, інвазії та метастазуванню за аденокарциноми грудної залози [64]. Було також показано, що mTORC1 посилює синтез пуринів активуючи тетрафолатний цикл у мітохондріях, а піруваткіназа M2 збільшує синтез серину de novo шляхом збільшення

експресії ензимів синтезу серину для підтримки активності mTORC1 і проліферації більшості пухлинних клітин [65, 66]. Більше того, серингідроксиметилтрансфераза 1 посилює ріст гліоми шляхом активації сигналювання mTORC1 [50].

Разом з тим, у регуляції метаболічних процесів у злоякісних пухлинах пріоритетна роль належить двом ключовим факторам – стресу ендоплазматичного ретикулума (ЕР) і гіпоксії, які контролюють активність онкогенів, виживання клітин та їх резистентність до несприятливих факторів [7, 8, 10, 12, 22]. У той же час, так і залишається ще не з'ясованим, яку роль відіграють ці ключові фактори пухлинного росту в регуляції експресії генів, відповідальних за синтез серину, і як змінюється експресія цих генів за умов пригнічення проліферації клітин гліобластоми та інших пухлинних клітин при інгібуванні стресу ЕР.

1.2. Ключова роль транскрипційних факторів у регуляції синтезу серину

Транскрипційні фактори відіграють важливу роль у регуляції експресії генів, що відповідають за синтез серину як у нормальних клітинах, так і у різних злоякісних пухлинах, у тому числі у гліобластомах [34, 67, 68]. Транскрипційні фактори, як головні модулятори програми транскрипції, відіграють важливу роль у контролі внутрішньоклітинних процесів у нормальних клітинах і за пухлинного росту, а тому є потенційними мішенями для анти-пухлинної терапії [69, 70]. Відомо, що транскрипційні фактори регулюють експресію генів-мішеней шляхом зв'язування із специфічними послідовностями ДНК у промоторній ділянці генів або з енгансером, взаємодіють з РНК-полімеразою та іншими допоміжними протеїнами, причому їх активність значною мірою залежить від багатьох регуляторів (активаторів, ко-активаторів, протеїнкіназ і протеїнфосфатаз)

[71-75]. Прогресування злоякісних пухлин є багатогранним процесом, який включає в себе декілька етапів та потребує постійної експресії або активації чи стабілізації транскрипційних факторів для посиленого росту і виживання клітин [71, 76].

Транскрипційні фактори є основними регуляторними молекулами, які координують біологічний гомеостаз та надійне функціонування компонентів клітини, причому порушення функції транскрипційного фактора може спровокувати розвиток і прогресування злоякісних пухлин [76]. Відомо, що розвиток злоякісної пухлини супроводжується порушенням експресії генів, причому це може бути обумовлено також змінами в структурі чи активності транскрипційних факторів. А дисрегуляція транскрипційних факторів відіграє важливу роль у розвитку різних злоякісних новоутворень шляхом перебудови метаболічних процесів та запуску онкогенних сигнальних каскадів [74, 76].

Біосинтез серину також контролюється низкою транскрипційних факторів. Показано, що транскрипційний фактор ATF4 активує синтез серину посилюючи експресію гена *PSAT1* [68]. Транскрипційний фактор ATF3 також забезпечує активацію біосинтезу серину, причому втрата ATF3 призводить до порушення синтезу серину у пухлинних клітинах [67]. ATF3 здатний зв'язуватися з промоторами генів *PHGDH*, *PSAT1* та *PSPH* і посилювати їх експресію, що сприяє ефективній активації біосинтезу серину у клітинах [67]. Недавно було встановлено, що експресія транскрипційного фактора ATF3 позитивно корелює з експресією гена *PHGDH*, який кодує ключовий ензим синтезу серину [34]. Було також показано, що нокдаун транскрипційного фактора CP2 (TFCP2) виражено інгібує зв'язування ATF3 з промотором гена *PHGDH*, пригнічуючи синтез серину [34]. Встановлено, що TFCP2 взаємодіє з транскрипційним фактором ATF3 та кооперативно регулюють *de novo* синтез серину. Більше того, транскрипційний фактор CP2 посилює проліферацію клітин гліобластоми і його експресія є підвищеною у цих клітинах [34].

Біосинтез серину контролюється також транскрипційним фактором NFE2L2 (NFE2 Like BZIP Transcription Factor 2), який відомий ще як NRF2. Він контролює експресію генів *PHGDH*, *PSAT1* і *SHMT2* шляхом взаємодії з ATF4, посилюючи синтез серину та нуклеотидів [77]. Встановлено також, що синтез серину є необхідним для проліферації клітин саркоми і росту пухлини і що це контролюється транскрипційним фактором EWS-FLI1 шляхом посилення експресії гена *PHGDH* [78]. Вагома роль у регуляції експресії основних генів синтезу серину – (*PHGDH*, *PSPH*, *PSAT1*, *SHMT1* і *SHMT2*) була показана для транскрипційного фактора cMyc, який зв'язується з послідовностями E-box у промоторних ділянках цих генів [79].

Недавно було також встановлено, що підвищення ядерного транскрипційного фактора YB (NFYB) посилює чутливість клітин гліобластоми до темозоломіду (TMZ) шляхом пригнічення експресії *SHMT2* [80].

Таким чином, виявлення молекулярних механізмів регуляції синтезу серину транскрипційними факторами має велике значення для лікування злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, оскільки *de novo* синтез серину посилює прогресування гліобластом та їх резистентність до хіміотерапії.

1.3. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в рості злоякісних пухлин

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) - це багатофункціональна внутрішньоклітинна органела, що відіграє роль важливого регулятора метаболічних процесів у клітині. За рахунок чисельних контактів мембрани ЕР з іншими органелами ця унікальна платформа виконує функцію сенсора змін гомеостазу у клітині і забезпечує подальшу регуляцію великої кількості

клітинних процесів [81, 82]. ЕР відіграє важливу роль у підтриманні гомеостазу клітин, у тому числі і кальцієвого гомеостазу, а також у протеостазі, оскільки забезпечує пост-трансляційну модифікацію великої кількості протеїнів за рахунок наявних у люмені ЕР шаперонів та відповідних ензимів [7, 83]. Тут же відбувається і чіткий контроль якості синтезованих протеїнів, а також видалення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів за допомогою асоційованої з ЕР системи деградації протеїнів (ERAD) [1, 9, 10].

Важливо відмітити, що накопичення в люмені ЕР неправильно згорнутих та незгорнутих протеїнів обумовлено порушенням гомеостазу і різкими змінами в активності ензимів пост-трансляційної модифікації протеїнів, які є високочутливими сенсорами порушеного гомеостазу [81, 84]. Таким чином, у результаті змін гомеостазу, які можуть бути ініційовані як внутрішніми, так і зовнішніми чинниками, страждає пост-трансляційна модифікація протеїнів, у результаті чого в люмені ЕР появляються неправильно згорнуті та незгорнуті протеїни. Цей стан називають стресом ЕР [10, 12, 21, 81]. Як відповідь на стрес ЕР запускається адаптивна реакція, яку називають відповіддю на незгорнуті протеїни або UPR (unfolding protein response) [81, 84, 85]. За нормальних умов UPR є неактивним, а за умов стресу ЕР основною задачею UPR є відновлення гомеостазу ендоплазматичного ретикулума, яка реалізується за рахунок перепрограмування транскрипції, глобального трансляційного послаблення, видалення неправильно згорнутих білків системою ERAD і їх деградації [83]. У випадках важкого та тривалого стресу ЕР адаптація клітини значно погіршується, що викликає запуск альтернативної програми активації апоптозу [10, 81].

Разом з тим, тривалий стрес ЕР, який розвивається у злоякісних пухлинах під впливом гіпоксії, дефіциту поживних речовин і низки інших чинників, стає надзвичайно важливим фактором їх інтенсивного росту та резистентності до терапії, він їм не шкодить, пухлинні клітини

використовують його на свою користь [8, 10, 82, 85, 86]. При цьому активуються онкогени, посилюється гліколіз, проявляється нестабільність геному і виникають соматичні мутації, що є необхідною складовою онкогенної трансформації [86]. Більше того, пригнічення стресу ЕР знижує інтенсивність проліферації клітин та росту пухлин, а також зменшує резистентність пухлинних клітин як до лікарських препаратів, так і токсичних ефектів гіпоксії [7, 15, 17, 19, 21, 86, 87].

Численними дослідженнями встановлено, що UPR охоплює три основні сигнальні каскади внутрішньоклітинних реакцій, які реалізуються асоційованими з ЕР протеїнами: PERK (PRK-подібна кіназа ендоплазматичного ретикулума), ERN1/IRE1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1/ чутливий до інозитулу ензим 1) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6) [10, 12, 21, 81].

Сенсорно-сигнальні протеїни PERK, ATF6 та ERN1 є трансмембранними протеїнами ЕР, причому їх сенсорна частина, що відповідає за виявлення неправильно згорнутих білків, локалізується в люмені ЕР і за нормальних умов пов'язана з шапероном HSPA5 (70 kDa протеїн 5 теплового шоку), який відомий ще як BiP (зв'язуючий протеїн імуноглобуліну) та GPR78 (протеїн 78, що регулюється глюкозою) [85]. За умов стресу ЕР цей шаперон дисоціює від PERK, ATF6 та ERN1, оскільки має вищу афінність зв'язування з відкритими гідрофобними поліпептидними ділянками, і приєднується до неправильно згорнутих протеїнів з метою їх нейтралізації, видалення із люмену ЕР та подальшого знищення, а звільнені від шаперона сенсорно-сигнальні протеїни стресу ЕР активуються і передають сигнали до цитоплазми та ядра для відповіді на стрес [10, 21, 81, 83, 85]. Чисельні дослідження *in vivo* і *in vitro* демонструють роль стресу ЕР в контролі різноманітних аспектів пухлиногенезу – проліферації клітин, росту, ангіогенезу, хемо- та радіо-резистентності, метастазування, тощо [83].

На Рис. 1.2 схематично представлена реакція клітин на стрес ендоплазматичного ретикулума, яка забезпечується трьома сенсорно-

сигнальними шляхами: ERN1, PERK і ATF6, сенсорна частина яких локалізується в люмені ЕР [83].

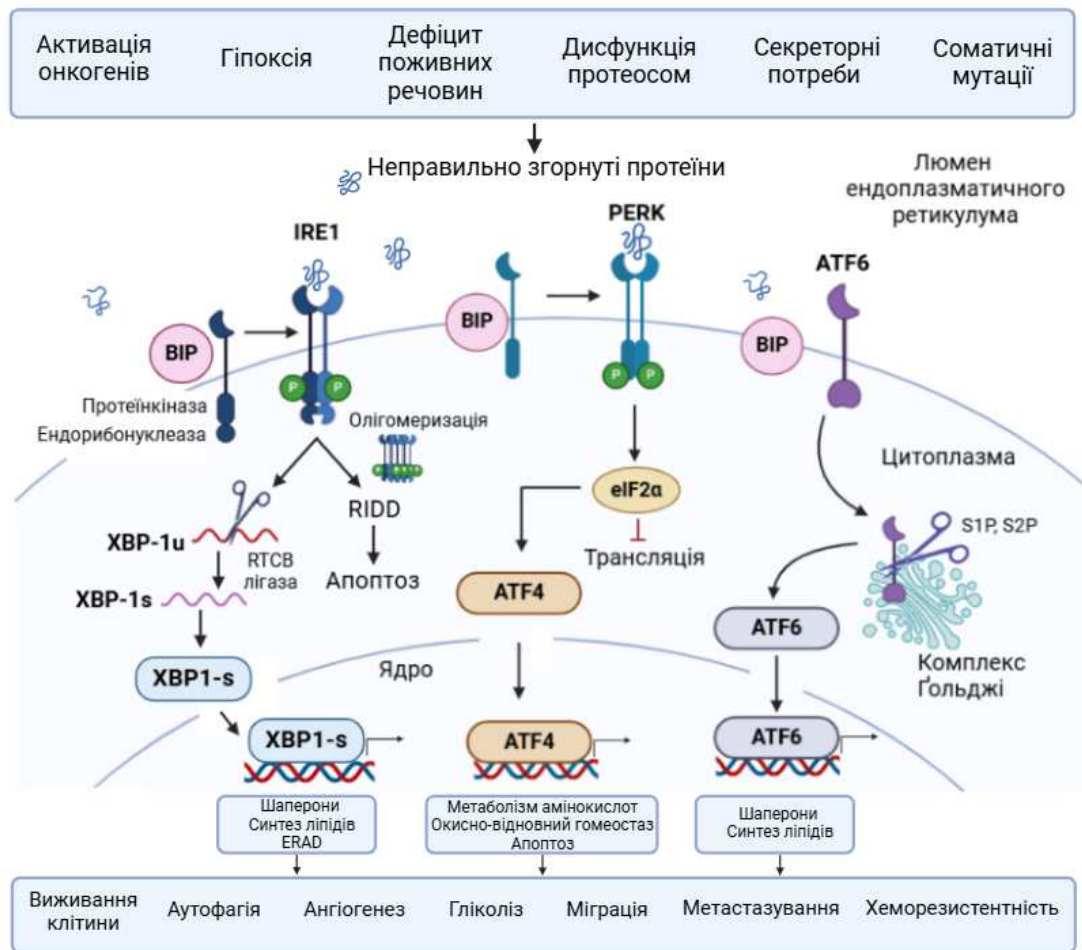


Рис. 1.2. Реакція клітин на стрес ендоплазматичного ретикулума забезпечується трьома сенсорно-сигнальними шляхами: ERN1, PERK та ATF6, сенсорна частина яких локалізується в люмені ЕР [83].

Найбільш еволюційно консервативний шлях UPR представлений біфункціональним трансмембранним протеїном ERN1, сенсорна частина якого розташована в люмені ендоплазматичного ретикулума, тоді як цитоплазматична частина проявляє протеїнкіназну та ендорибонуклеазну активності [81, 85]. Поява неправильно згорнутих протеїнів у люмені ЕР веде до олігомеризації ERN1 у мембрані ЕР і активації його протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей шляхом аутофосфорилювання [81]. Однією із основних функцій ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 є вирізання олігонуклеотидного фрагменту з мРНК транскрипційного

фактора XBP1 (протеїн-1, що зв'язується з Х-боксом) і забезпечує альтернативний сплайсінг XBP1. Це призводить до зміни рамки зчитування та утворення альтернативного сплайс-варіанту XBP1s, який є фактором транскрипції родини bZIP і регулює експресію сотень генів, залучених у процеси біосинтезу та фолдингу протеїнів, контролю якості дозрілих протеїнів, а також відповідає за роботу системи деградації протеїнів [81, 88].

Встановлено, що взаємодія ERN1 з TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) стимулює шлях JNK та запускає апоптоз [81]. Подібним чином ERN1 взаємодіє з BAX і BAK, членами сімейства Bcl-2, що посилює сплайсінг мРНК XBP1, фосфорилювання JNK та ініціацію апоптозу [10, 81].

Цікаво, що окрім канонічної регуляції експресії генів із залученням транскрипційного фактора XBP1s, низка досліджень вказує на здатність протеїнкінази ERN1 контролювати експресію генів таких як епірегулін (*EREG*), ендотелін 1 (*EDN1*), ензим деградації інсуліну (*IDE*), карбоксипептидаза E (*CPE*), *PITRM1* та деяких транскрипційних факторів (*ATF3*, *PBX3* і *PRRX1*) [16, 89-93]. І хоча є гени, експресія яких регулюється лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (*ECE1*, *ZEB2*, *TGIF1* та багато інших), виявлені також гени, експресія яких контролюється різноплановою взаємодією обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 (*PAX6*, *PBXIP1*, *EDNRB* та інші) [89, 91, 92].

Іншою важливою функцією ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 є вибіркове розщеплення певних мРНК (ERN1-залежний розпад мРНК або RIDD), а також мікроРНК, що сприяє виходу із стресового стану [93-96]. Було також показано, що мікроРНК є першорядними регуляторами гомеостазу ЕР і відіграють важливу роль в UPR-залежному сигналюванні, а з іншого боку, стрес ЕР може контролювати рівень мікроРНК [93, 97].

Сенсорно-сигнальний протеїн PERK за своєю структурою є протеїнкіназою Ser/Thr типу і за умов стресу ЕР інактивує фактор ініціації трансляції eIF2 α (EIF2A) шляхом його фосфорилювання по Ser51, що

призводить до глобального гальмування трансляції і зменшує навантаження на ER [81]. Втім, за таких умов відбувається трансляція певних мРНК, зокрема транскрипційних факторів ATF4 та CHOP (DDIT3), а також GADD34, DR5 і PUMA, що є важливими у регуляції апоптозу [81, 82]. Виявлено подвійний характер дії PERK за умов стресу ER, оскільки за участі eIF2 α та ATF4, цей сенсорно-сигнальний протеїн може сприяти як виживанню клітин, так і їх апоптозу [81, 82].

Останній сенсорно-сигнальний шлях стресу ER представлений транскрипційним фактором ATF6. За наявності неправильно згорнутих протеїнів у люмені ER цей транскрипційний фактор переноситься в апарат Гольджі, де резидентні протеази сайту-1 (S1P) та сайту-2 (S2P) розщеплюють його у люмінальному та трансмембранному домені, відповідно [81]. У результаті цих модифікацій утворюється фактор транскрипції ATF6(N), який мігрує в ядро для регуляції експресії генів-мішеней UPR [10]. Відомо, що ATF6(N) контролює експресію деяких шаперонів і компоненти системи ERAD, а також забезпечує активацію запрограмованої смерті клітин, у тому числі й за рахунок зниження транскрипції анти-апоптотичного протеїну Mcl-1 [81]. Варто відмітити, що існує тісний взаємозв'язок сигнальних шляхів між собою. Так, ATF6 індукує транскрипцію мРНК XBP1, а ERN1 контролює експресію *ATF4*, *CHOP*, *GADD34*, *DR5* та багато інших генів [21, 81, 82, 88, 90-92, 98].

Добре відомо, що розвиток великої кількості типів злоякісних новоутворень, включаючи карциному грудної залози та гліобластому, а також лейкемію і мієлому, потребує активації всіх трьох гілок стресу ER [82, 86]. Було також показано, що онкогенний транскрипційний фактор MYC регулює ERN1/XBP1 (X-box binding protein 1) сигнальний шлях стресу ER у клітинах карциноми грудної залози різними механізмами [99]. Він може зв'язуватися з промотором і енгансером і таким чином контролювати транскрипцію гена *ERN1* [99]. Більше того, MYC утворює транскрипційний комплекс з XBP1 і посилює його транскрипційну активність, причому

сайленсінг XBP1 селективно блокує проліферацію клітин з високою активністю MYC [99]. А фармакологічне пригнічення ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 за допомогою специфічного інгібітора MKC8866 селективно стримувало ріст пухлини з надмірною експресією MYC *in vivo* у мишей і посилювало чутливість до хіміотерапії доцетакселем, що виражалося у швидкій регресії пухлин з підвищеною експресією MYC [99].

Була також показана важлива роль транскрипційного фактора ATF4 у виживанні мишей після активації MYC у пухлинах [100]. Виявилося, що MYC підвищує експресію ATF4 активуючи GCN2 кіназу і це призводить до поєданого зв'язування ATF4 та MYC з промоторами більше 30 генів-мішеней транскрипційного фактора MYC, у тому числі гена *4E-BP1*, який є негативним регулятором трансляції [100].

Важливо відзначити, що злоякісні пухлини потребують активності сенсорно-сигнальних протеїнів ERN1 і PERK для забезпечення адаптації та росту і що транскрипційні фактори, які індукуються за гіпоксії (HIF) є дуже важливими для росту пухлин, хоча HIF-незалежні процеси також вносять свій внесок у прогресування злоякісних пухлин [101]. Сигнальний протеїн ERN1 і інші сигнальні протеїни стресу ER також контролюють ангиогенез у злоякісних пухлинах, причому пригнічення функції ERN1 призводить до вираженого зменшення кількості судин та інтенсивності росту гліобластом різними механізмами, але перш за все змінюючи експресію фактора, який стимулює ангиогенез VEGFA [15, 24, 102, 103]. Більше того, транскрипційні фактори ATF4 і XBP1 посилюють експресію VEGFA та IL-6 за участі фактора HIF, що індукується за гіпоксії [15, 24].

Було також показано, що ERN1/XBP1 сигнальний шлях сприяє виживанню клітин за умов гіпоксії і потрібний для росту злоякісних пухлин [104]. Відомо також, що під впливом мікроРНК miR-30c-2-3p знижується рівень XBP1s та активується асоційований із DDIT3/CHOP про-апоптичний шлях у клітинах аденокарциноми, причому у цій регуляції задіяний і

транскрипційний фактор ATF4 [105-107]. Варто зазначити, що пухлинні клітини використовують UPR задля захисту від різноманітних терапевтичних підходів та дії інших чинників [108]. Саме стрес ЕР є відповідальним за розвиток полірезистентності злоякісних пухлин і тому фармакологічне інгібування ERN1 за допомогою MKC8866 істотно сприяло як хемотерапії, так і радіотерапії гліобластоми [21, 109].

Окрім цього, нещодавні дослідження показують, що ERN1 сигнальний шлях сприяє міграції різних пухлинних клітин за рахунок регуляції експресії низки генів, причому ERN1 здатен напряду зв'язуватись з філаміном А і регулювати динаміку цитоскелета та рухливість клітин [15, 92, 110, 111]. У той же час, прогресування пухлин і їх метастазування істотно залежить від PERK, яка контролює епітелійно-мезенхімний перехід [21].

Було також показано, що ERN1 модифікує регуляцію експресії великої кількості генів у клітинах гліобластоми шляхом перепрограмування геному, причому характер цієї регуляції залежить як від протеїнкіназної активності цього сигнального протеїну, так і його ендорибонуклеазної активності [21, 92, 112]. Варто зазначити, що перепрограмування геному відбувається у клітинах гліобластоми і за умов дефіциту поживних речовин та гіпоксії, причому зміни в експресії численних генів залежать від функціональної активності ERN1 [113-115].

Зважаючи на важливу роль ERN1 сигнального шляху стресу ЕР у рості злоякісних пухлин, він був обраний мішенню для боротьби зі злоякісним ростом [15, 16, 19, 21, 116-119]. На даний момент уже створені і випробовуються різні інгібітори як ендорибонуклеазної активності ERN1, так і протеїнкіназної його активності, але пошуки нових, більш ефективних і менш токсичних сполук продовжуються [17, 19, 20, 109].

1.4. Роль гіпоксії в онкогенезі і молекулярні основи гіпоксичної регуляції експресії генів

Характерною ознакою злоякісних пухлин є знижений рівень кисню у пухлинних клітинах - стан гіпоксії. Відомо, що вміст кисню в пухлинах нижчий за рівень у відповідних нормальних тканинах і в середньому становить біля 1% [120]. Гіпоксичний стан пухлинних клітин зумовлений інтенсивним їх метаболізмом та посиленою проліферацією, а також зниженим надходженням кисню до клітин і його використанням [22, 121, 122]. Важливо відмітити, що гіпоксія відіграє важливу роль в ангіогенезі, рості злоякісних пухлин, їх метастазуванні та резистентності до терапії [103, 123-127]. Задля виживання у таких несприятливих умовах пухлинні клітини активують адаптивні реакції, які регулюються за участі гетеродимерного транскрипційного фактора HIF (фактора, що індукується за гіпоксії) [22]. Добре відомо, що метаболізм у клітинах пухлин суттєво відрізняється від метаболізму відповідної нормальної тканини і HIF відіграє в цьому вагомую роль, причому рівень його експресії у клітинах пухлин виражено збільшений [22, 128-133].

Транскрипційний фактор HIF складається з β -субодиниці, експресія якої є конститутивною, та різних α -субодиниць: HIF1 α , HIF2 α і HIF3 α , рівень експресії яких залежить від гіпоксії [22, 130, 131]. Було показано, що рівень експресії α -субодиниць HIF контролюється у злоякісних пухлинах та за умов гіпоксії на рівні транскрипції і шляхом пост-трансляційних модифікацій, причому ці пост-трансляційні модифікації включають механізм, який направляє модифіковані α -субодиниці HIF на протеосомну деградацію [22, 130, 134]. Були також виявлені специфічні до α -субодиниць HIF ензими, які гідроксильовують ці субодиниці HIF за залишками проліну (Pro-402, Pro-564)

[135-137]. Це пролілгідроксилази HIF (PHD1, PHD2 та PHD3), які представляють собою α -кетоглутарат/2-оксоглутарат-залежні гідроксилази суперродини негемових залізовмісних протеїнів і активність яких залежить від кисню та іонів заліза [136, 137]. Саме тому їх активність пригнічується за умов гіпоксії чи зменшення іонів заліза. У той же час, за умов нормоксії пролілгідроксилази HIF є активними і постійно гідроксильовують α -субодиниці HIF, що сприяє їх деградації [135, 137].

Виявлено три основні ізоформи цих ензимів —, які кодуються генами *EGLN2* (Egl-9 family hypoxia inducible factor 2), *EGLN1* і *EGLN3*, відповідно [137]. За умов нормоксії гідроксильована пролілгідроксилазою α -субодиниця HIF утворює комплекс із пухлинним супресором VHL (фон Гиппеля-Линдау) та поліубіквітинується, що призводить до її деградації 26S протеосомною системою [137-139]. Оскільки активність пролілгідроксилаз α -субодиниці HIF є дуже чутливою до кисню і забезпечує кисень-залежну деградацію α -субодиниць HIF, то це привело до з'ясування молекулярних механізмів не лише деградації цих субодиниць HIF, а і до відкриття молекулярних принципів сенсорики кисню клітинами [135, 138, 140, 141].

Однак, за умов гіпоксії активність PHD ензимів пригнічується і HIF-1 α субодиниця транслокуються до ядра, де з'єднується з HIF-1 β . Отриманий димер є активним транскрипційним фактором HIF1, який зв'язується з цільовими генами у ділянках HRE (елементи відповіді на гіпоксію) і таким чином регулює експресію великої кількості генів, сприяючи активації адаптивних шляхів, у тому числі й націлених на виживання пухлинних клітин [72, 73, 134, 142, 143].

Важливо відзначити, що гіпоксична регуляція може контролюватися не лише транскрипційним фактором HIF, а і низкою ко-регуляторів різної природи [72, 75, 133, 139, 144-146]. Цікаво відмітити, що HIF може регулювати експресію глюкозного переносника 3 (SLC2A3) шляхом індукції великої некодуючої РНК N1C1 [147].

На Рис. 1.3 представлена схема регуляції синтезу та розщеплення альфа субодиниць HIF за умов гіпоксії і нормоксії [148].

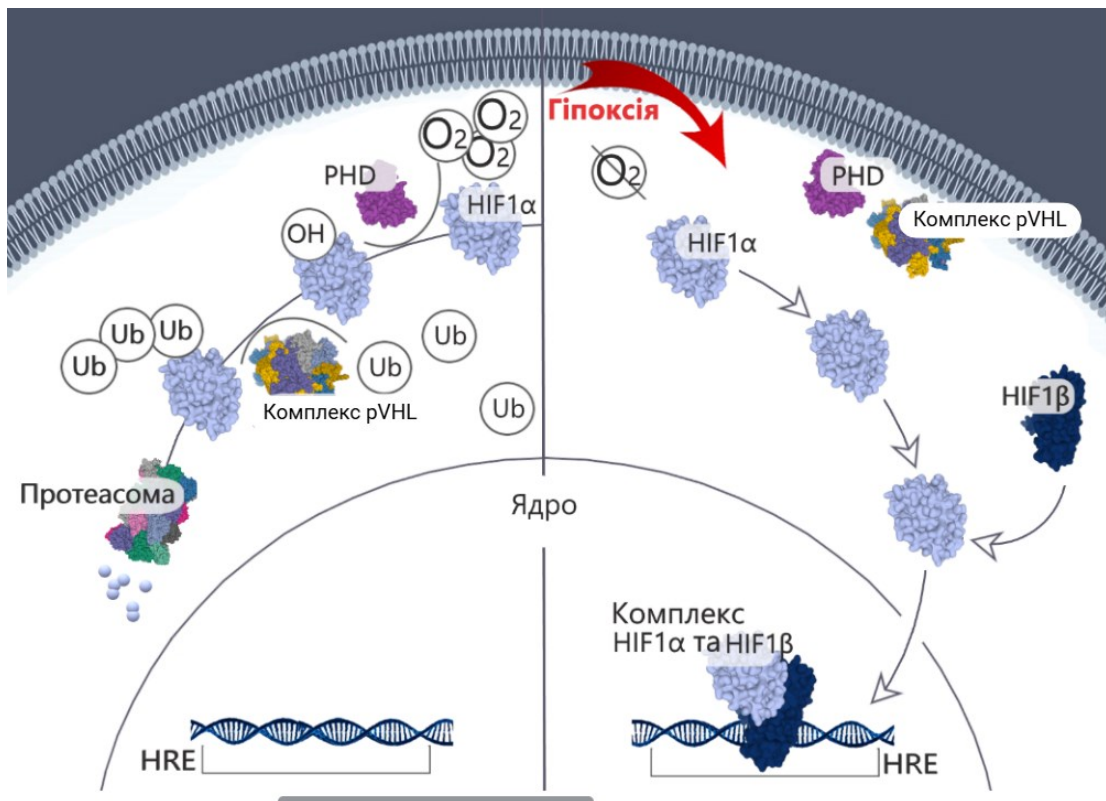


Рис. 1.3. Регуляція синтезу та розщеплення альфа субодиниць HIF (HIF1/2/Зальфа) за гіпоксії і нормоксії [148].

Таким чином, оскільки гіпоксія відіграє одну із ключових ролей у пухлиногенезі, а активність транскрипційного фактору HIF значною мірою забезпечує злоякісний ріст та метастазування пухлин, а також резистентність пухлин до терапії, то цей транскрипційний фактор, як і залежні від нього гени є мішенями для розробки способів анти-пухлинної терапії [149, 150]. Так, було показано, що 2-метокси-естрадіол, інгібітор альфа субодиниці HIF, сильно пригнічує міграцію та інвазію клітин аденокарциноми шлунку. Але пошуки більш ефективних інгібіторів альфа субодиниці HIF з анти-метастатичною активністю продовжуються [149].

1.5. Залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від стресу ендоплазматичного ретикулума

Численними дослідженнями було показано, що пригнічення ERN1, сигнального шляху стресу ЕР, істотно змінює гіпоксичну регуляцію великої кількості генів відносно незалежно від активності транскрипційного фактора HIF [21, 151-160]. Так, при дослідженні генів рецептора інсуліну та залежних від нього протеїнів було виявлено, що гіпоксія посилює експресію генів рецептора інсуліну, *IRS2*, *INSIG1* та *INSIG2*, але знижує *IRS1* і *BAIAP2* (протеїну 2, специфічного для мозку інгібітора ангіогенезу) у клітинах гліобластоми і що пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 суттєво змінює ефект гіпоксії на експресію більшості досліджених генів як за величиною, так і за напрямком змін [151]. Показано, що у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 гіпоксія знижує рівень експресії рецептора інсуліну, але збільшує *IRS1*. У той же час, ефект гіпоксії на експресію генів *INSIG1* та *INSIG2* послаблювався за умов пригнічення ERN1, але дія гіпоксії на рівень експресії *IRS2* був близьким за величиною в обох типах клітин [151]. Цікаво відмітити, що експресія гена *BAIAP2* у клітинах гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 є резистентною до умов гіпоксії, що вказує на опосередкованість гіпоксичної регуляції експресії гена *BAIAP2* стресом ЕР, зокрема його сигнальним шляхом ERN1. Таким чином, зниження проліферативного потенціалу клітин гліобластоми з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1, а також росту пухлин у мозку мишей із таких клітин [15] може частково опосередковуватися і появою у таких клітинах резистентності гена *BAIAP2* до гіпоксії, оскільки він контролює апоптоз клітин у мозку. Модифікуючий ефект пригнічення ензиматичних активностей протеїну

ERN1 на гіпоксичну регуляцію експресії генів був також продемонстрований для генів, які кодують такі транскрипційні фактори як DDIT3/CHOP/GADD153, ATF3, TBX3, TP53, EPAS1/HIF2A, HOXC6, FOXF1 та деякі інші [155, 157, 160], а також для низки інших ензимів і регуляторних факторів [156, 158, 161-165].

Стрес ендоплазматичного ретикулума і гіпоксія є необхідними умовами для виживання та проліферації пухлинних клітин, а також полірезистентності, включаючи резистентність до токсичних ефектів гіпоксії [10, 21, 81]. Обидва стани запускають низку взаємопов'язаних адаптивних механізмів, які реалізуються переважно транскрипційними факторами XBP1s та HIF і які забезпечують перепрограмування геному пухлинних клітин [82, 121, 166]. Дослідження останніх років вказують на наявність взаємодії гіпоксії та стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції експресії генів [21]. Так, сигнальні шляхи стресу ЕР спряють фосфорилюванню HIF1 α , а взаємодія XBP1 з HIF1 α обумовлює агресивність пухлини і її резистентність до хіміотерапевтичних препаратів [166, 167]. Добре відомо, що стан гіпоксії зумовлює появу стресу ЕР, причому транскрипційний фактор HIF модулює експресію та активність сенсорно-сигнальних протеїнів UPR [166]. Недавно було показано, що пригнічення ензиматичних функцій сигнального протеїну ERN1 різко знижує чутливість проонкогена *SPAG4* до позитивної регуляції за умов гіпоксії [113].

Таким чином, вивчення молекулярних механізмів взаємодії стресу ЕР та гіпоксії у регуляції експресії генів сприяє виявленню шляхів розвитку резистентності пухлинних клітин до гіпоксії, що важливо для розробки способів зниження проліферативного потенціалу клітин різних злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, а також росту пухлин у мозку та їх інвазивності.

1.6. Роль глюкози і глутаміну в рості злоякісних пухлин

Ріст злоякісних пухлин, у тому числі і пухлин мозку, вимагає забезпечення їх поживними речовинами, головними із яких є глюкоза та глутамін, важливі субстрати для гліколізу і глутамінолізу. Вони є необхідними і для високої агресивності злоякісних пухлин шляхом впливу на різні етапи клітинного циклу, причому було показано, що глутамін є найважливішим із усіх амінокислот [23, 24]. Добре відомо, що глюкоза та амінокислоти використовуються у численних метаболічних процесах як у нормальних клітинах, так і клітинах злоякісних пухлин, але за наявності стресу ЕР та гіпоксії метаболізм глюкози у пухлинних клітинах істотно змінюється [25, 26]. Не менш важливим для росту гліобластом є і серин, а особливо його синтез [28, 31, 32]. Варто відмітити результати експериментів, які показали, що знижене забезпечення клітин глюкозою може пригнічувати резистентність клітин злоякісних пухлин до хіміотерапії арктігеніном шляхом зменшення стресу ЕР через його сигнальні шляхи [168, 169].

Особливий інтерес представляють дані, присвячені вивченню ролі стресу ЕР, а саме сигнального шляху ERN1, у регуляції чутливості клітин злоякісних пухлин до дефіциту глюкози та глутаміну. Було показано, що ERN1 сигнальний шлях стресу ЕР по-різному регулює залежність експресії багатьох важливих генів у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози та глутаміну і пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 істотно змінює чутливість цих пухлинних клітин до нестачі цих важливих речовин, але по-різному [90, 114, 115, 152, 170, 171]. Так, було встановлено, що рівень експресії генів *NR3C2*, *AHR*, *GSK1*, *GSK3* та *NNT* збільшувався у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози, а пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 посилювало чутливість експресії генів *NR3C2*, *AHR* і *GSK1* до нестачі

глюкози [170]. Разом з тим, рівень експресії гена *NNT* за пригнічення протеїну ERN1 втрачав чутливість до дефіциту глюкози, а гена *GSK3*, навпаки, зменшувався [170]. Варто відзначити, що експресія різних генів у клітинах гліобластоми має різну чутливість до дефіциту як глюкози, так і глутаміну у контрольних клітинах гліобластоми і по-різному змінюється за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 [90, 114, 152, 172-176]. Для росту пухлин є також необхідною гіпоксична регуляція метаболізму глутаміну [177].

Разом з тим, молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів ERN1 зі зміненим рівнем глюкози та глутаміну у середовищі ще недостатньо зрозумілі і безперечно заслуговують на подальше, більш ґрунтовне вивчення.

1.7. МікроРНК як важливі регулятори експресії генів та метаболічних процесів, їх участь в онкогенезі

МікроРНК - це невеликі одноланцюгові некодуючі РНК розміром від 21 до 23 нуклеотидів, які здатні інгібувати трансляцію протеїнів шляхом ініціації деградації специфічних мРНК або “замовчування” трансляції [178]. Відомо, що мікроРНК причетні до контролю таких критичних для пухлинних клітин процесів як проліферація, ріст, диференціація, апоптоз та перепрограмування метаболізму, а також резистентність до терапії [179-181]. Варто зазначити, що в рості злоякісних пухлин і їх резистентності до терапії важливу роль відіграють також і великі некодуючі РНК [182-185]. Основною онкогенною мікроРНК у клітинах гліобластоми вважається miR-21 і її інгібування разом із miR-10b пригнічує проліферацію та інвазію цих клітин [186, 187]. Ініціюючи розпад мРНК PTEN, вона забезпечує зниження транскрипції каспаз та p53 і блокує апоптоз пухлинних клітин [186]. Деякі мікроРНК експресуються у клітинах гліобластоми на низькому рівні і мають протипухлинні властивості, зокрема miR-181, а її активація пригнічує

проліферацію, впливаючи на клітинний цикл, та знижує здатність до інвазії і міграції [186].

Недавно було показано, що є мікроРНК, які контролюють синтез серину шляхом впливу на рівень мРНК PHGDH і PSAT1 у клітинах аденокарциноми грудної залози, причому продемонстрований прямий вплив miR-145-5p на мРНК PSAT1, який призводив до зниження проліферації клітин, а також їх міграції та інвазії [188-190]. Встановлено також, що рівень мРНК PSAT1 контролюється також такими мікроРНК як miR-424-5p і miR-195-5p [191, 192]. Було також виявлено декілька мікроРНК, які контролюють рівень експресії мРНК SHMT2. Це miR-149-5p та miR-449a. Встановлено, що вплив цих мікроРНК на мРНК SHMT2 змінював проліферативну активність пухлинних клітин і їх резистентність до цисплатину [193, 194]. Недавно було також показано, що рівень експресії мРНК SHMT2 контролюється miR-383-5p, яка причетна до регуляції як проліферації, так і міграції клітин аденокарциноми [195].

Таким чином, стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія відіграють вирішальну роль у рості злоякісних пухлин і зокрема гліобластом, але не менш важливими факторами забезпечення ефективного росту пухлин є глюкоза та глютамін, а також серин, його синтез. Саме тому є важливим вивчити молекулярні механізми регуляції синтезу серину за різних умов пригнічення ERN1 сигнального шляху стресу ЕР, а також гіпоксії, дефіциту глюкози та глютаміну в залежності від пригнічення ERN1, що може мати практичне значення при розробці принципово нових способів анти-пухлинної терапії.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та умови проведення експериментів

Експерименти проводили як на культурі клітин гліобластоми лінії U87MG, що була отримана із компанії “ATCC” (США), так і на генетично модифікованих сублініях цих клітин, які були раніше отримані професором Олександром МІНЧЕНКОМ у співпраці з професором Michel MOENNER (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангиогенезу, Університет Бордо 1, Франція) [16]. Клітини гліобластоми вирощували у середовищі DMEM (Дульбекко мінімальне есенціальне середовище Ігла з високим вмістом глюкози, 4,5 г/л; “Gibco, Invitrogen”, США), доповнене глютаміном (2 мМ), пеніциліном (“Gibco”, США; 100 од./мл), стрептоміцином (“Gibco”, США; 0,1 мг/мл) та ембріональною сироваткою телят (“Equitech-Bio, Inc.”, США) до 10 %. Клітини росли в інкубаторі при 37°C і зволоженій атмосфері повітря у присутності 5 % CO₂, як описано [16]. У деяких дослідженнях були використані нормальні астроцити людини лінії NHA/TS, які росли як описано [16]. Варто відмітити, що ці астроцити активно проліферують, але мають нормальний, не пухлинний, фенотип порівняно з клітинами гліом [196].

Специфічний інгібітор пролілгідроксилаз альфа-субодиниці транскрипційного фактора HIF DMOG (dimethyloxalylglycine; “Sigma-Aldrich”) у концентрації 0,5 мМ був використаний для створення умов гіпоксії, як описано [73]. Умови дефіциту глюкози і глютаміну створювали шляхом заміни середовища DMEM з усіма перерахованими вище добавками, на таке, що не містило глюкози або глютаміну, як описано [173]. Для індукції стресу ЕР був використаний тунікаміцин (“Sigma-Aldrich”) у концентрації 500 нг/мл.

2.2. Методи дослідження

Експериментальні дослідження були проведені з використанням сучасних методів біохімії та молекулярної біології.

2.2.1. Культивування клітин гліобластоми і нормальних астроцитів

У дослідженнях були використані нормальні астроцити людини та нативні, не модифіковані клітини гліобластоми лінії U87MG, які росли як описано [16], а також три сублінії генетично модифікованих клітин гліобластоми. Ці генетично модифіковані клітини гліобластоми росли у середовищі DMEM у присутності антибіотика G418 (“Sigma-Aldrich”, США), який ефективно блокує синтез поліпептидів шляхом інгібування етапу елонгації як описано [16]. Ці сублінії мали вектор pcDNA3.1, який має вставку, що забезпечує резистентність до G418 і таким чином дозволяє рости клітинам у присутності антибіотика. Перша сублінія – це контрольні клітини гліобластоми, стабільно трансфіковані “порожнім” (без вставки) вектором pcDNA3.1. Друга – клітини без обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної та протеїнкіназної) сигнального протеїну ERN1, стабільно трансфіковані генетичною конструкцією dnERN1, яка містила кДНК ERN1 без її цитоплазматичного домена у векторі pcDNA3.1, третя – клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1, стабільно трансфіковані генетичною конструкцією dnrERN1, яка містила кДНК ERN1 із штучно створеною мутацією в ендорибонуклеазному домені у векторі pcDNA3.1.

2.2.2. Виділення РНК із культури клітин

Для виділення препаратів РНК із клітин гліобластоми та її генетично модифікованих субліній, а також із нормальних астроцитів людини використовували реагент TRIzol (“Invitrogen”, США). При виділенні РНК притримувались рекомендацій виробника. Для цього із чашок з культурами клітин відбирали середовище вирощування, клітини промивали буфером DPBS і додавали 0,5 мл реагенту TRIzol для лізису клітин. Через 5 хвилин лізат переносили у центрифужні пробірки, додавали 100 мкл хлороформу, перемішували і через 5 хвилин центрифугували у центрифугузі (Centrifuge 5415R, “Eppendorf”, Німеччина) протягом 10 хвилин при 15000 g та 4 °C для розділення водної і фенольної фаз. Водну фазу відбирали та переносили у нові пробірки, а РНК осаджували рівним об’ємом ізопропанолу при -20 °C протягом 2 годин. Після цього, пробірки центрифугували протягом 10 хвилин при 15000 g і 4 °C для осадження РНК. Отримані осади РНК промивали 75 % етанолом та розчиняли у воді вільній від рибонуклеаз. Для додаткового очищення отриманих РНК від можливих залишків фенолу їх повторно осаджували 95 % етанолом з 0,1 М ацетату натрію при -20 °C протягом 45 хвилин і центрифугували 5 хвилин при 15000 g. Осади РНК розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз. Отриману РНК використовували для синтезу комплементарної ДНК (кДНК).

2.2.3. Нано-спектрофотометричне визначення концентрації РНК та її спектральних характеристик

Концентрацію РНК, а також її спектральні характеристики визначали за допомогою нано-спектрофотометра, який дозволяє вимірювати ці показники в 1 мікролітрі. На Рис. 2.1 представлені типові спектральні характеристики препарату РНК із клітин гліобластоми, які переконливо вказують на високий ступінь їх чистоти.

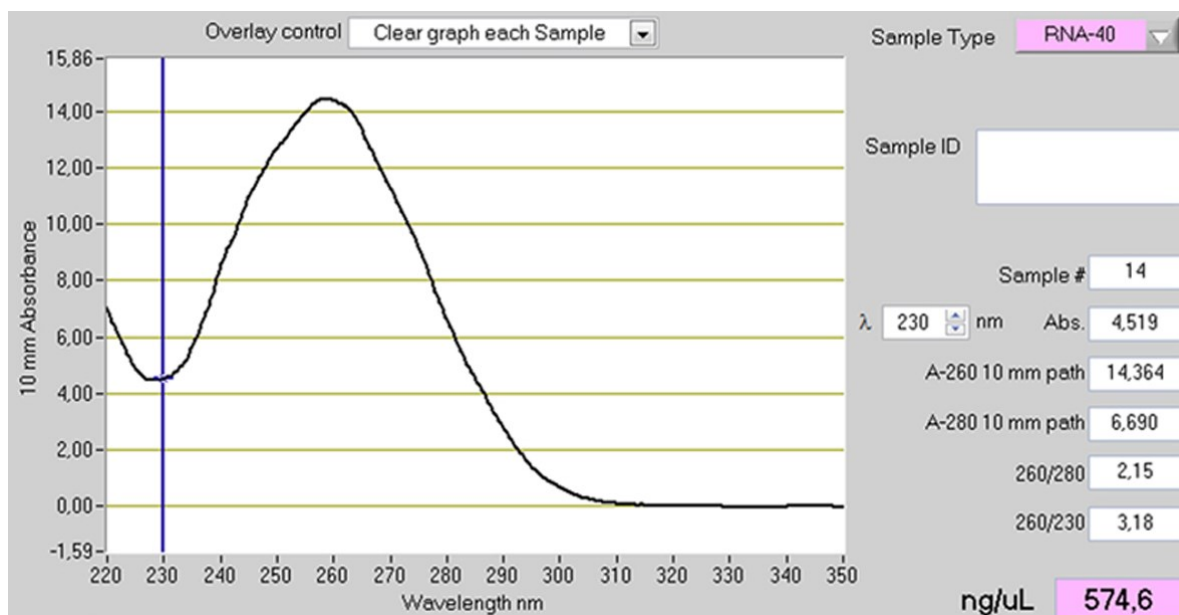


Рис. 2.1. Спектральні характеристики типового препарату РНК із клітин гліобластоми.

2.2.4. Синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції

Для синтезу кДНК був використаний набір Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Зворотну транскрипцію проводили згідно протоколу виробника. Для цього в реакцію брали 1 мкг РНК із клітин гліобластоми чи нормальних астроцитів і додавали вільну від рибонуклеаз воду до 10 мкл, змішували з 10 мкл завчасно підготовленої суміші реагентів із набору для синтезу кДНК, яка включала в себе 4 мкл 5× реакційного буферу для зворотної транскрипції, 1 мкл суміші дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP mix), 0,5 мкл праймера для зворотної транскрипції, 0,5 мкл суміші зворотної транскриптази та інгібітора рибонуклеаз для захисту РНК (Verso Enzyme mix) і вільну від рибонуклеаз воду. Проби інкубували протягом 30 хвилин при 42 °С. Для зупинення реакції реакційну суміш прогрівали протягом 2 хвилин при 95 °С, а потім

охолоджували на льодяній бані. Отриману кДНК розводили у 100 разів і використовували для дослідження рівня експресії генів за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Для зворотної транскрипції мікроРНК використовували набір Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (“Takara”, Японія), який включає етап поліаденілування мікроРНК до початку її зворотної транскрипції. А рівень експресії мікроРНК також визначали методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

2.2.5. Ампліфікація кДНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі

Рівень експресії генів, причетних до синтезу серину, визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі як описано Minchenko et al. [92]. Рівень експресії бета-актину (ACTB) використовували в якості додаткового контролю кількості РНК, взятої для аналізу. Ампліфікацію проводили в апараті QuantStudio 5 Real-Time PCR System („Applied Biosystems”, США). Специфічні для кожного гена пари праймерів, що були підібрані за допомогою програми Primer3web version 4.1.0, були отримані із компанії Sigma-Aldrich і їх послідовності представлені у таблиці 2.1.

Ампліфікацію кДНК усіх досліджених генів проводили протягом 40 циклів за такими параметрами: 15 сек. при 95 °C – денатурація; 20 сек. при 55 °C – “відпал” праймерів і 30 сек. при 72 °C для синтезу послідовності ампліфікації. Визначення експресії всіх генів провадили у трьох повторах у кожному із 4-ох незалежних експериментів. Якість продуктів ампліфікації аналізували за допомогою кривих плавлення та електрофорезом у 2,5 % агарозному гелі, використовуючи TAE буфер.

Таблиця 2.1

Характеристики праймерів, які використовувалися для кількісної полімеразної ланцюгової реакції мРНК

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Номери нуклеотидів у послідовності мРНК	Номер гена у GenBank
<i>PHGDH</i>	Phosphoglycerate dehydrogenase	F: 5'- tcagttcgtggacatggtga R: 5'- tcttcaggaggccgacaat	992 – 1011 231 – 1212	NM_006623.4
<i>PSAT1</i>	Phosphoserine aminotransferase 1	F: 5'- tgtcaaggagcagctactgg R: 5'- gcctgcaccttgattccag	587 – 606 787 – 768	NM_021154.5
<i>PSPH</i>	Phosphoserine phosphatase	F: 5'- agcactggagaacgaggaa R: 5'- agagcagcttgaaaggcac	566 – 585 785 – 764	NM_004577.4
<i>ATF44</i>	Activating transcription factor 4	F: 5'- gtcctccaacaacagcaag R: 5'- actttctgggagatggccaa	1093 – 1112 1328 – 1309	NM_005749.4
<i>SHMT1</i>	Serine hydroxymethyltransferase 1	F: 5'- tctgccacgtccatcttctt R: 5'- cgggcatattccaggttctg	679 – 698 836 – 817	NM_004169.5
<i>SHMT2</i>	Serine hydroxymethyltransferase 2	F: 5'- tggaagccttgacctggat R: 5'- aagaagatggacgtggctga	439 – 458 637 – 618	NM_005412.6
<i>ERN1</i>	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	F: 5'- ccatgccgaagttcagatgg R: 5'- gtgaggccgcatagtcaaag	437 – 456 671 – 652	NM_001433.5
<i>XBPI</i>	X-box binding protein 1	F: 5'- tgccaccctccagaacatc R: 5'- aaggaggctggttaaggaac	584 – 603 779 – 760	NM_005080.4
<i>ACTB</i>	beta-actin	F: 5'- catccgcaaagacctgtacg R: 5'- cctgcttgctgatccacatc	948 – 967 1165 – 1146	NM_001101.5

Аналіз результатів кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі проводили за допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential Expression Calculator”. Значення рівня експресії мРНК досліджених генів нормалізували по рівню експресії мРНК АСТВ і представляли у відсотках від контролю (100 %).

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом у 2,5 % агарозному гелі, використовуючи горизонтальну камеру та ТАЕ буфер і візуалізували за

допомогою SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (“Life Technologies”, США. На Рис. 2.2 представлені результати типового електрофорезу продуктів ампліфікації.

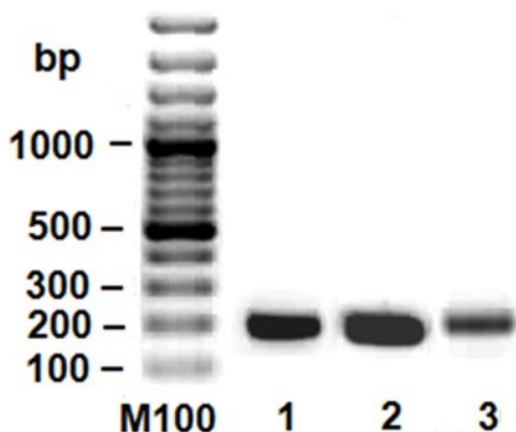


Рис. 2.2. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації PSAT1 (1), SHMT2 (2) та PSPH (3) в агарозному гелі. M100 – маркер молекулярної маси в кількості пар основ нуклеотидів (bp).

Як видно із даних, представлених на Рис. 2.2, у продуктах ампліфікації досліджених генів було виявлено лише по одній смужці, кожна із яких відповідала передбачуваним: 201 – для PSAT1, 199 – для SHMT2 і 218 – для PSPH, що разом із кривими плавлення свідчить про високу специфічність ампліфікації.

2.2.6. Визначення рівня експресії мікроРНК за допомогою кількісної полімеразної реакції у реальному часі

Рівень експресії мікроРНК у клітинах гліобластоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі з використанням специфічного для кожної мікроРНК прямого праймера і універсального для всіх мікроРНК зворотного праймера, які були отримані із “Sigma-Aldrich” (США). Їх характеристики і нуклеотидні послідовності представлені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної полімеразної ланцюгової реакції мікроРНК

Символ мікроРНК	Назва гена	Послідовності праймерів	Номери нуклеотидів	Номер у GenBank
miR-145-5p	microRNA 145	5'- gtccagttttccaggaatccct	16 - 38	NR_029686.1
miR-218-5p	microRNA 218	5'- ttgtgcttgatctaaccatgt	25 - 45	LM608363.1
miR-429-3p	microRNA 429	5'- taatactgtctggtaaaaccgt	51 - 72	NR_029957.1

Значення експресії досліджених мікроРНК були нормалізовані по рівню експресії U6 РНК і представлені як відсоток від контролю, прийнятого за 100 %. Дослідження рівня експресії мікроРНК мають важливе значення для виявлення молекулярних механізмів регуляції мРНК, які мають у 3'-нетранслюємих послідовностях специфічні сайти зв'язування мікроРНК.

2.2.7. Сайленсінг мРНК ERN1 та XBP1

Були також проведені дослідження на клітинах гліобластоми з нокдауном мРНК ERN1/IRE1 та XBP1 за допомогою специфічних малих інтерферуючих РНК (siRNA). Для цього була використана siRNA проти ERN1 людини від Eurofins MWG Operon (Німеччина), яка мала таку послідовність: 5'-GCGUCUUUUACUACGUAAUCU-3'). siRNA проти XBP1 людини (5'-GCUCUUUCCCUCAUGUAUAC), а також контрольна siRNA (ON-TARGETplus Control Pool, Non-Targeting pool; catalog: D-001810-10-05) були отримані з (Dharmacon, Horizon Discovery Group Company, США). Сайленсінг ERN1 та XBP1 проводили протягом 48 годин, як було описано Auf et al. [16].

2.2.8. Визначення ензиматичної активності PHGDH

Для визначення ензиматичної активності PHGDH у клітинах гліобластоми був використаний набір від фірми “Abcam” (Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH) Activity Assay Kit (Colorimetric); ab273328). Вимірювання активності PHGDH проводили згідно протоколу виробника. Для цього клітини гомогенізували в охолоджену на льодяній бані буфері (PHGDH Assay Buffer) і залишали на 10 хвилин. Після цього центрифугували, відбирали супернатант і визначали концентрацію протеїну. Потім протеїни осаджували сульфатом амонію, суспендували в PHGDH Assay Buffer і визначали активність PHGDH за протоколом виробника.

2.2.9. Вестерн-блот аналіз

Вестерн-блот аналіз протеїнів PSAT1 проводили як описано Minchenko et al. [199]. Для інгібування протеаз і протеїнфосфатаз використовували коктейль інгібіторів із “Roche” (Німеччина). Лізати клітин розділяли електрофорезом у 10 % поліакриламідному гелі з SDS і переносили на нітроцелюлозну мембрану (“Bio-Rad Lab.”, Німеччина), використовуючи камеру для напів-сухого переносу (semi-dry blotting system). У якості маркера молекулярної маси був використаний “Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder” (#26617). Мембрани блокували 5 % знежиреним молоком у TBST буфері протягом 2 годин, після чого інкубували з первинними антитілами до PSAT1 (rabbit polyclonal, “Novus Biologicals”, США), PSPH (mouse monoclonal, “Novus Biologicals”) та ATF4 (“Novus Biologicals”, mouse monoclonal), а також з АКТВ (mouse monoclonal, “Santa Cruz Biotechnology”) протягом 16 годин при 4 °C. Мембрани відмивали буфером TBST і інкубували з вторинними антитілами (goat anti-mouse IgG та goat anti-rabbit IgG, horse-radish peroxidase-conjugated, “Thermo Fisher Scientific”, США) протягом 1 години при кімнатній температурі і відмивали буфером TBST.

Для виявлення комплексів протеїнів із специфічними антитілами використовували Amersham ECL Western Blotting detection reagent.

2.2.10. Дослідження інтенсивності проліферації клітин

Вплив пригнічення сигнального протеїну на інтенсивність проліферації клітин гліобластоми оцінювали двома незалежними методами: за допомогою проточної цитометрії на BD Accuri C6 Flow Cytometer, як описано Maadi et al. [197], а також по змінах рівня геномної ДНК у цих клітинах. Геномну ДНК виділяли із клітин за допомогою спеціального набору (PureLink Genomic DNA Mini kit; “Thermo Fisher Scientific, Inc.”) згідно протоколу виробника і концентрацію ДНК визначали на нано-спектрофотометрі. Досліджували три популяції клітин: 1) контрольні клітини, які були трансфіковані порожнім вектором; 2) клітини з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) та 3) клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN1). Клітини сіяли на чашки у рівних кількостях і через 72 години проводили підрахунок клітин та виділяли геномну ДНК.

2.2.11. Біоінформаційний аналіз сайтів зв’язування мікроРНК із мРНК та транскрипційних факторів HIF і XBP1s із промоторними ділянками генів

Біоінформаційний аналіз 3’-нетранслюємих ділянок мРНК на наявність сайтів зв’язування мікроРНК проводили за допомогою програми TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets (http://www.targetscan.org/vert_80/). Ця програма дозволяє не лише виявити мікроРНК, що можуть зв’язуватися з вибраною нами мРНК, а і вказує на розташування місць їх взаємодії.

Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів на наявність сайтів зв'язування транскрипційних факторів HIF та XBP1s проводили для генів, відповідальних за синтезу серину. Промоторні ділянки генів знаходили на сайті <https://switchdb.switchgeargenomics.com/>, а потім проводили пошук сайтів специфічного зв'язування транскрипційних факторів HIF: A(G)CGTGC(G) та XBP1s (CCACG) на обох ланцюгах промоторної послідовності генів синтезу серину.

2.2.12. Статистична обробка отриманих результатів

Статистичну обробку даних визначення рівня експресії генів, відповідальних за синтезу серину, які були отримані в результаті проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, проводили за допомогою спеціальної Microsoft Excel програми “Differential expression calculator”. Усі значення Δ , ΔC_t від трьох повторів вимірювання були виражені як середнє арифметичне і ці середні дані чотирьох незалежних експериментів були опрацьовані статистично у GraphPad Prism 8.0.1 і виражені як $M \pm SEM$ (стандартна помилка середнього). Отримані таким чином дані були проаналізовані на нормальність їх розподілу за допомогою діаграми нормальної ймовірності), а також гістограми. Нормальний розподіл був показаний для всіх отриманих нами результатів. Оцінку показника статистичної достовірності відмінностей p здійснювали за t-критерієм Стьюдента. Для аналізу деяких наборів даних були застосовані також тести Д'Агостіно-Пірсона (p був близький до 0,95) та Шапіро – Вілка ($W > 0,9$; $p > 0,9$) як описано Rudnytska et al. [198]. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично значимою при величині похибки $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ця робота присвячена вивченню ролі синтезу серину у проліферації клітин гліобластоми лінії U87MG шляхом дослідження рівня експресії генів, відповідальних за синтез серину, у нормальних і пухлинних клітинах, а також за різних умов пригнічення активності сигнального протеїну ERN1, за гіпоксії та дефіциту глютаміну або глюкози. Це необхідно для вивчення механізмів регуляції експресії генів синтезу серину, ролі стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема сенсорно-сигнального протеїну ERN1 у цій регуляції, а також можливого вкладу цих генів у анти-проліферативний ефект, обумовлений пригніченням ERN1. Особливий акцент зроблений на вивченні функціональної ролі протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей протеїну ERN1 у регуляції експресії генів, відповідальних за синтез серину, а також ролі гіпоксії та дефіциту глютаміну і глюкози у регуляції експресії цих генів у залежності від функціональної активності протеїну ERN1.

3.1. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми у порівнянні з нормальними астроцитами людини

Першим етапом досліджень було порівняння рівнів експресії досліджених генів синтезу серину у клітинах гліобластоми лінії U87MG і нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS. Результати представлені на Рис. 3.1.

Встановлено, що рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* *SHMT1* і *SHMT2* є підвищеним у клітинах гліобластоми лінії U87MG у порівнянні з нормальними астроцитами людини лінії NHA/TS, але генів

SHMT1 і *SHMT2* – у меншій мірі, що добре узгоджується з даними літератури про важливу роль синтезу серину у рості пухлин головного мозку, зокрема гліобластом [33, 44, 45, 50-52, 58].

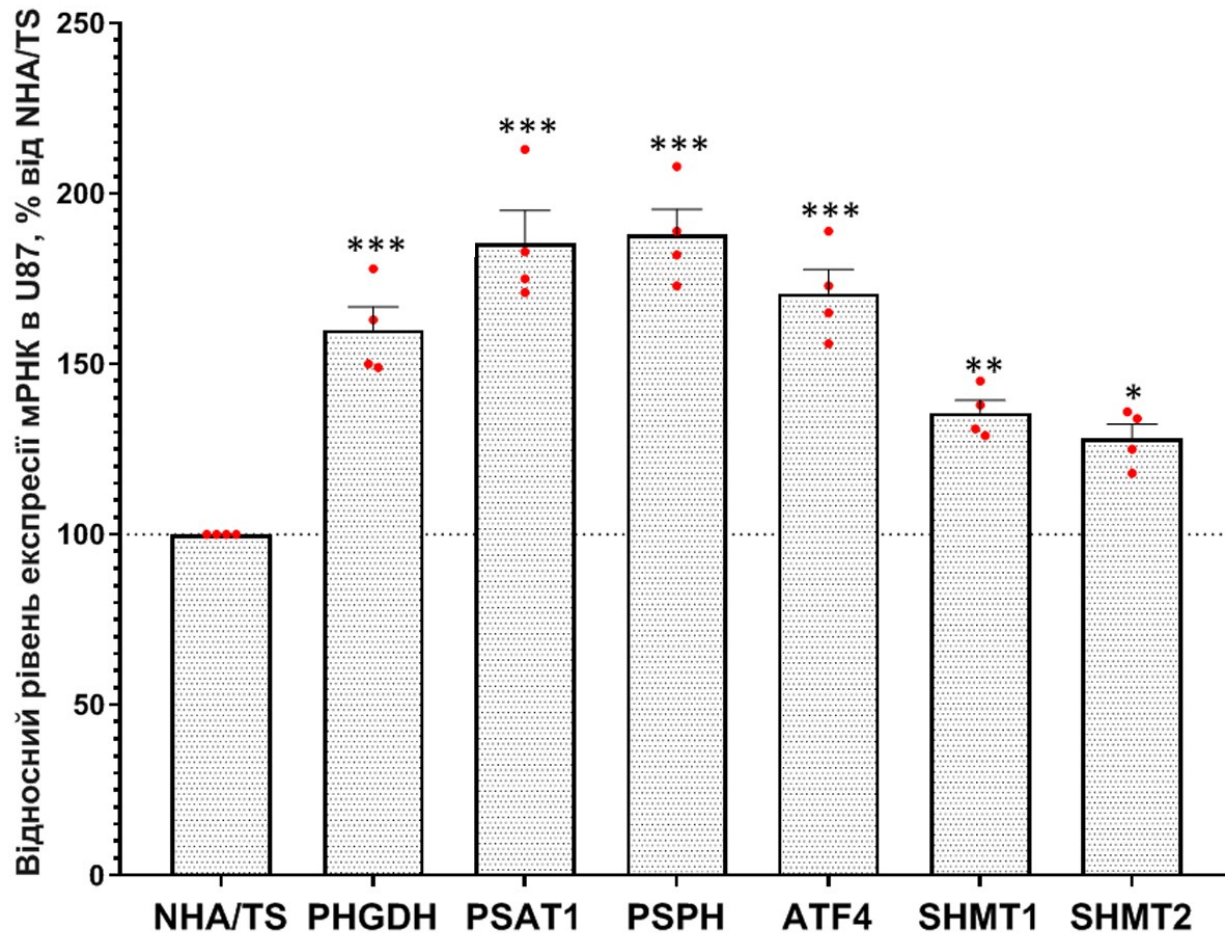


Рис. 3.1. Відносний рівень експресії мРНК PHGDH, PSAT1, PSPH, ATF4, SHMT1 та SHMT2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG у порівнянні з нормальними астроцитами людини лінії NHA/TS. Отримані значення рівня експресії цих мРНК були нормалізовані по рівню експресії ACTB і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Із даних, представлених на Рис. 3.1, видно, що рівень експресії різних генів, причетних до синтезу серину, у клітинах гліобластоми є збільшеним у

порівнянні з нормальними астроцитами людини, але по-різному. Так, рівень експресії мРНК PHGDH, PSAT1, PSPH і ATF4, підвищений у клітинах гліобластоми порівняно з нормальними астроцитами людини у значно більшій мері, ніж SHMT1 та SHMT2, що може бути обумовлено не лише участю цих ензимів у синтезі серину, оскільки для деяких із них показані неензиматичні функції, а це вказує на полі-функціональність ензимів синтезу серину [42, 44, 45, 49, 68].

3.2. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії генів, які відповідають за синтез серину, а саме PHGDH (фосфогліцератдегідрогеназа), PSAT1 (фосфосеринамінотрансфераза 1) та PSPH (фосфосеринфосфатаза), істотно знижується у клітинах гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями (протеїнкіназною і ендорибонуклеазною) сигнального протеїну ERN1 (Рис. 3.2 – 3.4).

Із даних, представлених на Рис. 3.1.1, видно зниження рівня експресії мРНК PHGDH (-31 %) у клітинах гліобластоми з пригніченими протеїнкіназною і ендорибонуклеазною активностями ERN1, але при інгібуванні лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотних змін рівня експресії мРНК PHGDH не виявлено, що вказує на участь саме протеїнкіназної активності сигнального протеїну ERN1 у регуляції мРНК фосфогліцератдегідрогенази.

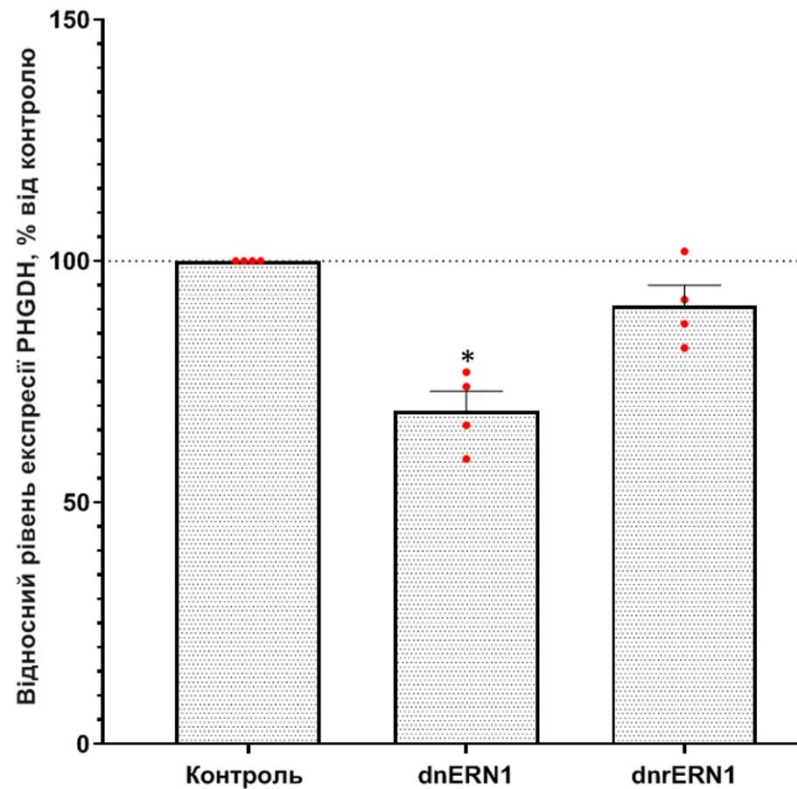


Рис. 3.2. Відносний рівень експресії мРНК PHGDH у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; * - $p < 0,05$.

Більш виражені зміни рівня експресії мРНК були встановлені при дослідженні експресії PSAT1 у клітинах гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 (Рис. 3.3). Так, було показано, що пригнічення ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей протеїну ERN1 зменшує рівень експресії мРНК PSAT1 на 45 %, але інгібування лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну призводило до ще більших змін рівня експресії цієї мРНК у порівнянні з контрольними клітинами гліобластоми (-62 %).

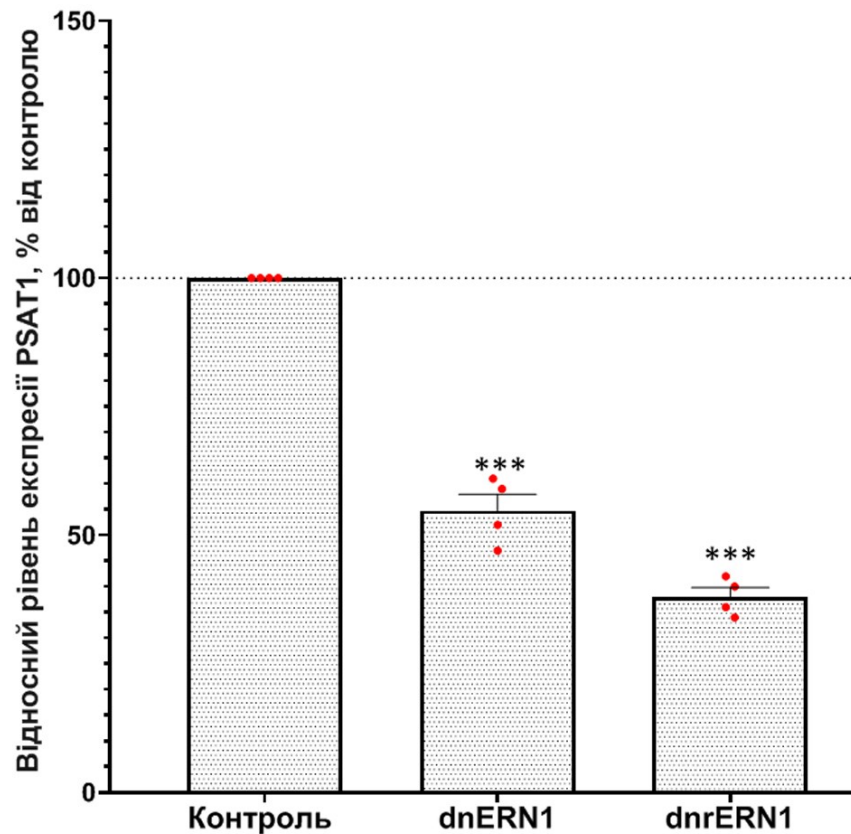


Рис. 3.3. Відносний рівень експресії мРНК PSAT1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Із представлених на Рис. 3.4 даних видно, що пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 також знижує рівень експресії мРНК фосфосеринфосфатази, але ще більшою мірою (-71 %) порівняно з PHGDH та PSAT1. Разом з тим, у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 були виявлені менш виражені зміни: рівень експресії мРНК PSPH знижувався лише на 47 % у порівнянні з контрольними клітинами гліобластоми (Рис. 3.4).

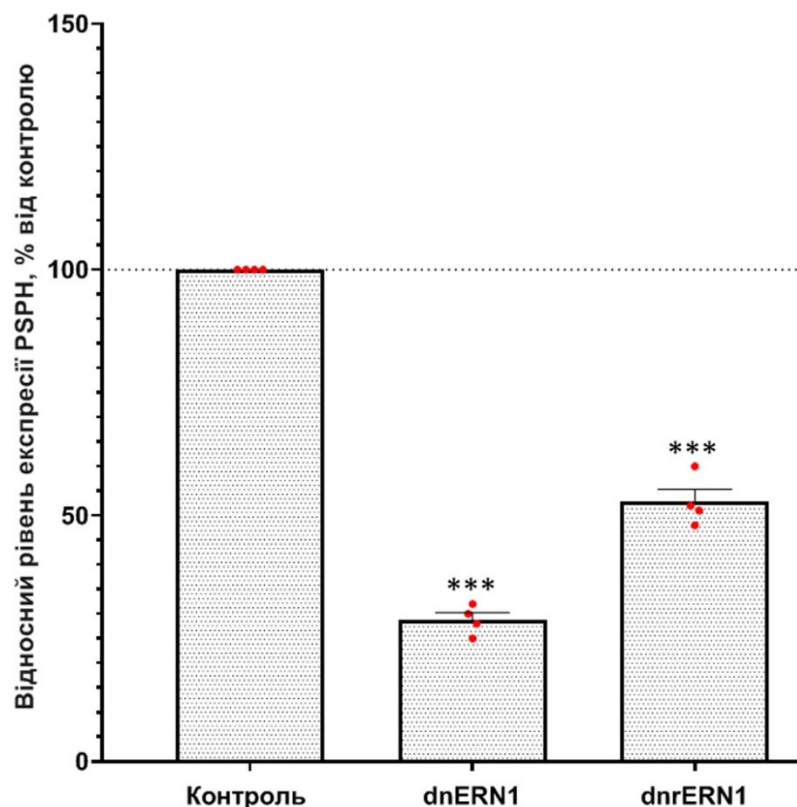


Рис. 3.4. Відносний рівень експресії мРНК PSPH у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Разом з тим, при дослідженні рівня експресії гена *SHMT1*, який каталізує оборотне перетворення серину і тетрагідрофолату в гліцин і 5,10-метилентетрагідрофолат, було виявлено, що інгібування ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей ERN1 різко підвищує рівень експресії мРНК *SHMT1* (+137 %) у клітинах гліобластоми у порівнянні з контрольними клітинами (Рис. 3.5). У той же час, пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 істотно не впливало на рівень

експресії мРНК серингідроксиметилтрансферази 1 у клітинах гліобластоми (Рис. 3.5).

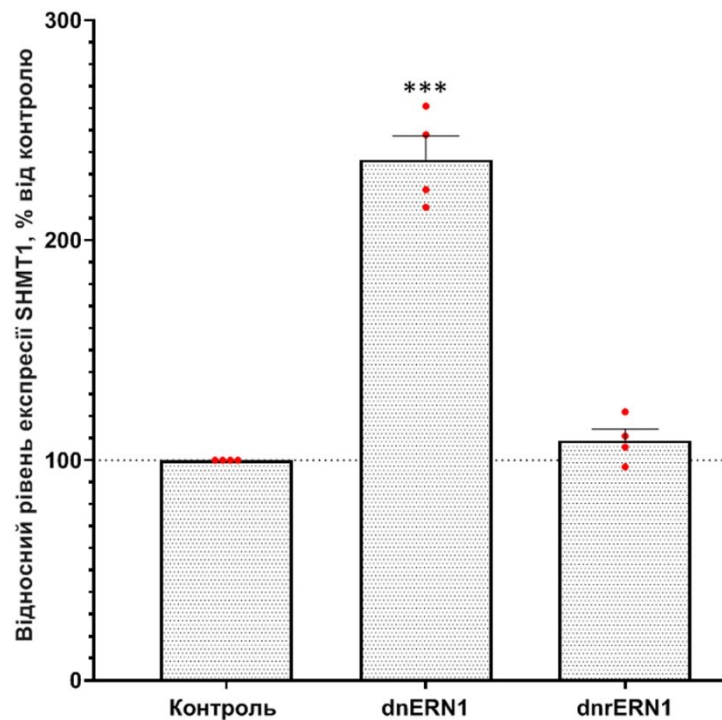


Рис. 3.5. Відносний рівень експресії мРНК SHMT1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Також були проведені дослідження рівня експресії гена серингідроксиметилтрансферази 2 (SHMT2), який кодує ензим для мітохондрій і має свої особливості регуляції і функціональне значення [50, 52, 57-62]. Встановлено, що інгібування ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей ERN1 знижує рівень експресії мРНК SHMT2 (-29 %) у клітинах гліобластоми у порівнянні з контрольними клітинами (Рис.

3.6). Більше того, пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 також істотно не впливало на рівень експресії цієї мРНК у клітинах гліобластоми подібно до SHMT1 (Рис. 3.6).

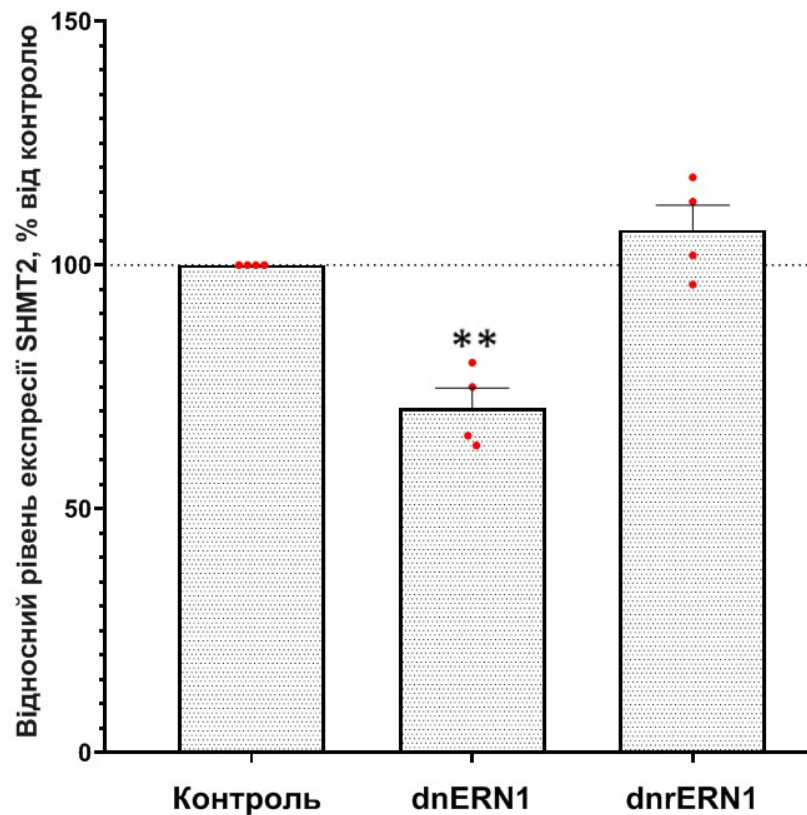


Рис. 3.6. Відносний рівень експресії мРНК SHMT2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії мРНК SHMT2 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ** - $p < 0,01$.

До синтезу серину також причетний залежний від стресу ЕР транскрипційний фактор ATF4, який контролює експресію фосфосеринамінотрансферази 1. Проведені дослідження продемонстрували, що пригнічення ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей

сигнального протеїну ERN1 у клітинах гліобластоми (dnERN1) знижує рівень експресії цього транскрипційного фактора на 34 %, але й у клітинах без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) спостерігаються подібні зміни рівня експресії ATF4 (-35 %) у порівнянні з контрольними клітинами (Рис. 3.1.6).

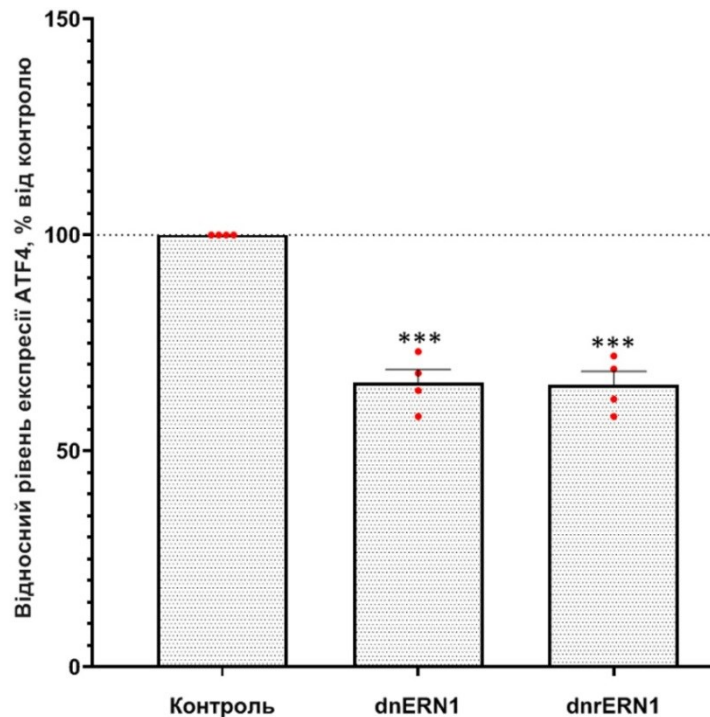


Рис. 3.7. Відносний рівень експресії мРНК ATF4 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Таким чином, результати проведених досліджень чітко продемонстрували залежність експресії генів, причетних до синтезу серину, у клітинах гліобластоми від пригнічення стресу ЕР, а саме його сигнального шляху ERN1, причому ця залежність є переважно різною за умов

пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 і за умов інгібування обох його ензиматичних активностей, що вказує на участь у регуляції експресії генів не лише ендорибонуклеазної активності ERN1, а і протеїнкіназної активності цього сигнального протеїну.

Для перевірки залежності експресії досліджених генів, причетних до синтезу серину, від пригнічення сигнального протеїну ERN1, ми використали ще й інший спосіб пригнічення рівня мРНК ERN1 та залежної від цього сигнального протеїну мРНК ХВР1, метод сайленсінгу мРНК за допомогою специфічних до них siRNA. Результати проведених досліджень представлені на Рис. 3.8 – 3.11.

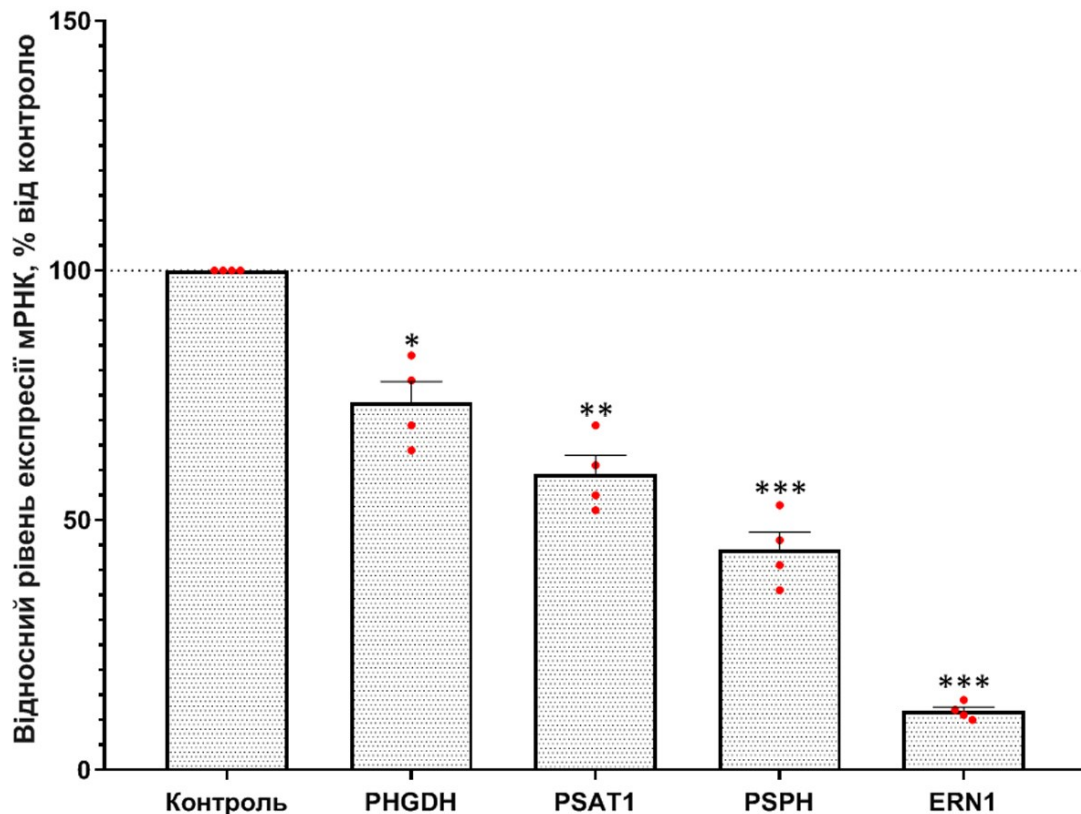


Рис. 3.8. Відносний рівень експресії мРНК PHGDH, PSAT1, PSPH та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG після сайленсінгу ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siERN1 у порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольною siRNA (контроль). Отримані значення рівня експресії цих мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

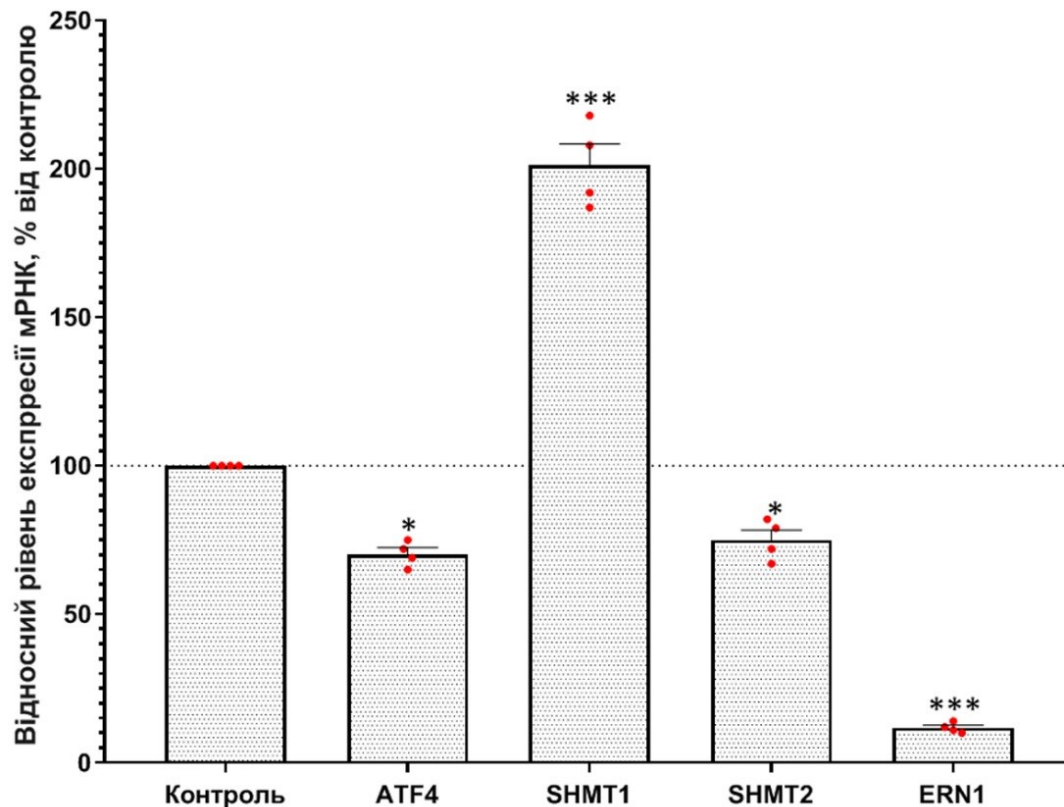


Рис. 3.9. Відносний рівень експресії мРНК ATF4, SHMT1, SHMT2 та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG після сайленсінгу ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siERN1 у порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольною siRNA (контроль). Отримані значення рівня експресії цих мРНК були нормалізовані по рівню експресії ACTB і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Встановлено, що рівень мРНК сигнального протеїну ERN1 знизився на 88 % через 48 годин після трансфекції клітин гліобластоми лінії U87MG специфічною до ERN1 людини siRNA у порівнянні з клітинами гліобластоми, які були трансфіковані контрольною siRNA. При цьому показано, що рівень експресії мРНК PHGDH, PSAT1, PSPH та транскрипційного фактора ATF4 знижувався на 27, 41, 56 і 30 відсотків, відповідно, у клітинах гліобластоми з пригніченим у результаті сайленсінгу мРНК ERN1 (Рис. 3.8 – 3.9). У той же час, рівень експресії мРНК SHMT1 та

SHMT2 у цих клітинах гліобластоми істотно не змінювався у порівнянні з клітинами трансфікованими контрольною siRNA (Рис. 3.9).

Разом з тим, сайленсінг мРНК XBP1 за допомогою специфічної до XBP1 людини siRNA у клітинах гліобластоми призводив до дещо інших змін рівня експресії генів, відповідальних за синтезу серину, а саме PHGDH, PSAT1, PSPH, ATF4, SHMT1 та SHMT2 (Рис. 3.10 – 3.11).

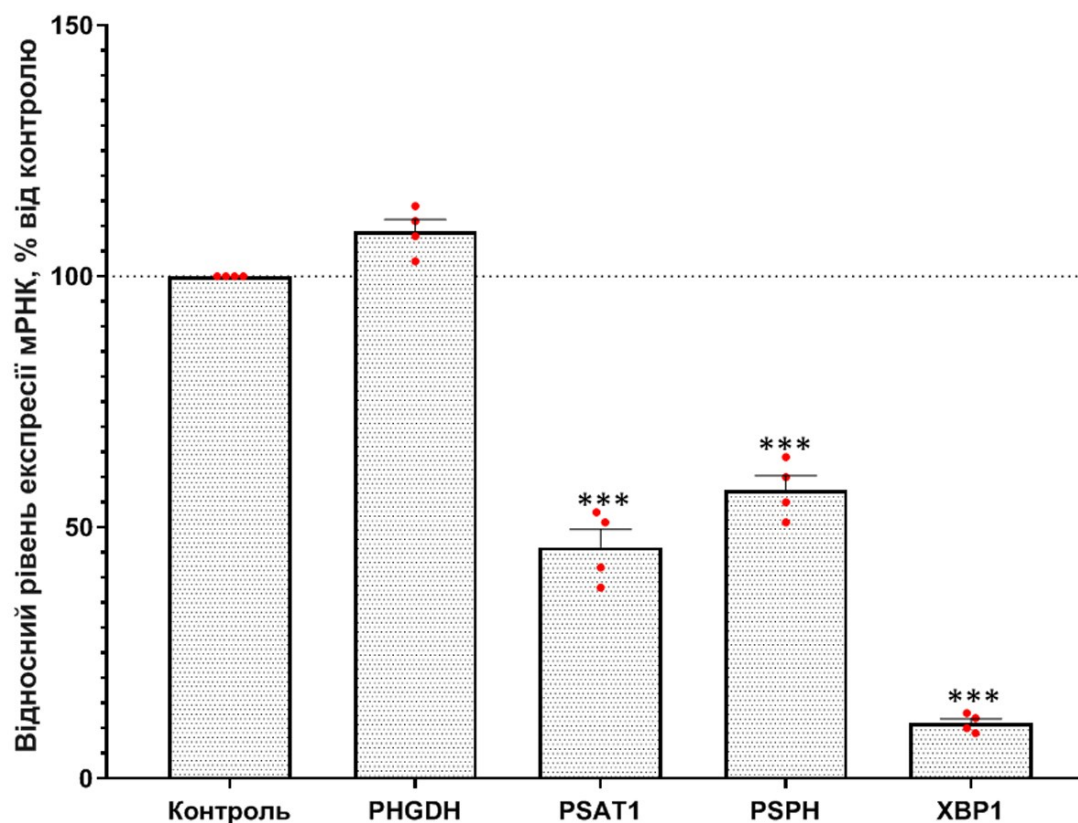


Рис. 3.10. Відносний рівень експресії мРНК PHGDH, PSAT1, PSPH та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG після сайленсінгу ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siERN1 у порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольною siRNA (контроль). Отримані значення рівня експресії цих мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Так, у результаті сайленсінгу мРНК XBP1 рівень експресії цієї мРНК знижувався на 89 %, а мРНК PSAT1, PSPH і транскрипційного фактора ATF4 на 54, 43 та 29 відсотків, відповідно, у клітинах гліобластоми у порівнянні з

трансфікованими контрольною siRNA клітинами (Рис. 3.1.10 – 3.1.11). Проте, рівень експресії мРНК PHGDH, SHMT1 та SHMT2 істотно не змінювався у клітинах гліобластоми після сайленсінгу мРНК XBP1 при порівнянні з дією на клітини контрольної siRNA (Рис. 3.1.10 – 3.1.11).

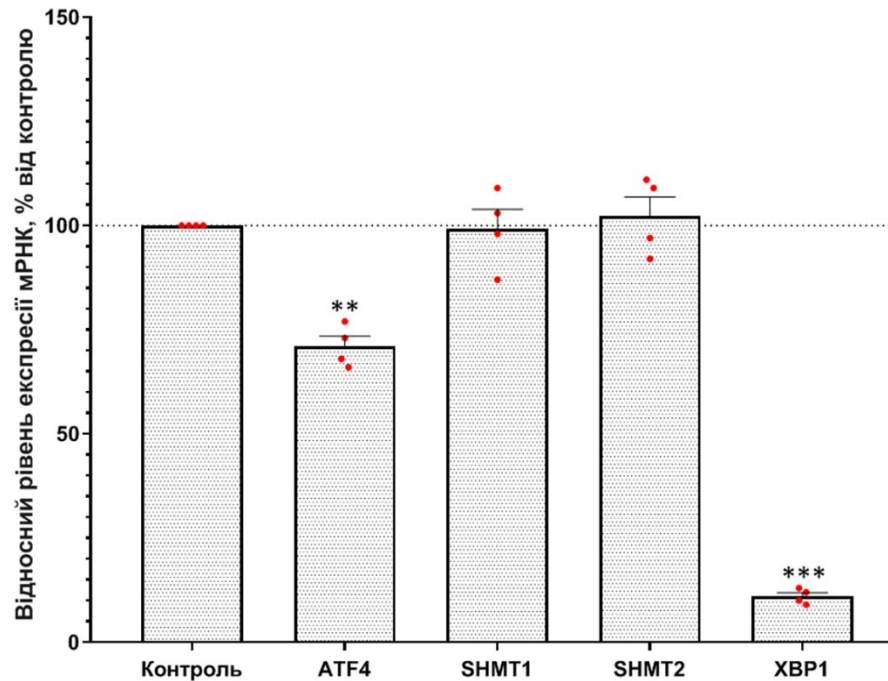


Рис. 3.11. Відносний рівень експресії мРНК ATF4, SHMT1, SHMT2 та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG після сайленсінгу ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siER1 у порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольною siRNA (контроль). Отримані значення рівня експресії цих мРНК були нормалізовані по рівню експресії ACTB і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$.

Таким чином, дослідження, що були проведені на клітинах гліобластоми з пригніченням сигнального протеїну ERN1 та його таргетної мРНК XBP1, чітко продемонстрували відносну незалежність змін в експресії генів синтезу і метаболізму серину від способу пригнічення протеїну ERN1 (dnER1 чи специфічний сайленсінг), але виявлена різна залежність експресії цих генів від ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей ERN1.

Вестерн-блот аналіз рівня протеїнів PSAT1, PSPH та ATF4 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) та у клітинах без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERН1) показав, що рівень цих протеїнів є зниженим у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки, але це зниження є більш вираженим для PSAT1 за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 (Рис. 3.12 – 3.14).

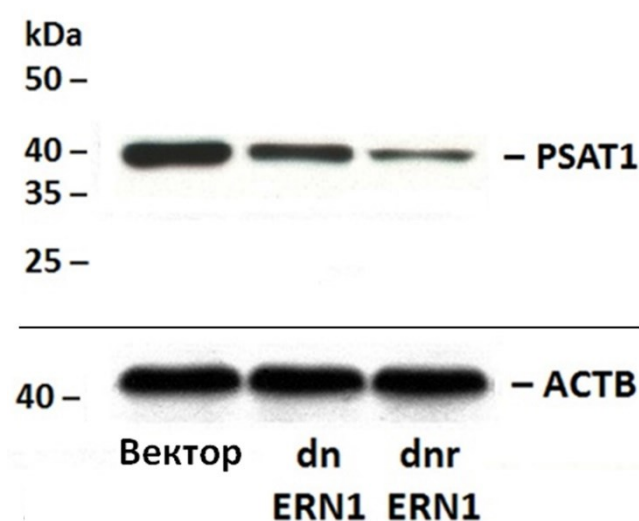


Рис. 3.12. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну PSAT1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERН1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERН1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки (вектор).

Отримані результати узгоджуються з наведеними вище даними по впливу пригнічення ензиматичних активностей ERN1 (обох чи лише ендорибонуклеазної) на рівень експресії мРНК ензимів синтезу серину та транскрипційного фактора ATF4.

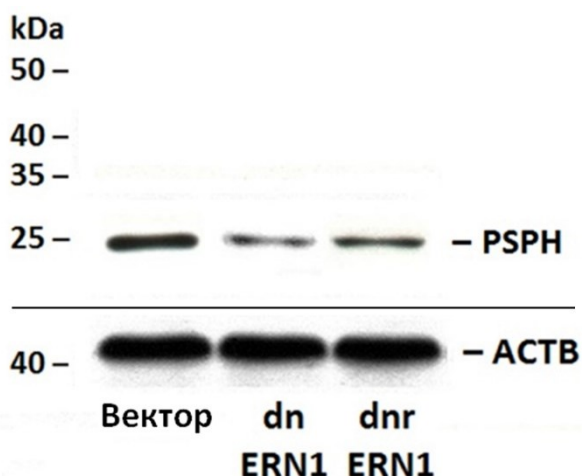


Рис. 3.13. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну PSPH у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERН1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERН1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки (вектор).

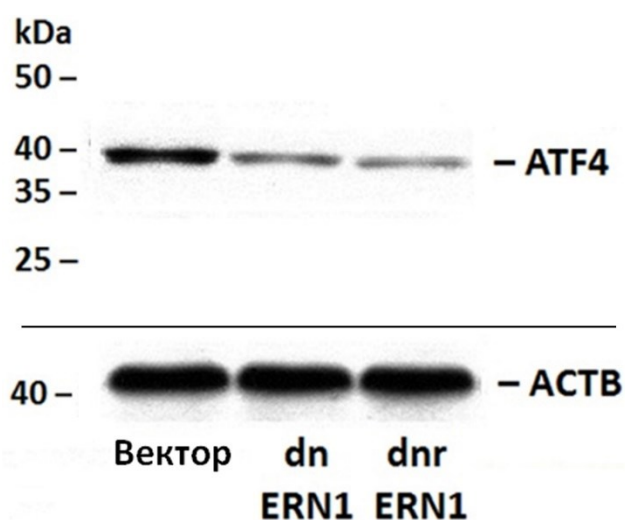


Рис. 3.14. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну транскрипційного фактору ATF4 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERН1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERН1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки (вектор).

Оскільки PHGDH є ключовим ензимом синтезу серину, ми визначали ще і його ензиматичну активність у клітинах гліобластоми за допомогою набору “Phosphoglycerate Dehydrogenase (PHGDH) Activity Assay Kit (Colorimetric)” згідно протоколу виробника (фірма “Abcam”). Встановлено, що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 знижує специфічну активність PHGDH у клітинах гліобластоми з dnER1 на 35 % у порівнянні з контролем (Рис. 3.15).

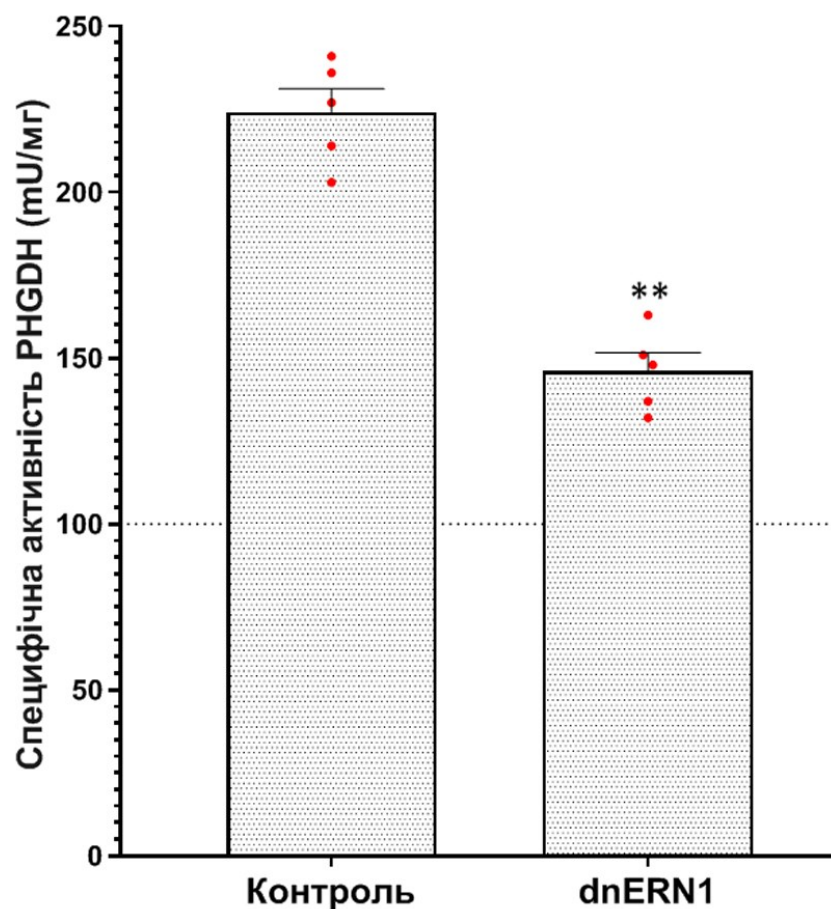


Рис. 3.15. Ензиматична активність фосфогліцератдегідрогенази, ключового ензиму синтезу серину, у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 у порівнянні з контролем. Отримані значення рівня активності PHGDH були нормалізовані по рівню протеїну в пробах і представлені у mU/мг протеїну; $n = 5$; ** - $p < 0,01$.

Отримані результати продемонстрували, що за пригнічення сигнального протеїну ERN1 має місце не лише зниження рівня експресії мРНК PHGDH за рахунок пригнічення протеїнкінази ERN1, а і зменшення рівня протеїну, що кодується цією мРНК, а також зниження відносної ензиматичної активності фосфогліцератдегідрогенази.

Була також проведена оцінка інтенсивності проліферації клітин гліобластоми за умов пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 двома незалежними методами: за допомогою проточної цитометрії на BD Accuri C6 Flow Cytometer, а також по змінах рівня геномної ДНК у трьох досліджених популяціях клітин: 1) контрольні клітини, які були трансфіковані порожнім вектором; 2) клітини з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) і 3) клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN1). Клітини розсівали на чашки у рівних кількостях і ростили протягом трьох діб. Після цього проводили підрахунок клітин, а також виділяли геномну ДНК та вимірювали її концентрацію.

Проведеними дослідженнями на цитометрі встановлено, що після 72 годин вирощування кількість клітин гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (протеїнкіназною і ендорибонуклеазною) зменшилася на 55 %, а клітин з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN1) також зменшилася, але значно сильніше (-80 %) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими порожнім вектором (Рис. 3.16). Отримані результати вказують на зниження проліферативної активності клітин гліобластоми під впливом пригнічення ензиматичних активностей ERN1, причому більш виражений ефект спостерігався за умов інгібування лише ендорибонуклеазної активності цього сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума порівняно з пригніченням обох ензиматичних активностей.

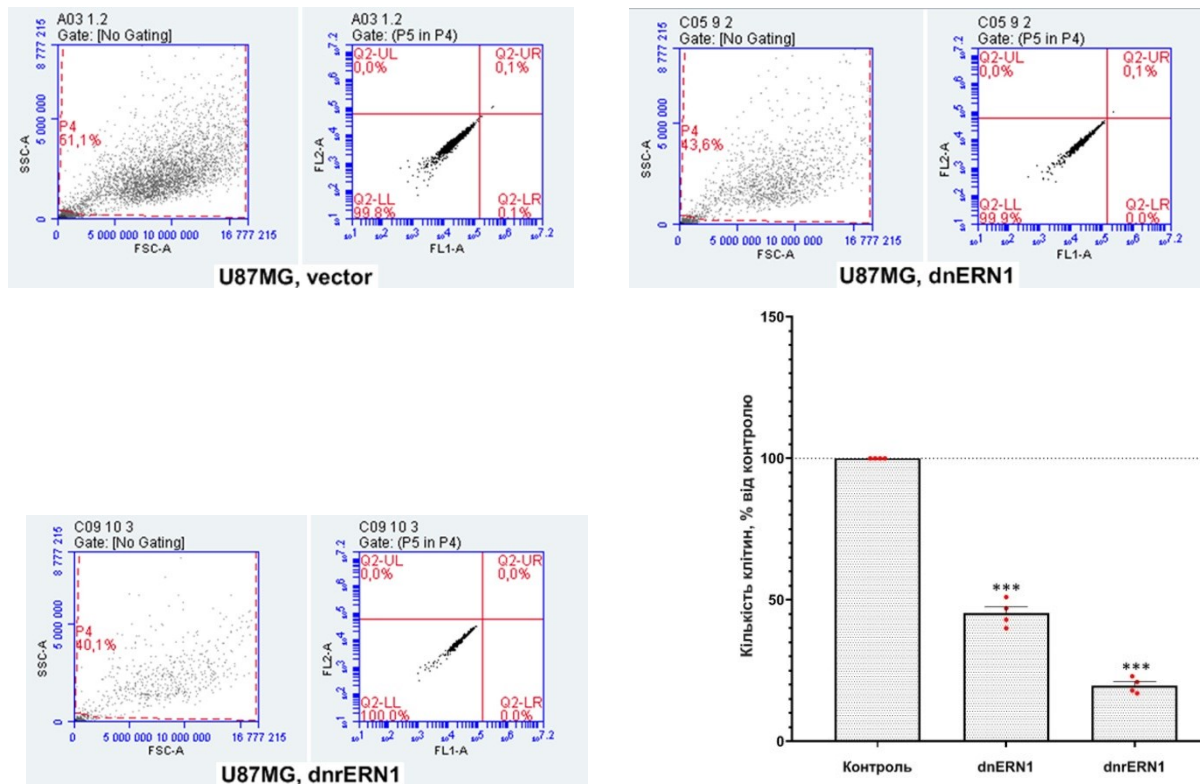


Рис. 3.16. Кількість клітин гліобластоми у культурі після 72 годин вирощування за даними проточної цитометрії: U87, vector – контрольні клітини гліобластоми, трансфіковані порожнім вектором; U87, dnERN1 – клітини з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1; U87, dnrERN1 – клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1; dnERN1 та dnrERN1 порівнювали з контрольними клітинами; $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

Більш точним і адекватним методом оцінки проліферації клітин є кількість геномної ДНК у культурі клітин, оскільки поділ клітин обов'язково пов'язаний із дуплікацією ДНК. Для цього із культури клітин виділяли геномну ДНК за допомогою спеціального набору і визначали її концентрацію. Встановлено, що у культурі клітин гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 рівень геномної ДНК знизився після 72 годин вирощування на 62 % і ще більшою мірою у

культури клітин з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (Рис. 3.17).

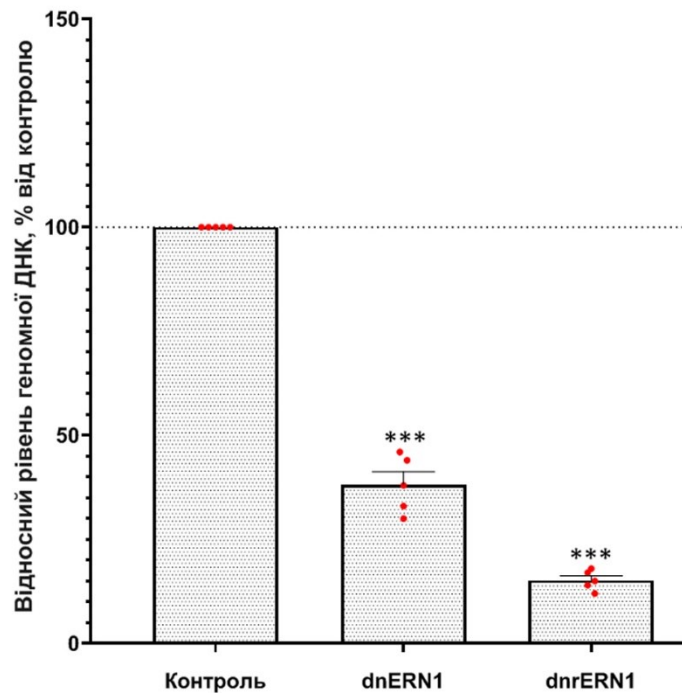


Рис. 3.17. Рівень геномної ДНК у культурі клітин гліобластоми після 72 годин вирощування: dnERN1 – клітини з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1, dnrERN1 – клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 у порівнянні з контрольними клітинами гліобластоми, трансфікованими вектором без вставки); $n = 5$; ***- $p < 0,001$.

Результати визначення проліферативного потенціалу клітин гліобластоми шляхом визначення рівня геномної ДНК у культурі клітин добре узгоджуються з даними проточної цитометрії і вказують на виражений анти-проліферативний ефект пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1, а особливо його ендорибонуклеазної активності.

Таким чином, наведені вище дані чітко продемонстрували зниження рівня експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов пригнічення ензиматичних активностей ERN1, основного сенсорно-сигнального шляху стресу ER і асоціацію цих змін зі зниженою

проліферацією цих клітин. Але залишалося не в'ясненим питання про чутливість експресії цих генів від інших сигнальних шляхів стресу ЕР.

Для в'яснення залежності експресії генів синтезу серину від інших сенсорно-сигнальних систем стресу ЕР, були проведені дослідження по впливу тунікаміцину на рівень експресії цих генів у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1. Як видно із даних, представлених на Рис. 3. 18, рівень експресії мРНК PHGDH істотно не змінюється у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1, але різко посилюється (+196 %) за умов індукції стресу ЕР тунікаміцином.

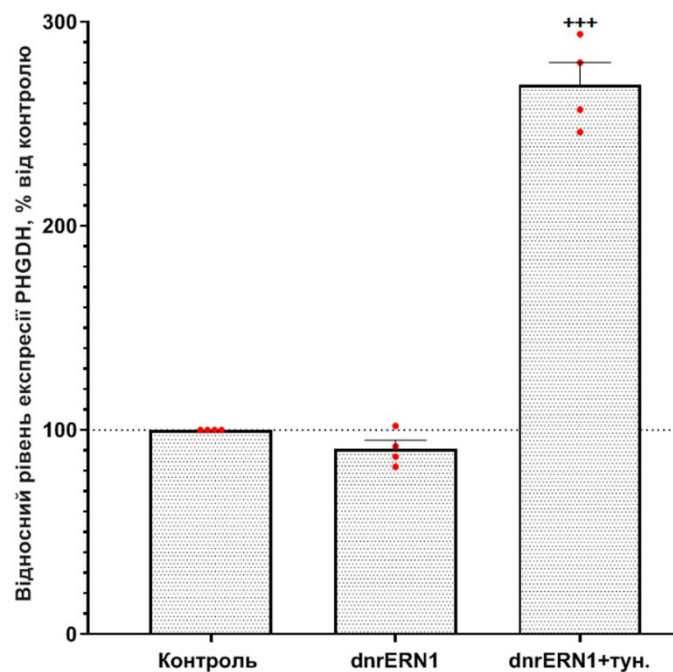


Рис. 3. 18. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК PHGDH у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

Ці результати вказують на участь інших сенсорно-сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції експресії мРНК PHGDH у клітинах гліобластоми.

При дослідженні рівня експресії мРНК PSAT1 було також виявлено різке його підвищення (+316 %) за умов індукції стресу ЕР тунікаміцином у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1, хоча рівень експресії мРНК PSAT1 у цих клітинах є сильно зниженим (-62 %; Рис. 3.19).

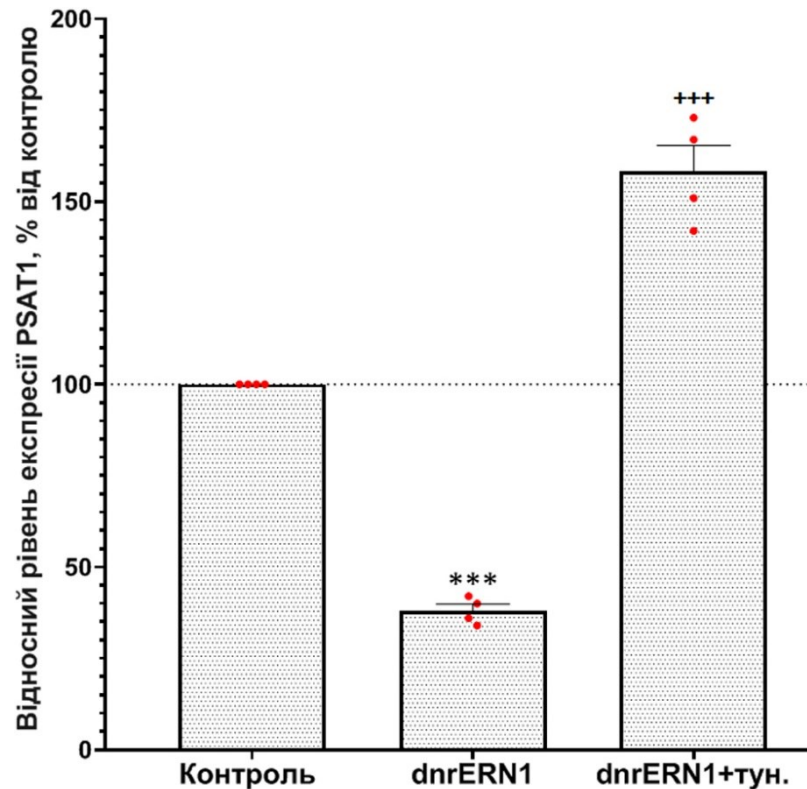


Рис. 3.19. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК PSAT1 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$ при порівнянні з контролем; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

Подібні, але менш виражені зміни в експресії мРНК були виявлені для фосфосеринфосфатази. Так, рівень експресії мРНК PSPH у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1

підвищувався під впливом індукованого тунікаміцину стресу ЕР на 166 % на фоні значного зниження експресії цієї мРНК на 47 % у клітинах гліобластоми без ендорибонуклеазної активності ERN1 (Рис. 3.20).

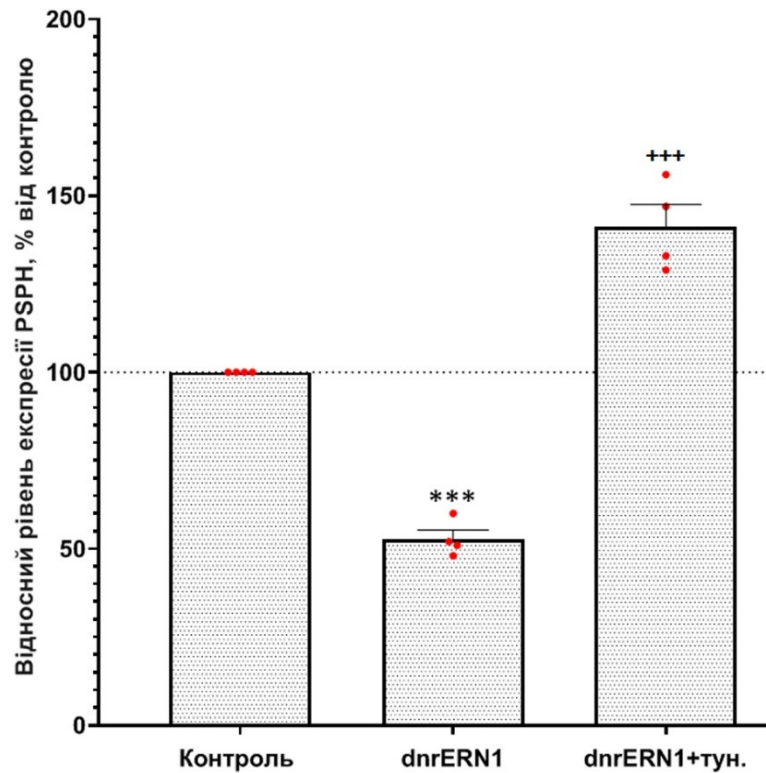


Рис. 3.20. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК PSPH у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *** - $p < 0,001$ при порівнянні з контролем; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

Отримані результати переконливо свідчать про чутливість експресії генів *PSAT1* та *PSPH* у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 до інших сигнальних систем стресу ЕР, що індукуються тунікаміцином.

Добре відомо, що експресія транскрипційного фактора ATF4 активується PERK сигнальним шляхом стресу ER, але його експресія залежить і від сигнального протеїну ERN1, оскільки у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю цього протеїну знижується на 35 % (Рис. 3.21). За дії тунікаміцину експресія транскрипційного фактора ATF4 різко підвищується (+317 %), що може бути опосередковано і сигнальним шляхом PERK (Рис. 3.21).

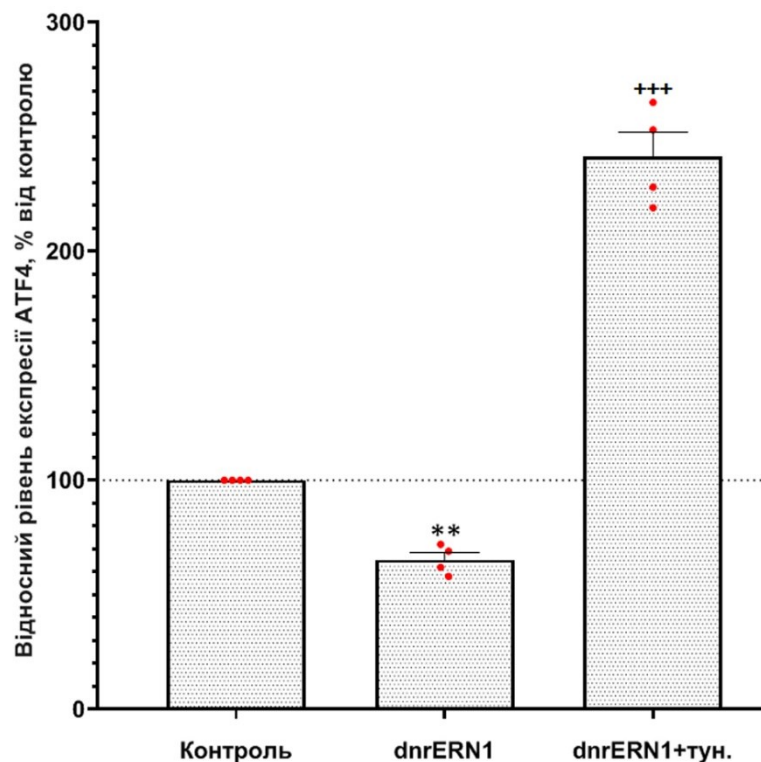


Рис. 3.21. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК ATF4 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ** - $p < 0,01$ при порівнянні з контролем; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

Дослідження експресії генів метаболізму серину таких як серингідроксиметилтрансфераза 1 і 2 показало їх різну реакцію на індукований тунікаміцином стрес ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1, хоча само пригнічення цієї ензиматичної активності ERN1 істотно не впливало на рівень експресії мРНК як SHMT1, так і SHMT2 (Рис. 3.22 та 3.23). Так, рівень експресії гена серингідроксиметилтрансферази 1 під впливом тунікаміцину різко зменшувався (-71 %) у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (Рис. 3.22).

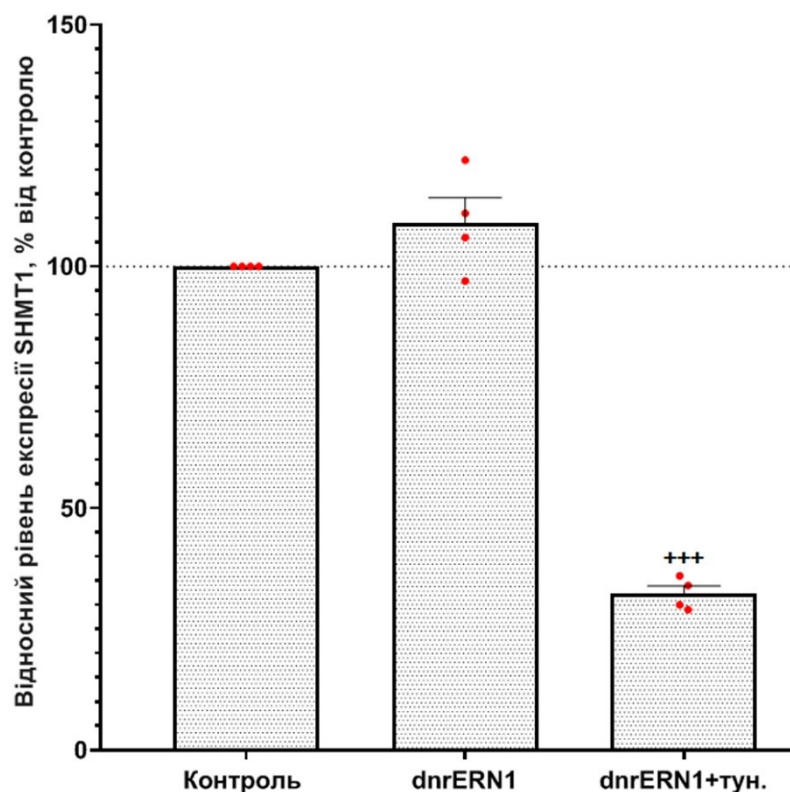


Рис. 3.22. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК SHMT1 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

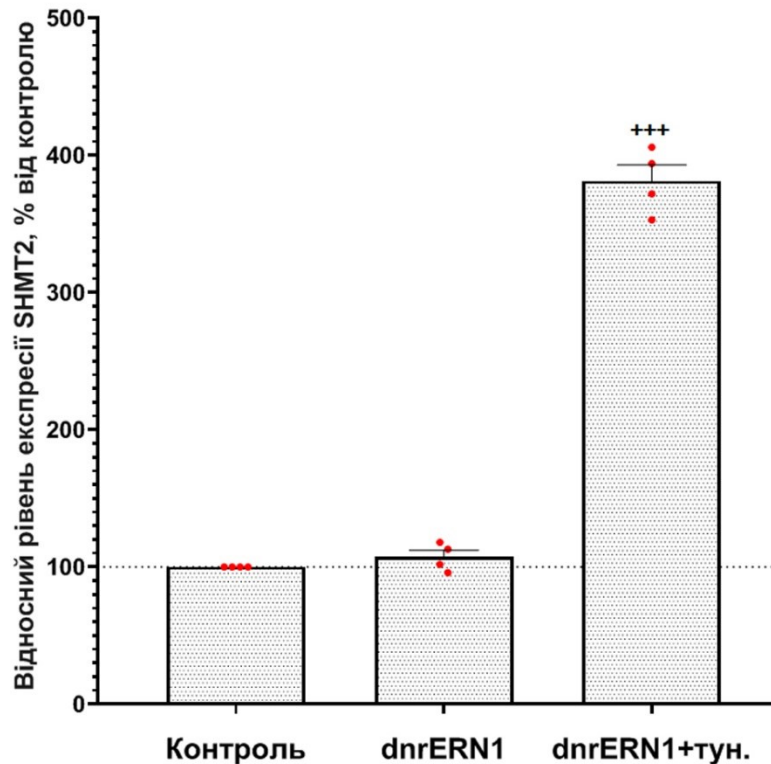


Рис. 3.23. Вплив тунікаміцину (тун.) на рівень експресії мРНК SHMT2 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN). Контроль – контрольні клітини, трансфіковані вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; +++ - $p < 0,001$ при порівнянні з dnrERN1.

Разом з тим, рівень експресії гена серингідроксиметилтрансферази 2, що кодує ензим мітохондрій, під впливом індукованого тунікаміцином стресу ендоплазматичного ретикулума різко збільшувався (+256 %) у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 (Рис. 3.23).

Таким чином, отримані результати вказують на участь й інших сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми, хоча і по-різному.

3.3. Вплив гіпоксії на рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми

У зв'язку з тим, що гіпоксія є важливим фактором розвитку і росту злоякісних пухлин, ми провели дослідження по вивченню впливу диметилноксалілгліцину, який імітує ефекти гіпоксії шляхом пригнічення активності пролілгідроксилази альфа-субодиниці HIF, на рівень експресії генів, відповідальних за синтез серину, а також транскрипційного фактора ATF4, у клітинах гліобластоми. Для цього були використані клітини гліобластоми з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnER1) і контрольні клітини, трансфіковані вектором pcDNA3.1 без вставки.

Проведеними дослідженнями встановлено, що експресія гена *PHGDH* є чутливою до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми і що рівень експресії фосфогліцератдегідрогенази за умов гіпоксії збільшується на 62 % порівняно до клітин, що не піддавалися впливу диметилноксалілгліцину. Але у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена *PHGDH* був значно більшим (+101 %), що вказує на залежність гіпоксичної регуляції експресії гена фосфогліцератдегідрогенази у клітинах гліобластоми лінії U87MG від ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1, причому пригнічення цих активностей значно підвищує чутливість експресії фосфогліцератдегідрогенази, ключового гена синтезу серину, до умов гіпоксії (Рис. 3.24).

У той же час, рівень експресії гена фосфосеринамінотрансферази 1 у контрольних клітинах гліобластоми є менш чутливим до умов індукованої диметилноксалілгліцином гіпоксії порівняно з геном фосфогліцератдегідрогенази, але пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 різко збільшує реакцію гена *PSAT1* на гіпоксію.

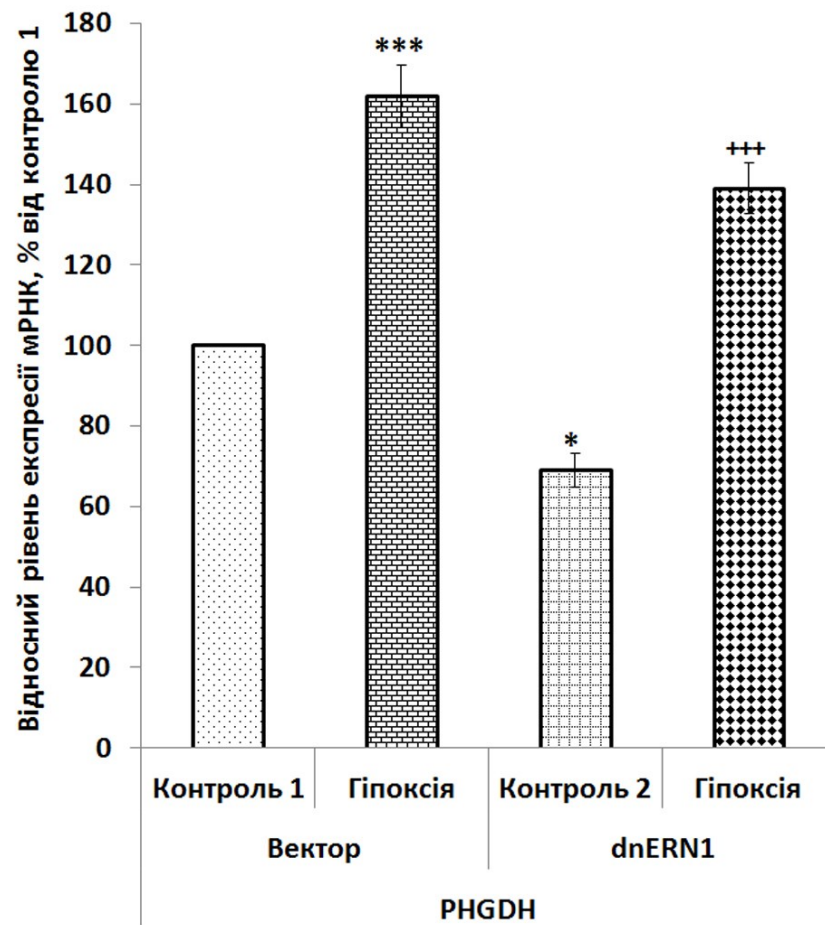


Рис 3.3.1. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PHGDH у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та у клітинах з пригніченими протеїнкіназною і ендорибонуклеазною активностями сигнального протеїну ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК PHGDH були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Так, рівень експресії гена фосфосеринамінотрансферази 1 у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 збільшувався за умов гіпоксії аж на 226 % (Рис. 3.25).

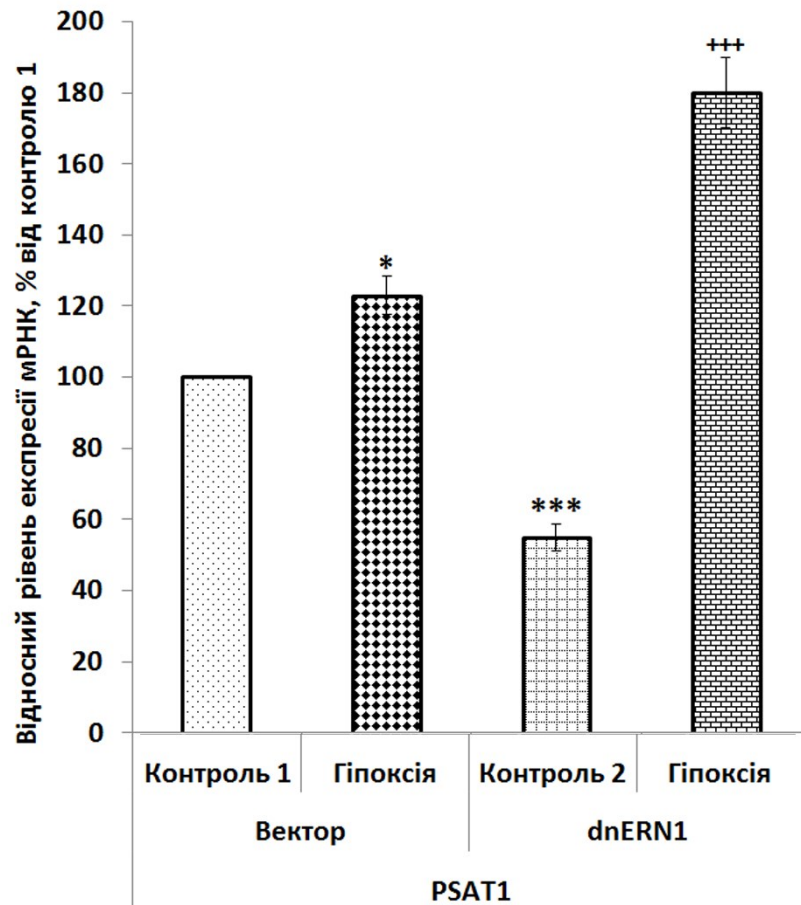


Рис 3.25. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PSAT1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК фосфосеринамінотрансферази 1 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Із даних, наведених на Рис. 3.26, видно, що рівень експресії гена *PSPH* знижується за умов гіпоксії на 29 % у контрольних клітинах гліобластоми, але у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального

протеїну ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена фосфосеринфосфатази відсутній.

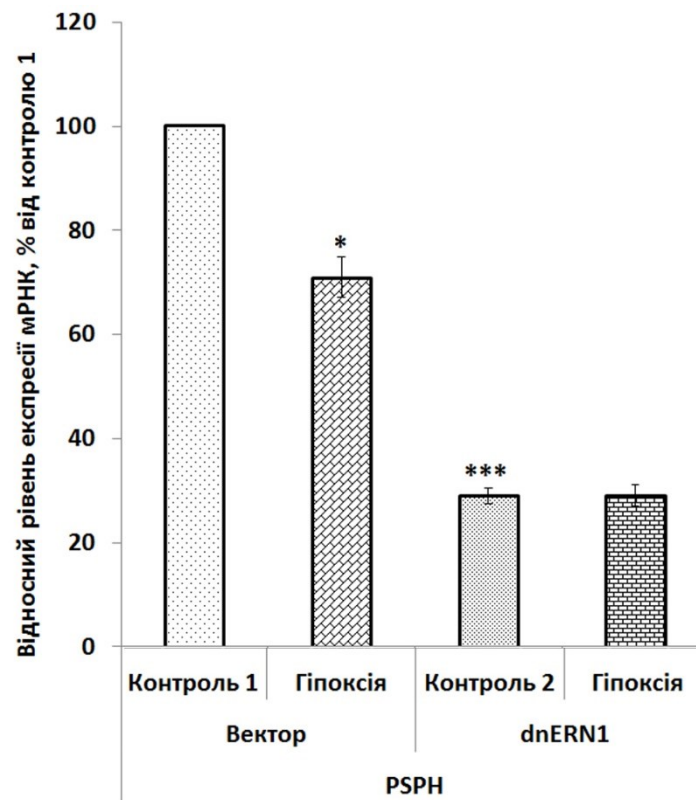


Рис 3.26. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PSPH у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК PSPH були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1.

Отримані результати вказують на те, що гіпоксична регуляція експресії гена фосфосеринфосфатази у клітинах гліобластоми контролюється ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1, але у зворотному до генів *PHGDH* та *PSAT1* напрямку, і що пригнічення ензиматичних

активностей ERN1 знімає чутливість експресії цього важливого гена синтезу серину до умов гіпоксії.

На Рис 3.27. приведені результати впливу гіпоксії на рівень експресії мРНК транскрипційного фактора ATF4 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1.

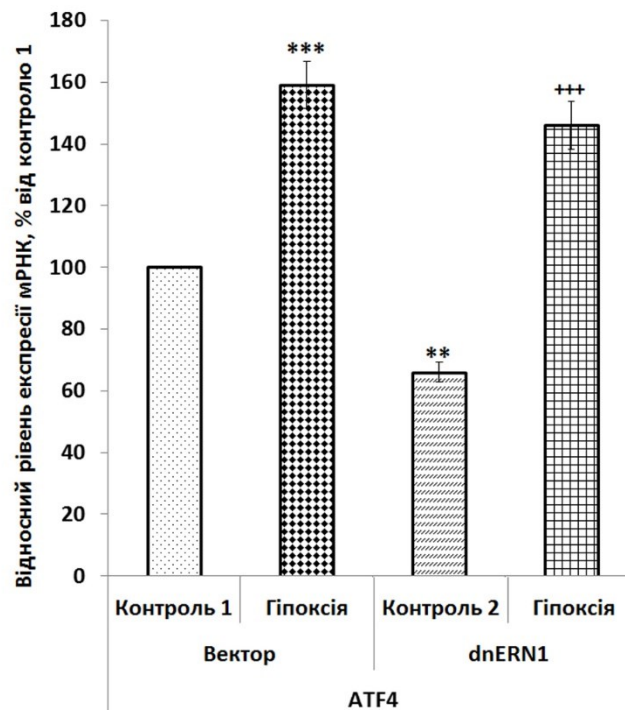


Рис 3.27. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК ATF4 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Встановлено, що рівень експресії гена транскрипційного фактора ATF4, який контролює експресію фосфосеринамінотрансферази 1, також

виражено посилюється, як і гена *PSAT1*, за умов гіпоксії, причому збільшення рівня експресії гена цього транскрипційного фактора виявляється як у контрольних клітинах гліобластоми (+59 %), так і у клітинах з пригніченою протеїнкіназною і ендорибонуклеазною активностями ERN1 (+121 %; Рис. 3.27).

На Рис. 3.28 представлені результати гіпоксичної регуляції експресії гена *SHMT1* у клітинах гліобластоми.

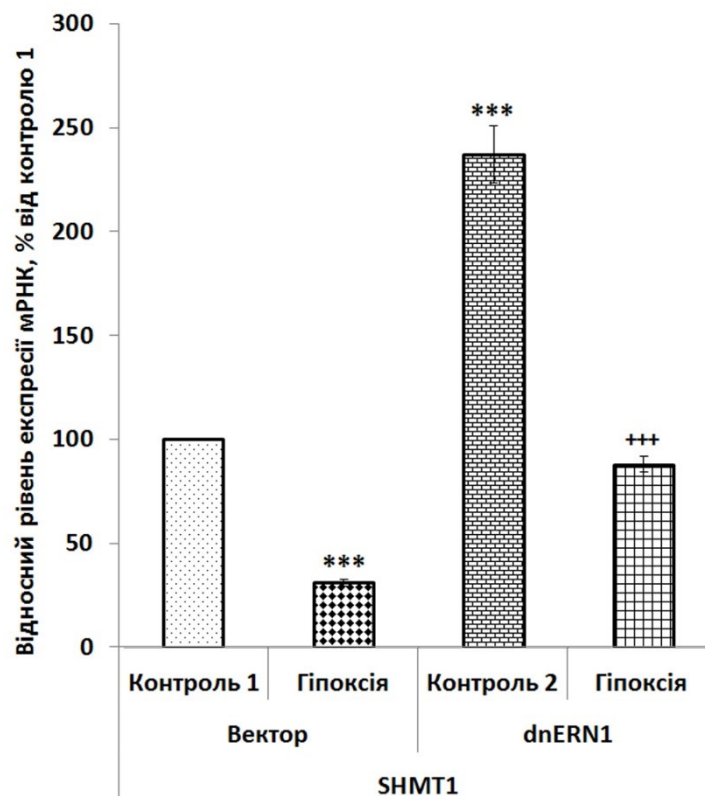


Рис 3.28. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК *SHMT1* у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Із даних, наведених на Рис. 3.28, видно, що рівень експресії гена *SHMT1* знижується за умов гіпоксії аж на 69 % у контрольних клітинах гліобластоми, але у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена серингідроксиметилтрансферази 1 є подібним (-63 %). Ці дані вказують на відносну незалежність гіпоксичної регуляції *SHMT1* від ERN1.

На Рис. 3.29 представлені результати гіпоксичної регуляції експресії гена *SHMT2* у клітинах гліобластоми.

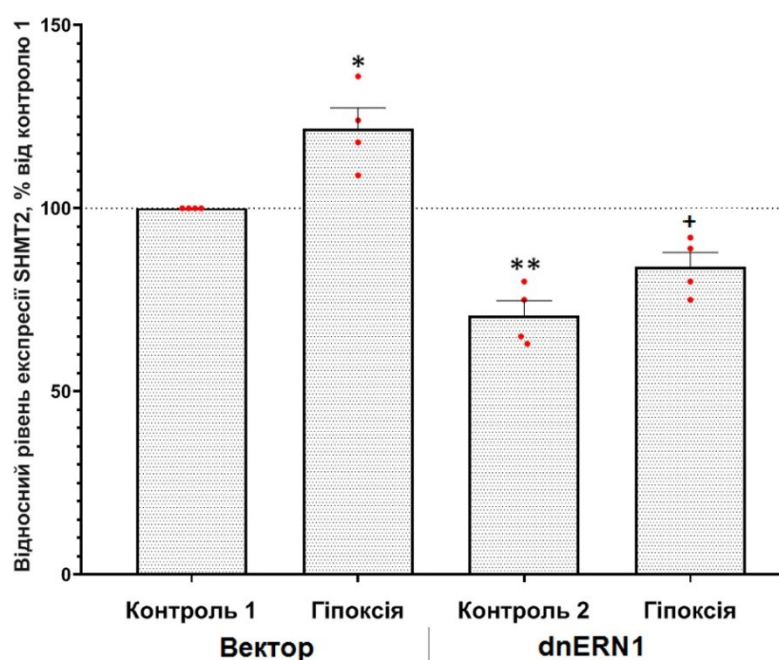


Рис. 3.3.6. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК *SHMT2* у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ порівняно з контролем 1, + - $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Але при дослідженні гіпоксичної регуляції експресії гена серингідроксиметилтрансферази мітохондрій (*SHMT2*) виявлені менш виражені і протилежні за напрямком зміни порівняно з *SHMT1* (Рис. 3.29). Так, було показано, що рівень експресії цього гена знижується за умов гіпоксії на 22 % у контрольних клітинах гліобластоми, але й у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена *SHMT2* був близьким за величиною (-18 %; Рис. 3.29).

Отримані результати показали, що експресія генів як серингідроксиметилтрансферази 1, так і *SHMT2* чутлива до впливу гіпоксії, але реакція на гіпоксію є різною як за величиною змін, так і за їх напрямком, причому гіпоксична регуляція обох ензимів істотно не залежить від пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1.

3.4. Рівень експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну

Важливим для росту злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, є забезпечення їх глутаміном та глюкозою, причому дефіцит цих речовин має анти-пухлинний ефект. У зв'язку з цим, були проведені дослідження залежності експресії генів синтезу серину від дефіциту глутаміну у середовищі у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 для виявлення ролі стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції цих генів за умов дефіциту глутаміну. Результати проведених досліджень представлені на Рис. 3.30 – 3.36.

Встановлено, що рівень експресії гена фосфогліцератдегідрогенази різко підвищується у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну у середовищі (+145 %), але пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 сильно підвищує чутливість експресії цього гена до дефіциту глутаміну і рівень експресії PHGDH збільшується аж на 264 % (Рис. 3.30). Ці дані вказують не лише на високу чутливість фосфогліцератдегідрогенази до дефіциту глутаміну, а і на залежність цих змін від активності сигнального протеїну ERN1.

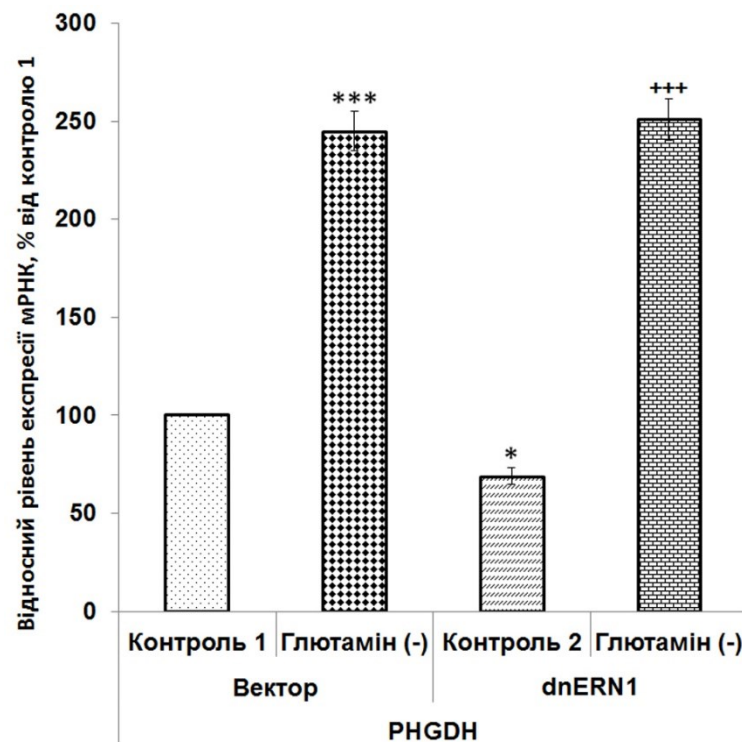


Рис. 3.30. Вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК PHGDH у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERF1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERF1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Як видно із даних, представлених на Рис. 3.31, рівень експресії гена фосфосеринамінотрансферази 1 є ще більш чутливим до дефіциту глутаміну порівняно з PHGDH. Так, рівень експресії мРНК PSAT1 збільшується у контрольних клітинах гліобластоми на 170 %, а у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 – аж на 477 % (Рис. 3.31).

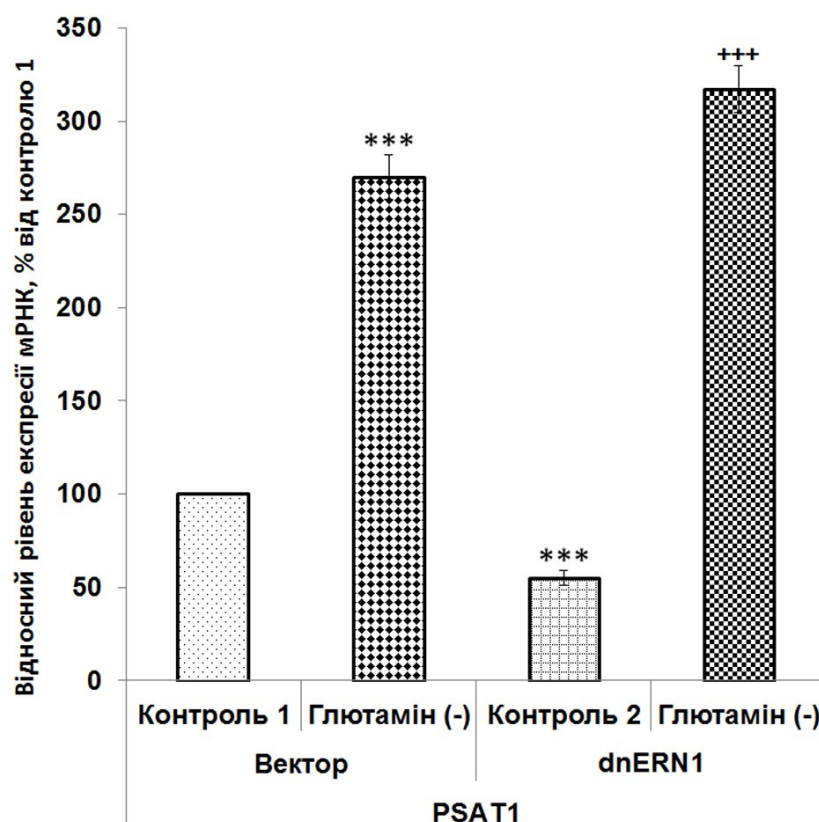


Рис. 3.31. Вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК PSAT1 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК PSAT1 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

При дослідженні рівня експресії гена іншого ензиму синтезу серину, а саме фосфосеринфосфатази, були виявлені дещо менші зміни під впливом дефіциту глутаміну порівняно з генами *PHGDH* та *PSAT1*, хоча напрям змін залишився таким же. Так, було показано збільшення рівня експресії гена *PSPH* на 96 % у контрольних клітинах гліобластоми і значно більше підвищення (+183 %) у клітинах з пригніченим ERN1 (Рис. 3.32).

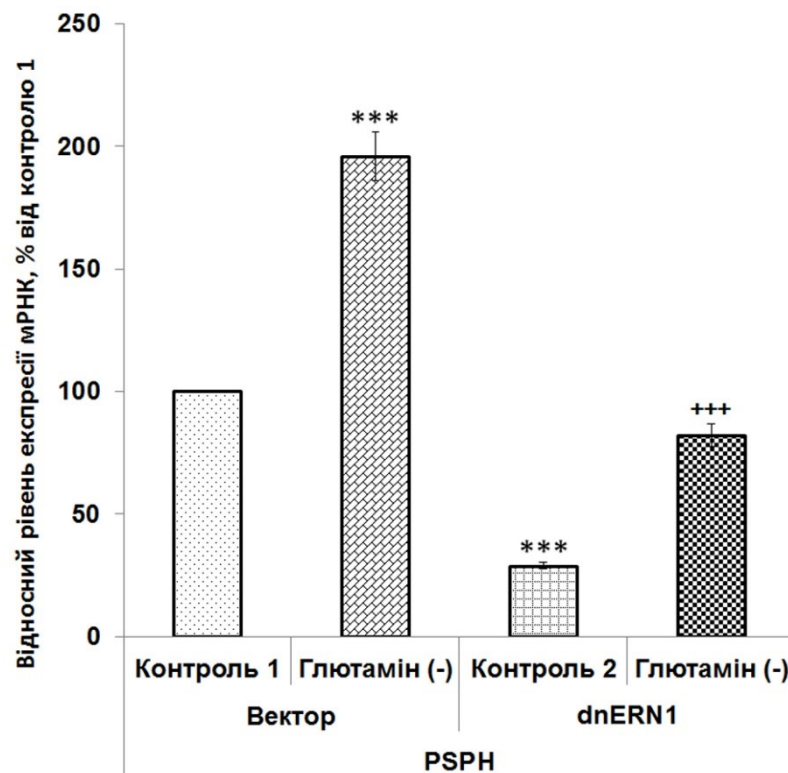


Рис. 3.32. Вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК PSPH у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК фосфосеринфосфатази були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Подібні зміни в експресії були показані і для гена транскрипційного фактора ATF4: збільшення рівня експресії на 99 % у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну та більш виражене (+165 %) – у клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (Рис. 3.33). Ці результати переконливо свідчать про ERN1-залежний характер контролю експресії ATF4 за дефіциту глутаміну.

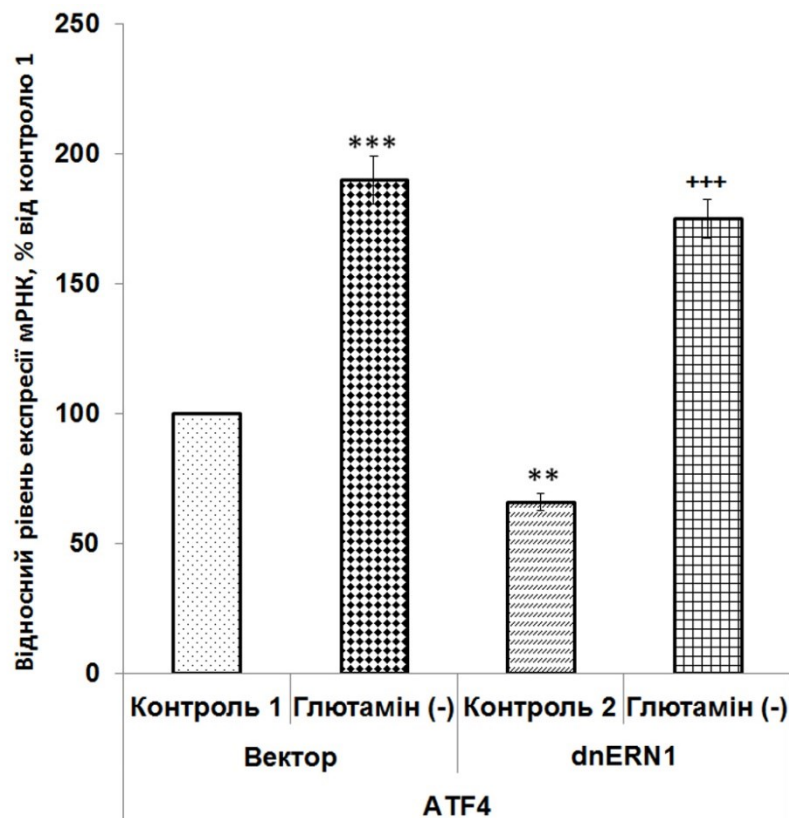


Рис. 3.33. Вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК ATF4 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnER1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnER1). Отримані значення рівня експресії мРНК ATF4 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ та *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Разом з тим, для гена *SHMT1* було виявлено протилежно направлені зміни в експресії за умов дефіциту глутаміну як у контрольних клітинах гліобластоми (-88 %), так і у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 (-70 %; Рис. 3.34). Таким чином, експресія гена серингідроксиметилтрансферази 1 є залежною від глутаміну і в деякій мірі це контролюється стресом ЕР, а саме протеїном ERN1.

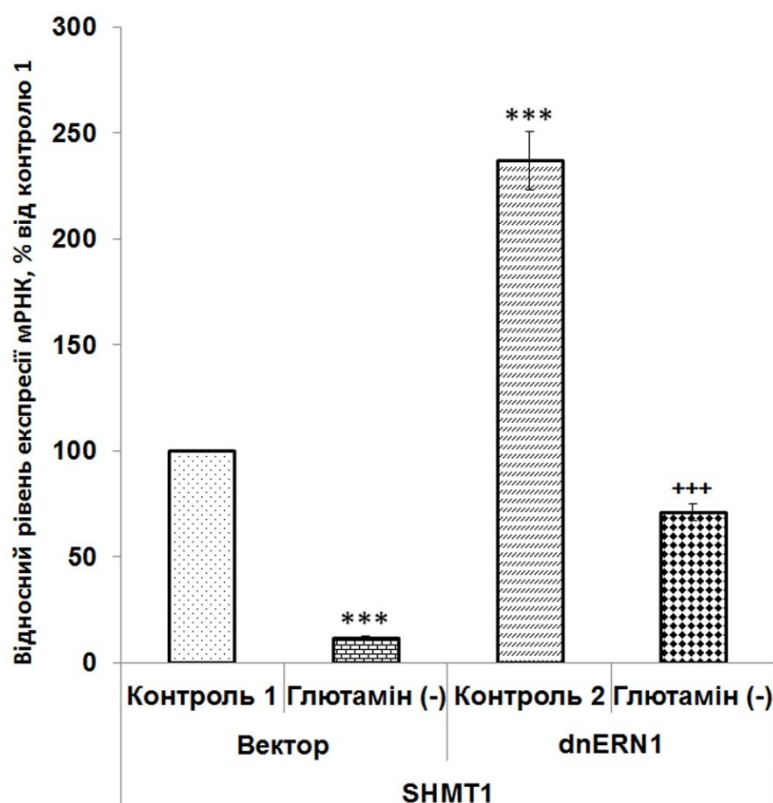


Рис. 3.34. Вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *SHMT1* у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК *SHMT1* були нормалізовані по рівню експресії *ACTB* і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Зовсім іншого плану була реакція гена серингідроксиметилтрансферази 2 на дефіцит глютаміну порівняно з геном *SHMT1*, причому не лише у контрольних клітинах гліобластоми (+95 %), а й у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 (+204 %; Рис. 3.35).

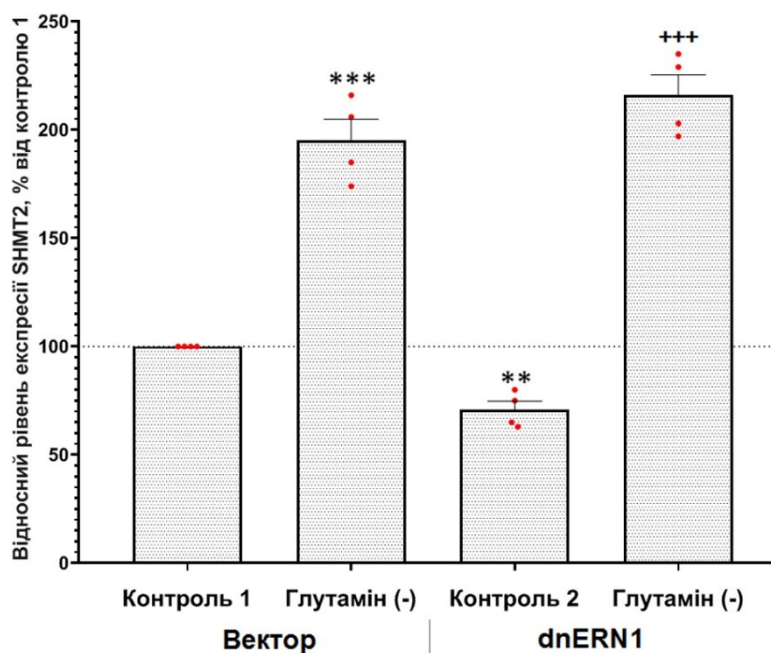


Рис. 3.35. Вплив дефіциту глютаміну на рівень експресії мРНК *SHMT2* у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Таким чином, експресія гена серингідроксиметилтрансферази 2 є також залежною від глютаміну і в значній мірі ця залежність контролюється ERN1, основним сигнальним протеїном стресу ЕР, але реакція генів *SHMT1* та *SHMT2* на дефіцит глютаміну є принципово різною.

3.5. Особливості експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози

Важливими для росту всіх злоякісних пухлин, а також і гліобластом, є забезпечення їх глюкозою, причому дефіцит глюкози пригнічує прогресію пухлин та їх резистентність до терапії. Нами проведені дослідження залежності експресії генів, відповідальних за синтезу серину, від дефіциту глюкози у середовищі на контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями протеїну ERN1. Отримані результати представлені на Рис. 3.36 – 3.41.

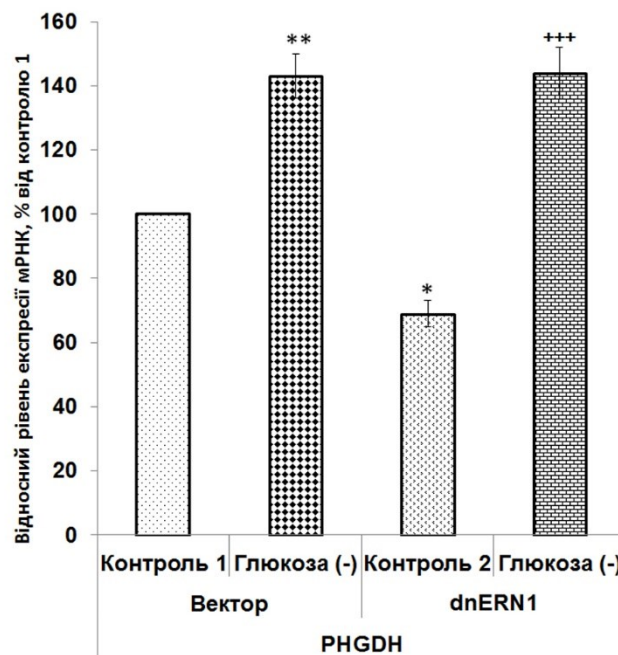


Рис. 3.36. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК PHGDH у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Рівень експресії цієї мРНК нормалізували по рівню експресії АСТВ і представляли як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і ** - $p < 0,01$ порівняно з контролем 1, *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Встановлено, що рівень експресії гена фосфогліцератдегідрогенази у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози у середовищі підвищується на 43 % і що пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 виражено підвищує чутливість експресії гена *PHGDH* до дефіциту глюкози: рівень експресії цього гена збільшується на 109 % (Рис. 3.36).

Із даних, представлених на Рис. 3.37, видно рівень експресії гена фосфосеринамінотрансферази 1 є також чутливим до дефіциту глюкози в обох типах клітин гліобластоми.

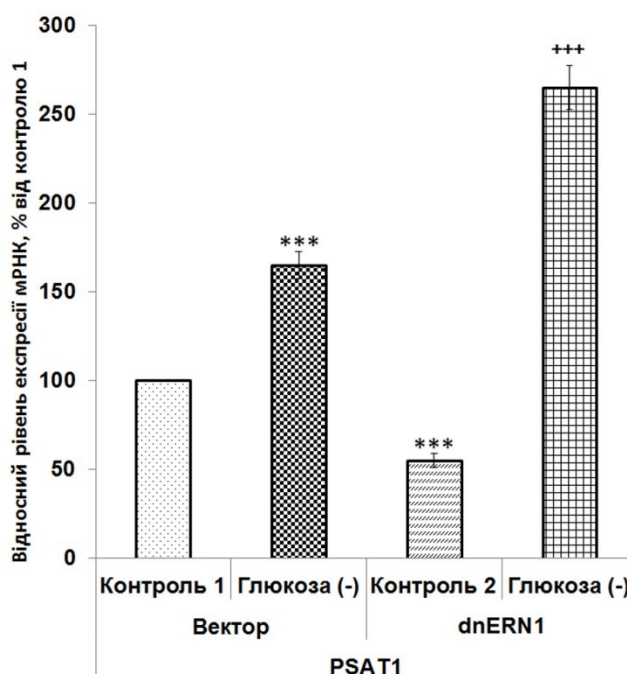


Рис. 3.37. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК PSAT1 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Значення рівня експресії мРНК PSAT1 нормалізували по експресії АСТВ і представляли як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Так, рівень експресії мРНК PSAT1 збільшується у контрольних клітинах гліобластоми на 65 %, а у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 – аж на 385 % (Рис. 3.37).

При дослідженні рівня експресії гена *PSPH* не виявлено змін в його експресії у контрольних клітинах гліобластоми, але значне підвищення рівня експресії цього гена (+100 %) спостерігалось у клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (Рис. 3.38).

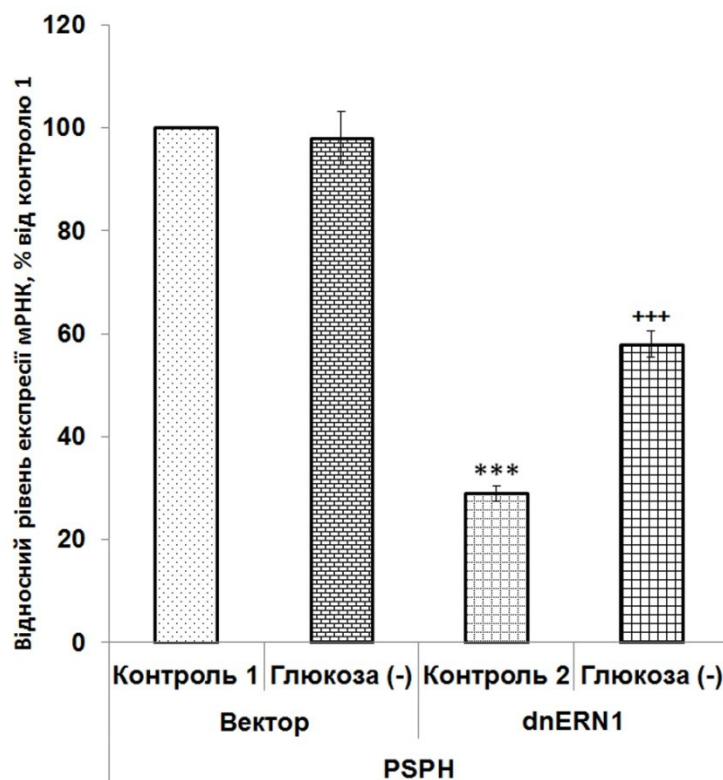


Рис. 3.38. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК *PSPH* у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії мРНК фосфосеринфосфатази були нормалізовані по експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, ⁺⁺⁺ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

За умов дефіциту глюкози було також виявлено збільшення рівня експресії і гена транскрипційного фактора ATF4 у контрольних клітинах гліобластоми (+57 %), а у клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 ефект був значно більшим (+188 %) – (Рис. 3.39).

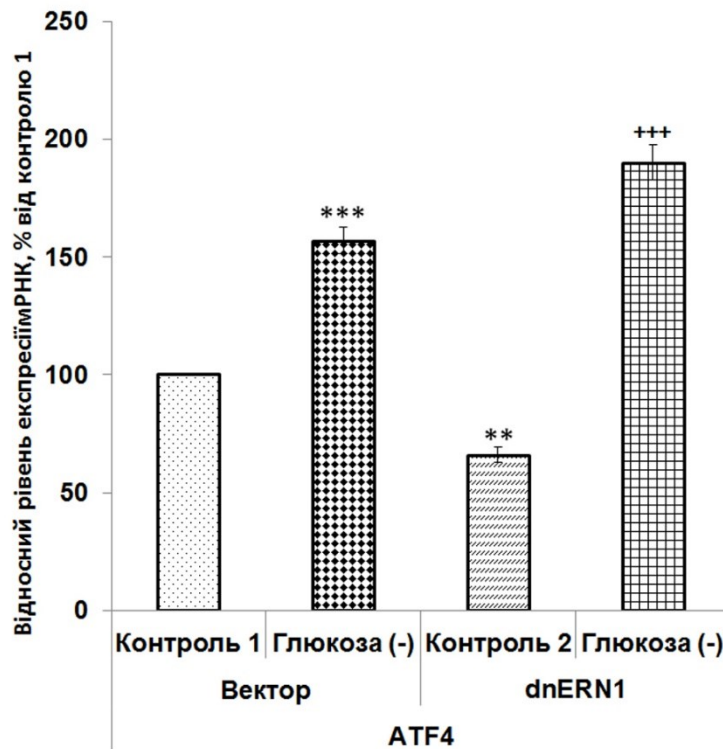


Рис. 3.39. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК ATF4 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Значення рівня експресії мРНК ATF4 нормалізували по АСТВ і представляли як відсоток від контролю 1; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ та *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Таким чином, експресія генів *PHGDH*, *PSAT1* та *ATF4* активується у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози і цей ефект значно посилюється за умов пригнічення ензиматичних активностей

сигнального протеїну ERN1. У той же час, експресія гена *PSPH* посилюється лише у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1.

Вивчення експресії генів серингідроксиметилтрансфераз 1 і 2 показало, що вони по-різному реагують на дефіцит глюкози: рівень експресії SHMT1 знижувався, а SHMT2 збільшувався як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1, але у клітинах з пригніченим ERN1 ці ефекти були більш вираженими (Рис. 3.40 та 3.41).

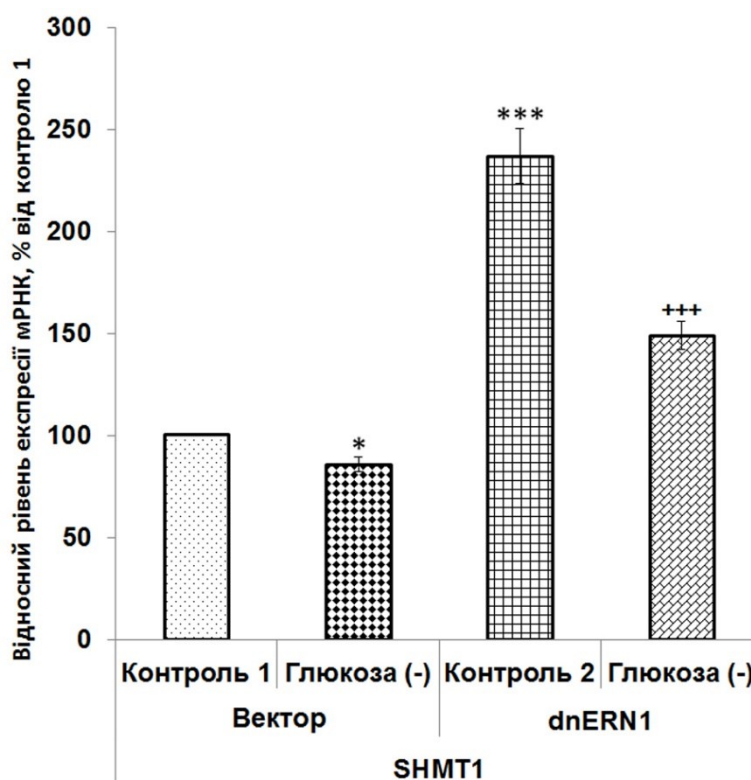


Рис. 3.40. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК SHMT1 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

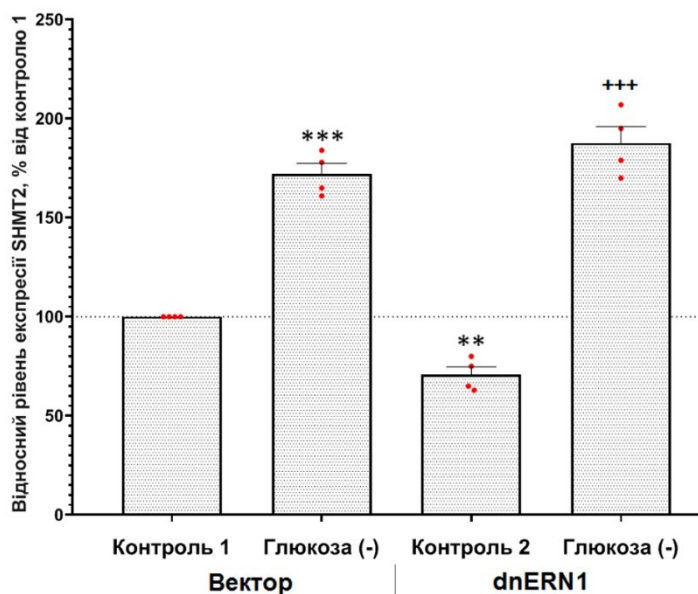


Рис. 3.41. Вплив дефіциту глюкози на рівень експресії мРНК SHMT2 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами без гіпоксії: контроль 1 (клітини, трансфіковані вектором) та контроль 2 (клітини трансфіковані dnERN1). Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, +++ - $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Так, рівень експресії мРНК SHMT1 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ензиматичними активностями ERN1 знижувався за умов дефіциту глюкози на 14 і 37 %, відповідно, а SHMT2 збільшувався за цих умов на 71 та 165 %, відповідно (Рис. 3.40 та 3.41).

Таким чином, експресія більшості досліджених генів синтезу серину є чутливими до дефіциту глюкози у середовищі, але ця чутливість до дефіциту глюкози залежить від стресу ЕР і посилюється за умов пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1. Результати цього розділу опубліковані у журналі [203].

3.6. Біоінформаційний аналіз молекулярних механізмів регуляції експресії генів біосинтезу серину у клітинах гліобластоми

Численними дослідженнями встановлено, що ефекти гіпоксії у клітинах реалізуються через HIF, транскрипційний фактор, який індукується за гіпоксичних станів [122, 130, 133-135, 142, 143, 150, 199]. Разом з тим, появилися роботи, в яких чітко показано, що гіпоксія проявляє різнонаправлену дію на експресію різних генів і що є незалежні від HIF ефекти гіпоксії [128, 143, 146]. Більше того, пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ЕР змінює гіпоксичну регуляцію досить значної кількості генів, причому може не лише знижувати, а і посилювати ефект гіпоксії, специфічно для кожного гена, а також знімати чи ініціювати гіпоксичну регуляцію експресії генів [152-156, 163, 165]. Опосередкована сигнальним шляхом ERN1 регуляція експресії генів за умов стресу ЕР може реалізовуватися через транскрипційний фактор ХВР1s, синтез якого відбувається за участі ендорибонуклеази ERN1, оскільки сайти зв'язування ХВР1s та HIF перекриваються.

Саме для виявлення молекулярних механізмів залежності гіпоксичної регуляції експресії генів від стресу ЕР нами проведені біоінформаційні дослідження по ідентифікації у промоторних ділянках генів синтезу серину сайтів зв'язування транскрипційних факторів HIF та ХВР1s. Виявлені нами сайти зв'язування транскрипційного фактора HIF із промоторними ділянками генів наведені у Табл. 3.1.

Як видно із даних біоінформаційного аналізу, промоторні ділянки генів *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* та *SHMT1* містять по одному “прямому” варіанту послідовностей A/GCGTGG/C, а промоторна ділянка гена *PSPH* містять аж дві такі послідовності (Табл. 3.1). У промоторних ділянках генів *PSPH* і *ATF4* є ще і “зворотні” послідовності (C/GCACGCC/T), корова частина якої є дзеркальним відображенням наведеної вище послідовності.

Таблиця 3.1

Послідовності A/GCGTGG/C (C/GCACGC/T), що зв'язують фактор HIF, у промоторних ділянках генів синтезу серину

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промоторної ділянки та GenBank номер
<i>PHGDH</i>		Не виявлено	1, NM_006623.4
<i>PSPH</i>	-504 до -498 -352 до -346 -291 до -285	GCACGTC <u>GGCGTGG</u> AGCGTGC	2, NM_004577.4
<i>PSAT1</i>	-604 до -598	<u>cCACGTGC</u>	3, NM_021154.5
<i>ATF4</i>	-505 до -499 -82 до -76	<u>CCACGCG</u> <u>CACGTGG</u>	4, NM_001675.4
<i>SHMT1</i>	181 до 187	<u>TACGTGC</u>	5, NM_004169.5
<i>SHMT2</i>		Не виявлено	6, NM_005412.6

1 - [http:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_701339/](http://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_701339/)

2 - [http:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_717624/](http://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_717624/)

3 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709221/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709221/)

4 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_707922/

5 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_705410/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_705410/)

6 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_714033/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_714033/)

Всі ці ділянки мають можливість зв'язувати транскрипційний фактор HIF і контролювати транскрипцію генів *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* та *SHMT1*. Надзвичайно важливим моментом цього аналізу є виявлення в послідовностях, що зв'язують транскрипційний фактор HIF коротших послідовностей (підкреслені), які можуть зв'язувати транскрипційний фактор HBP1s – CGTGG/CCACG (Табл. 3.1). Саме така послідовність (CGTGG/CCACG) була виявлена у промоторних ділянках більшості досліджених генів, а саме *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4*, *SHMT1* та *SHMT2*, і тому

залежність гіпоксичної регуляції від стресу ЕР може бути обумовлена також і взаємодією транскрипційних факторів HIF та XBP1 (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Послідовності CCACG/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор XBP1s, у промоторних ділянках генів синтезу серину

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>PHGDH</i>		Не виявлено	1, NM_006623.4
<i>PSPH</i>	-350 до -346	CGTGG	2, NM_004577.4
<i>PSAT1</i>	-605 до -601 -500 до -496	CCACG CGTGG	3, NM_021154.5
<i>ATF4</i>	-505 до -501 -547 до -543 -7 до -3	CCACG CGTGG CCACG	4, NM_001675.4
<i>SHMT1</i>	-263 до -259	CCACG	5, NM_004169.5
<i>SHMT2</i>	-386 до -382	CCACG	6, NM_005412.6

1 - [http:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_701339/](http://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_701339/)

2 - [http:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_717624/](http://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_717624/)

3 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709221/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709221/)

4 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_707922/

5 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_705410/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_705410/)

6 - [https:// www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_714033/](https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_714033/)

Варто відмітити, що взаємодія транскрипційних факторів HIF та XBP1s у промоторних ділянках генів може відбуватися також і в тому випадку, коли сайти зв'язування цих транскрипційних факторів розташовані у різних ділянках промоторної зони і не перекривається між собою, але все буде визначатися кількістю регуляторних факторів і конформацією промоторної ділянки.

Разом з тим, вияснення молекулярних механізмів залежності гіпоксичної регуляції експресії кожного із досліджених генів від стресу

ендоплазматичного ретикулума вимагає подальших більш ґрунтовних досліджень.

Для виявлення ролі пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії генів синтезу серину були проведені також біоінформаційні дослідження 3'-нетранслюємих ділянок таких мРНК як PSAT1, PSPH та SHMT1 на наявність у них сайтів зв'язування мікроРНК. Результати представлені на Рис. 3.42.

Position 203-210 of PSAT1 3' UTR	5' ...CUUAAUUCUGACUUGAACUGGAA...
hsa-miR-145-5p	3' UCCCUAAGGACCCUU-UUGACCUG
Position 184-191 of PSPH 3' UTR	5' ...UUUUAACUGUAGUCCAGUAUUA...
hsa-miR-429	3' UGCCAAAUGGUCUGUCAUAAU
Position 760-767 of SHMT1 3' UTR	5' ...AUGACCAUUUUUAAU--AAGCACAA...
hsa-miR-218-5p	3' UGUACCAAUCUAGUUCGUGUU

Рис. 3.42. Сайти зв'язування мікроРНК на 3' нетранслюємій ділянці мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1.

Із представлених на Рис. 3.42 даних видно, що 3'-нетранслюєма ділянка мРНК PSAT1 має сайт зв'язування мікроРНК miR-145-5p, мРНК PSPH має здатність зв'язувати мікроРНК miR-429-3p, а мРНК SHMT1 – miR-128-5p. Отримані результати вказують на можливу участь цих мікроРНК у регуляції експресії генів *PSAT1*, *PSPH* і *SHMT1* на пост-транскрипційному рівні.

У зв'язку з цим, були проведені дослідження по визначенню рівня експресії мікроРНК miR-145-5p, miR-218-5p і miR-429-3p у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей протеїну ERN1.

3.7. Рівень експресії мікроРНК у клітинах гліобластоми за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1

Останнім часом, велика увага приділяється ролі мікроРНК у рості злоякісних пухлин, зокрема гліобластом, а також їх ролі у регуляції експресії різних генів у пухлинах. Результати дослідження рівня експресії мікроРНК miR-145-5p, miR-218-5p та miR-429-3p, які можуть бути причетні до пост-транскрипційної регуляції експресії мРНК, продукти трансляції яких задіяні у синтезі та метаболізмі серину, представлені на Рис. 3.43.

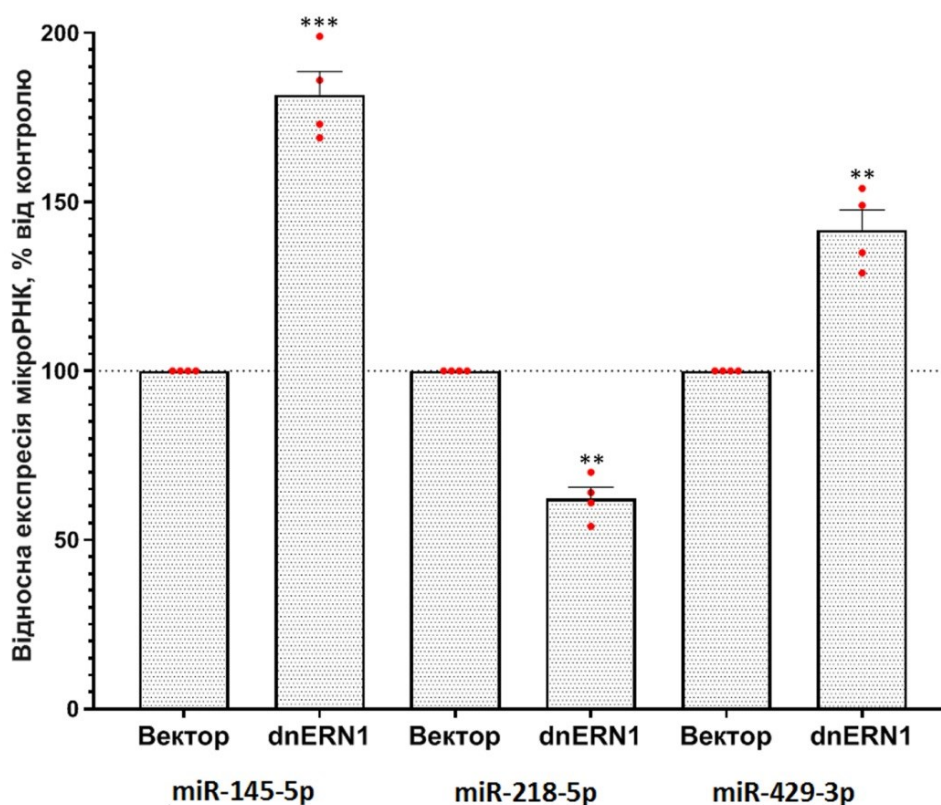


Рис. 3.43. Відносний рівень експресії мікроРНК miR-145-5p, miR-218-5p та miR-429-3p у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1 (dnERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими вектором без вставки. Отримані значення рівня експресії цих мікроРНК були нормалізовані по рівню експресії РНК U6 і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Встановлено, що рівень експресії мікроРНК miR-145-5p та miR-429-3p підвищується у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 на 84 і 42 %, відповідно, а мікроРНК miR-218-5p, навпаки, знижується на 39 % (Рис. 3.43). Виявлені зміни в рівні експресії цих мікроРНК повністю узгоджуються зі змінами в експресії мРНК PSAT1, PSPH і SHMT1. І оскільки, рівень експресії мікроРНК miR-145-5p та miR-429-3p підвищується у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими ензиматичними активностями ERN1, а рівень експресії мРНК PSAT1 і PSPH, які мають сайти зв'язування з цими мікроРНК, знижується, то це вказує на можливу участь цих мікроРНК у пост-транскрипційній регуляції експресії мРНК PSAT1 та PSPH. Все це відноситься і до miR-218-5p та SHMT1, оскільки збільшення експресії цієї мРНК асоціюється зі зниженням мікроРНК miR-218-5p.

Таким чином, принципово новим результатом цієї роботи є виявлення ролі синтезу серину у контролі проліферації клітин гліобластоми, а також механізмів контролю експресії генів, відповідальних за синтез серину, ERN1 сигнальним шляхом стресу ER, розкриття ролі ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей ERN1 у реалізації впливу ERN1 на експресію генів. Оскільки посилення синтезу серину є важливою умовою посиленого росту злоякісних пухлин, то виявлене нами зниження експресії генів, що контролюють цей процес, за умов пригнічення ERN1 добре узгоджується зі зниженим їх проліферативним потенціалом. Вперше показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є важливим регулятором експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2*. Встановлено, що гіпоксія та дефіцит глутаміну і глюкози змінюють рівень експресії генів ензимів синтезу серину у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення ERN1, яке призводить до зниження проліферації пухлинних клітин і має виражений анти-пухлинний ефект. Результати цього розділу опубліковані у журналі [200].

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У результаті виконання цієї роботи отримані принципово нові і вагомі наукові результати стосовно молекулярних механізмів анти-проліферативної дії пригнічення одного із сенсорно-сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума, а саме ERN1, ролі його протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей у передачі сигналів від ЕР до ядра і контролі експресії генів синтезу серину, а також мікроРНК. Виявлене нами зниження рівня експресії генів, які відповідають за синтез серину та його регуляцію, зокрема таких як *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4*, у клітинах гліобластоми з пригніченими протеїнкіназною та ендорибонуклеазною активностями ERN1 і зниженою їх проліферацією добре узгоджуються з численними даними літератури і нашими результатами про посилення синтезу серину у різних злоякісних пухлинах і клітинах гліобластоми [27, 29, 30, 33, 34, 200]. Більше того, недавно було показано, що фармакологічне пригнічення синтезу серину також підвищує чутливість клітин гліобластоми до темозоломід, зменшуючи рівень експресії MGMT (O(6)-methylguanine DNA methyltransferase) [32].

Оскільки ERN1, основний сенсорно-сигнальний протеїн стресу ЕР, має дві ензиматичні активності (протеїнкіназну та ендорибонуклеазну), то ми проаналізували роль кожної із них у молекулярних механізмах ERN1-залежної регуляції експресії генів синтезу серину у клітинах гліобластоми шляхом різних підходів до пригнічення ензиматичних активностей ERN1. Як видно із узагальнених на Рис. 4.1 даних, пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 призводило до зниження рівня експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* і *ATF4* та різкого посилення експресії гена *SHMT1*. У той же час, за пригнічення лише ендорибонуклеазної активності протеїну ERN1 у клітинах гліобластоми спостерігалися дещо інші

за величиною зміни рівня експресії лише для генів *PSAT* і *PSPH*, тоді як рівень експресії генів *PHGDH* і *SHMT1* істотно не змінювався за цих експериментальних умов. І лише експресія гена транскрипційного фактора *ATF4* за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності протеїну ERN1 у клітинах гліобластоми знижувалася подібним чином як і за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 (Рис. 4.1).

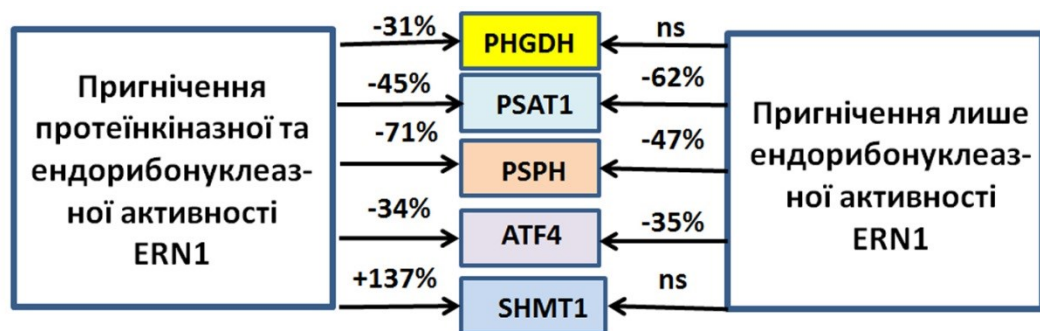


Рис. 4.1. Порівняння пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 і лише його ендорибонуклеазної активності у клітинах гліобластоми на рівень експресії основних генів, які контролюють синтез серину: *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* і *SHMT1*.

Отримані результати продемонстрували, що рівень експресії гена транскрипційного фактора *ATF4* у клітинах гліобластоми контролюється лише ендорибонуклеазною активністю протеїну ERN1, оскільки зміни в його експресії були практично ідентичними як за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1, так і лише його ендорибонуклеазної активності. Подібний механізм регуляції експресії генів за різних умов пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 був також показаний і для інших транскрипційних факторів, зокрема таких як ZEB2 та TGIF1 [92]. Хоча цей механізм ERN1-опосередкованої регуляції експресії генів був показаний також для багатьох інших генів [18, 88, 89, 91].

У той же час, нами були виявлені три гени, рівень експресії яких істотно не змінювався за пригнічення однієї ензиматичної активності сигнального протеїну ERN1, а саме ендорибонуклеазної. Це гени *PHGDH*, *SHMT1* і *SHMT2*. Рівень їх експресії змінювався лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1, що вказує на опосередкованість цих змін в експресії саме протеїнкіназною активністю цього сигнального протеїну. Подібні результати були отримані нами і при використанні іншого способу пригнічення ERN1 та його таргетної мРНК ХВР1, а саме сайленсінгу цих мРНК, що свідчить на незалежність виявлених змін в експресії генів синтезу серину від способу пригнічення ERN1, що узгоджується з даними, отриманими для інших генів [92]. Причетність протеїнкіназної активності ERN1 до регуляції експресії генів вперше була продемонстрована більше 10 років тому, а потім ще для декількох генів [16, 89-92]. Було також показано, що пригнічення протеїнкіназної активності ERN1 також причетно і до пригнічення росту пухлин, а також до посилення їх інвазивності, причому це узгоджується з наявними у літературі даними [19, 92, 199].

Варто відмітити, що всі метаболічні процеси у клітинах злоякісних пухлин дуже тісно пов'язані між собою, як і у відносно нормальних клітинах усього організму, а тому зміни у синтезі і метаболізмі серину асоціюються з численними змінами в експресії генів і відбиваються у різних метаболічних та деяких інших процесах [34, 36, 38, 43, 50]. Більше того, для частини ензимів синтезу серину характерні також неканонічні, серин-незалежні шляхи впливу на метаболізм, зокрема через дефосфорилювання IRS1 [45].

У дослідженнях з індукцією стресу ЕР тунікаміцином було показано, що у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 рівень експресії усіх досліджених генів, причетних до синтезу серину посилюється за дії тунікаміцину, за винятком гена *SHMT1*, рівень експресії якого знижувався. Ці результати вказують на взаємодію різних сигнальних систем у регуляції експресії генів синтезу серину, що добре узгоджується з результатами численних досліджень [152, 156, 158, 163-165].

Важливе значення мають результати біоінформаційних досліджень по виявленню сайтів зв'язування мікроРНК з мРНК, продукти трансляції яких відповідають за синтезу серину. Окрім цього були проведені дослідження по вивченню рівня експресії тих мікроРНК, сайти зв'язування яких були виявлені на мРНК PSAT1, PSPH та SHMT1, і показано, що за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 рівень експресії цих мікроРНК змінювався у протилежному напрямку до змін відповідної для кожної із них мРНК, що наглядно видно на Рис. 4.2.

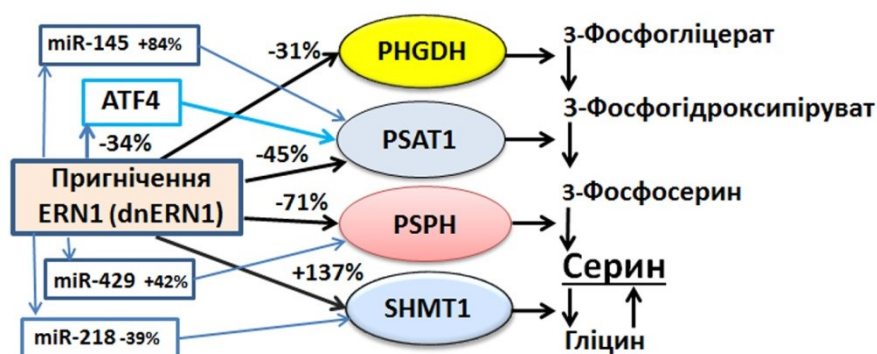


Рис. 4.2. Схематичне зображення змін рівня експресії основних генів, які контролюють синтез серину, а також рівня експресії мікроРНК, причетних до пост-транскрипційної регуляції експресії відповідних генів, за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 у клітинах гліобластоми.

Важливі результати отримані також при дослідженні ролі стресу ЕР у гіпоксичній регуляції експресії генів, відповідальних за синтез серину. Гіпоксію моделювали за допомогою диметилноксалілгліцину, який імітує ефекти гіпоксії шляхом пригнічення активності пролілгідроксилази альфа-субодиниці HIF [142, 199]. Було показано, що у контрольних клітинах гліобластоми гіпоксія збільшує рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *ATF4* і *SHMT2*, але знижує *PSPH* та *SHMT1*. Разом з тим, пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 змінює ефект гіпоксії лише на експресію генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* і *ATF4*: значно посилює гіпоксичну

регуляцію експресії генів *PHGDH*, *PSAT1* та *ATF4*, і блокує регуляцію гіпоксією гена *PSPH*, що вказує на залежність гіпоксичної регуляції генів синтезу серину від активності сигнального протеїну ERN1. Гени метаболізму серину (*SHMT1* і *SHMT2*) також є чутливими до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми, але пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 істотно не впливає на їх гіпоксичну регуляцію (Рис. 4.3).

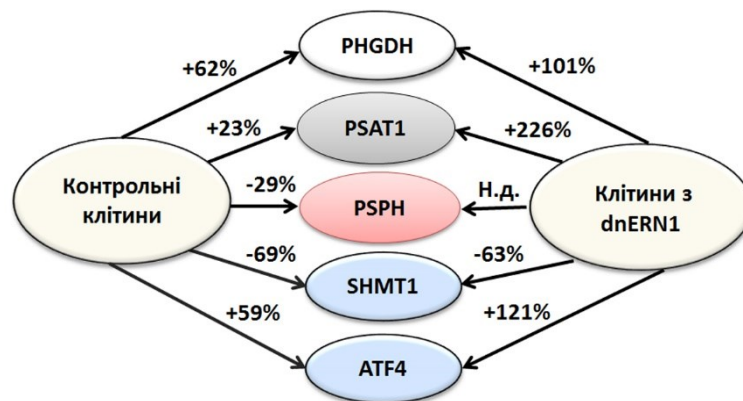


Рис. 4.3. Схематичне зображення особливостей впливу гіпоксії на рівень експресії генів, які контролюють синтез серину, у контрольних клітинах гліобластоми і клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 (dnERN1).

Ці результати добре узгоджуються з численними даними літератури про те, що гіпоксія, яка є важливим фактором розвитку і росту злоякісних пухлин, контролює рівень експресії генів залежно від стресу ЕР та багатьох інших факторів [22, 72, 75, 89, 142, 146, 152, 163, 199]. Більше того, було показано, що ХВР1s посилює ріст аденокарциноми грудної залози шляхом контролю HIF1A шляху [167]. Варто відзначити, що виявлення залежності гіпоксичної регуляції експресії генів у клітинах злоякісних пухлин від стресу ендоплазматичного ретикулума є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі і клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії, а також резистентності до терапії. Відомо, що гіпоксія, стрес ЕР і хеморезистентність дуже тісно взаємопов'язані [166]. А

тому, дослідження молекулярних механізмів перепрограмуючої дії стресу ER на гіпоксичну регуляцію експресії онкогенів і генів пухлинних супресорів, а також ключових транскрипційних факторів та інших регуляторних протеїнів є надзвичайно важливим напрямком досліджень для пошуку нових шляхів боротьби з онкологічними захворюваннями і створення анти-пухлинних препаратів.

Принципово нові результати були отримані нами також при вивченні ERN1-залежної чутливості експресії генів синтезу серину, до дефіциту глюкози і глутаміну. Так, було показано, що за умов дефіциту глюкози збільшується рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *ATF4* та *SHMT2* і зменшується – гена *SHMT1*, але експресія гена *PSPH* залишається резистентною до цих експериментальних умов (Рис. 4.4).

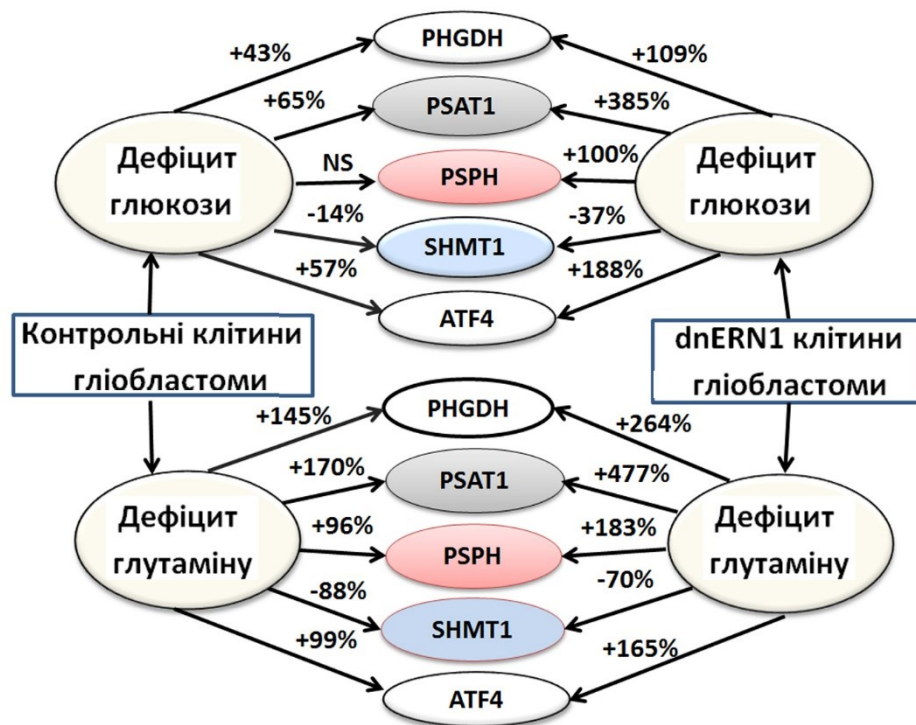


Рис. 4.4. Схематичне зображення особливостей експресії генів, які контролюють синтез серину, за умов дефіциту глюкози і глутаміну у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною та протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1 (dnER1).

Разом з тим, пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 посилює чутливість усіх досліджених генів до дефіциту глюкози за винятком *SHMT1*.

Ці результати вказують на залежність змін в експресії генів синтезу серину, що індукуються дефіцитом глюкози, від активності ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, причому ця залежність від стресу ЕР є генно-специфічною, вона контролює також резистентність злоякісних пухлин до хемотерапії, що повністю узгоджується з численними даними інших дослідників [168, 170-173, 175, 176, 204].

При дослідженні рівня експресії генів, задіяних у синтезі та метаболізмі серину, за умов дефіциту глутаміну було показано, що усі ці гени є більш чутливими до дефіциту глутаміну порівняно з дефіцитом глюкози (Рис. 4.4). Так, рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* та *SHMT2* – збільшується, а експресія гена *SHMT1* різко зменшується за цих експериментальних умов. Але пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, виражено посилює чутливість усіх генів, задіяних у синтезі та метаболізмі серину, до цих експериментальних умов за винятком гена *SHMT1*, реакція якого на дефіцит глутаміну зменшується за пригнічення сигнального протеїну ERN1. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном. Але варто відмітити, що експресія всіх досліджених у цій роботі генів, включно з геном транскрипційного фактора *ATF4*, контролюються не лише сигнальним шляхом ERN1, а й іншими сигнальними шляхами стресу ЕР. А тому підвищена чутливість експресії більшості досліджених генів може бути також результатом посилення цих інших сигнальних систем внаслідок пригнічення ензиматичних активностей ERN1.

Гени синтезу серину є про-онкогенними, оскільки вони відіграють важливу роль у рості злоякісних пухлин, виживанні клітин та їх

метастазуванні, а також у резистентності до терапії [26-30, 33, 41, 42, 68]. Чутливість цих генів до дефіциту глюкози і глутаміну обумовлена тим, що ці сполуки є субстратами для гліколізу і тому відіграють важливу роль, разом зі стресом ендоплазматичного ретикулума, у рості гліобластом та їх агресивній поведінці [10, 23-26, 92]. Можна припустити, що зміни в експресії генів, причетних до синтезу серину, за умов дефіциту глюкози і глутаміну віддзеркалюють метаболічне перепрограмування клітин гліобластоми в результаті нестачі цих поживних речовин, які є дуже важливими для росту і виживання пухлинних клітин [23, 24, 26, 34]. Hennequart та співавт. [28], продемонстрували, що зниження синтезу серину пригнічує ріст злоякісних пухлин і це повністю узгоджується з отриманими нами результатами.

Залежність пухлинного росту від синтезу серину обумовлена тим, що серин підтримує численні метаболічні процеси, які є важливими для проліферації та виживання клітин, включаючи синтез нуклеотидів і глутатіону, участь у реакціях метилювання та утворенні NADPH [29, 30, 34, 57, 58].

Особливий інтерес представляє серингідроксиметилтрансфераза 2, яка відіграє полі-функціональну роль у мітохондріях, оскільки є важливим ензимом, асоційованим із метаболізмом серину та фолату, що є важливим для синтезу пуринів, тимідину і метіоніну [60]. Як SHMT2, так і ензими синтезу фолату посилено експресуються у більшості злоякісних пухлин, а пригнічення серингідроксиметилтрансферази 2, як і анти-фолати проявляють анти-пухлинні ефекти [51, 55, 56, 58, 60, 63]. Ці дані добре узгоджуються з отриманими нами результатами про зниження рівня експресії *SHMT2* за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 і опосередкованість цих змін саме протеїнкіназною активністю цього сигнального протеїну (Рис. 4.5).

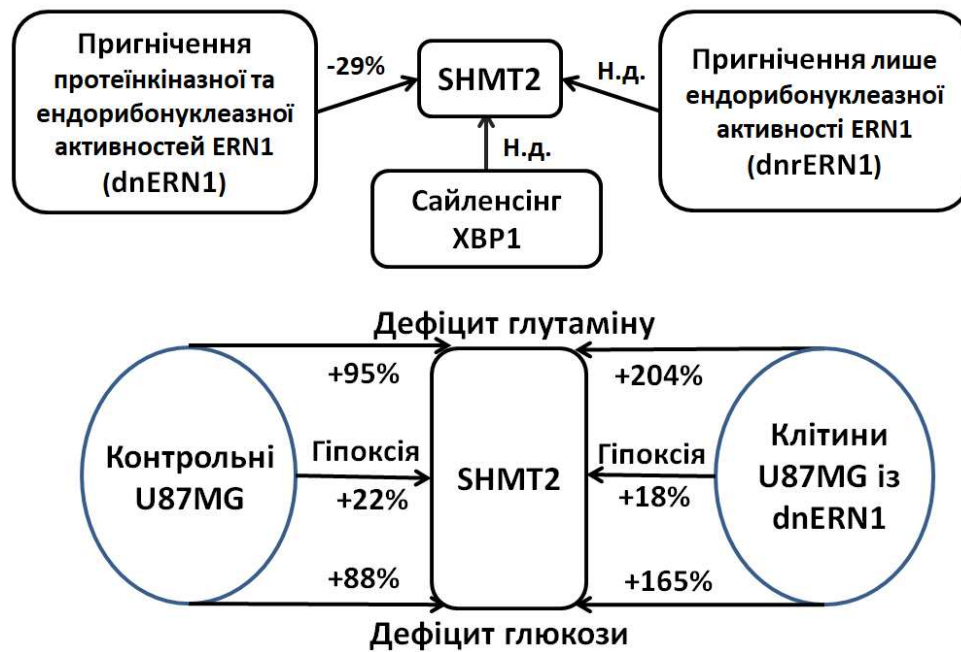


Рис. 4.5. Схематичне зображення особливостей змін рівня експресії гена серингідроксиметилтрансферази 2 за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 (dnERN1) або лише його ендорибонуклеазної активності (dnrERN1), а також за гіпоксії, дефіциту глюкози і глутаміну у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1).

Більше того, ці зміни в експресії серингідроксиметилтрансферази 2 не опосередковуються ХВР1s, що узгоджується з даними Iovino та співавт. [205], які показали наявність незалежних від ХВР1s функцій ензиматичних активностей ERN1, а також з низкою інших публікацій [16, 89, 91, 92, 94, 95].

Більш виражена залежність експресії гена *SHMT2* від дефіциту глюкози і глутаміну у клітинах гліобластоми за умов пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 вказує на важливу роль серингідроксиметилтрансферази 2 у прогресії гліобластоми, особливо при зниженні проліферативного потенціалу внаслідок пригнічення сигнального шляху ERN1, що обумовлено полі-функціональністю цього ензиму мітохондрій.

Таким чином, у результаті проведених за темою цієї дисертаційної роботи досліджень було виявлено зниження рівня експресії генів, що контролюють синтез серину, у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, причому виявлені зміни в експресії цих генів були генно-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Експресія генів метаболізму серину змінювалася по-різному і також залежала від типу нокдауну ERN1. Вестерн блот-аналіз протеїнів PSAT1, PSPH і ATF4 показав зниження їх рівня у клітинах гліобластоми за цих умов. Вперше показана роль протеїнкіназної активності ERN1 у регуляції експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2* і ендорибонуклеазної активності ERN1 у регуляції експресії гена *ATF4*. Показано, що пригнічення активності ERN1 змінює рівень експресії мікроРНК, причетних до регуляції експресії генів синтезу серину. Вперше показано, що експресія всіх генів, що контролюють синтезу серину, є чутливою до гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну у клітинах гліобластоми, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін. Встановлено також, що пригнічення ензиматичних активностей ERN1 змінює чутливість більшості цих генів не лише до гіпоксії, а і до дефіциту глюкози та глутаміну, що є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин, у тому числі і клітин гліобластоми, до токсичних ефектів гіпоксії, а також хемотерапії за умов наявного у пухлинах стресу ендоплазматичного ретикулума.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати експериментальних досліджень щодо молекулярних механізмів регуляції експресії генів, задіяних у синтезі серину, стресом ендоплазматичного ретикулума, а саме одним із його сенсорно-сигнальних протеїнів, ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1), у клітинах гліобластоми. Встановлено, що пригнічення ензиматичних активностей ERN1 по-різному змінює експресію генів синтезу серину як через ендорибонуклеазну, так і протеїнкіназну активність сигнального протеїну ERN1, і що ця протеїнкіназна активність є також важливим регулятором експресії генів. Як гіпоксія, так і дефіцит глутаміну та глюкози змінюють рівень експресії цих генів синтезу серину генно-специфічно, причому інгібування ERN1 істотно модифікує ефекти гіпоксії та дефіциту поживних речовин, що вказує на їх залежність від стресу ендоплазматичного ретикулума.

1. Встановлено, що пригнічення сигнального протеїну ERN1 у клітинах гліобластоми по-різному впливає на експресію генів, відповідальних за синтез серину, причому через різні, опосередковані сигнальним шляхом ERN1, молекулярні механізми, включаючи і пост-трансляційні механізми через мікроРНК.

2. Виявлено, що зниження рівня експресії генів *PHGDH*, *SHMT1* та *SHMT2* опосередковане пригніченням протеїнкіназної активності ERN1, а гена *ATF4* – пригніченням його ендорибонуклеазної активності.

3. Показано, що у контрольних клітинах гліобластоми гіпоксія збільшує рівень експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *ATF4* і *SHMT2* та знижує *PSPH* і *SHMT1*, а у клітинах з пригніченим ERN1 ефект гіпоксії значно посилюється, але лише на гени *PHGDH*, *PSAT1* та *ATF4*, а це вказує на залежність їх гіпоксичної регуляції від активності ERN1.

4. У промоторах генів, що контролюють синтез серину, ідентифіковані специфічні сайти зв'язування транскрипційних факторів HIF

та XBP1s, які опосередковують гіпоксію і сигнальний шлях ERN1, причому виявлено їх перекривання, а це вказує на механізми взаємодії гіпоксичної регуляції зі стресом ендоплазматичного ретикулума.

5. Встановлено, що експресія генів, відповідальних за синтез серину, є чутливою до дефіциту як глюкози, так і глутаміну, і що пригнічення ERN1 посилює цю чутливість генно-специфічно, а особливо гена *PSAT1*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. McFaline-Figueroa, J.R., Lee, E.Q. (2018). Brain Tumors. *Am J Med.* 131(8), 874-882. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.12.039>.
2. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
3. Lapointe, S., Perry, A., Butowski, N.A. (2018). Primary brain tumours in adults. *Lancet.* 392(10145), 432–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30990-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5).
4. Xu, W., Li, T., Gao, L., Zheng, J., Shao, A., Zhang, J. (2017). Efficacy and safety of long-term therapy for high-grade glioma with temozolomide: A meta-analysis. *Oncotarget.* 8(31), 51758–51765. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17401>.
5. Lah, T.T., Novak, M., Breznik, B. (2020). Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol.* 60, 262-273. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.010>.
6. Masui, K., Onizuka, H., Cavenee, W. K., Mischel, P. S., Shibata, N. (2019). Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology.* 39(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/neup.12535>.
7. Obacz, J., Avril, T., Le Reste, P. J., Urra, H., Quillien, V., Hetz, C., Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci Signal.* 10(470), eaal2323. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal2323>.
8. Chevet, E., Hetz, C., Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov.* 5, 586–597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1490>.

9. Moon, H. W., Han, H. G., Jeon, Y. J. (2018). Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Int J Mol Sci.* 19(10), 3020. <https://doi.org/10.3390/ijms19103020>.
10. Almanza, A., Carlesso, A., Chintla, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E, Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>.
11. Parzych, K., Saavedra-García, P., Valbuena, G. N., Al-Sadah, H. A., Robinson, M. E., Penfold, L., Kuzeva, D. M., Ruiz-Tellez, A., Loaiza, S., Holzmann, V., Caputo, V., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Karadimitris, A., Lam, E. W., Chevet, E., Feldhahn, N., Keun, H. C., Auner, H. W. (2019). The coordinated action of VCP/p97 and GCN2 regulates cancer cell metabolism and proteostasis during nutrient limitation. *Oncogene.* 38, 3216–3231. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0651-z>.
12. Wang, M., Kaufman, R. J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 529(7586), 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>.
13. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
14. Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez A.E., Torrealba N., Paredes F., Wang Z.V., Zorzano A., Hill J.A., Jaimovich E., Quest A.F., Lavandero S. (2013). Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 301, 215-290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1>.
15. Auf, G., Jabouille, A., Guérit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouhecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., Moenner, M. (2010).

- Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107, 15553–15558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914072107>.
16. Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O., Moenner, M. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*. 13, 597. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-597>.
 17. Logue, S. E., McGrath, E. P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R. M., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E. C., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J. B., Jäger, R., Gorman, A. M., Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nat Commun*. 9(1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05763-8>.
 18. Pelizzari-Raymundo, D., Maltret, V., Nivet, M., Pineau, R., Papaioannou, A., Zhou, X., Caradec, F., Martin, S., Le Gallo, M., Avril, T., Chevet, E., Lafont, E. (2024). IRE1 RNase controls CD95-mediated cell death. *EMBO Rep*. 25(4), 1792-1813. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00095-9>.
 19. Pelizzari-Raymundo, D., Doultinos, D., Pineau, R., Sauzay, C., Koutsandreas, T., Langlais, T., Carlesso, A., Gkotsi, E., Negroni, L., Avril, T., Chatziioannou, A., Chevet, E., Eriksson, L.A., Guillory, X. (2023). A novel IRE1 kinase inhibitor for adjuvant glioblastoma treatment. *iScience*. 26(5), 106687. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106687>.
 20. Pelizzari Raymundo, D., Eriksson, L.A., Chevet, E, Guillory,. X. (2022). Structure-Based Drug Discovery of IRE1 Modulators. *Methods Mol Biol*. 2378, 293-315. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1732-8_19.
 21. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Khita, O.O., Minchenko, D.O. (2021). Inhibition of ERN1 signaling is important for the suppression of tumor

- growth. *Clinical Cancer Drugs*, 8(1), 27-38.
<http://dx.doi.org/10.2174/2212697X08666211006100250>.
22. Denko N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 8, 705–713. <https://doi.org/10.1038/nrc2468>.
 23. Colombo, S. L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., Moncada, S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108, 21069–21074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117500108>.
 24. Drogat B, Bouchecareilh M, North S, Petibois C, Dél  ris G, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. Acute L-glutamine deprivation compromises VEGF-a upregulation in A549/8 human carcinoma cells. (2007). *J Cell Physiol*. 212, 463-472. <https://doi.org/10.1002/jcp.21044>.
 25. Lazo P.A. (1981). Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *Eur J Biochem*. 117, 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06297.x>.
 26. Ediriweera, M.K., Jayasena, S. (2023). The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites*. 13(3), 345. <https://doi.org/10.3390/metabo13030345>.
 27. Yang, M., Vousden, K.H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 16, 650–662. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.81>.
 28. Hennequart, M., Labuschagne, C.F., Tajan, M., Pilley, S.E., Cheung, E.C., Legrave, N.M., Driscoll, P.C., Vousden, K.H. (2021). The impact of physiological metabolite levels on serine uptake, synthesis and utilization in cancer cells. *Nat Commun*. 12, 6176. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26395-5>.
 29. Engel, A.L., Lorenz, N.I., Klann, K., Munch, C., Depner, C., Steinbach, J.P., Ronellenfitsch, M.W., Luger, A.L. (2020). Serine-dependent redox homeostasis regulates glioblastoma cell survival. *Br J Cancer*. 122, 1391-1398. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0794-x>.

30. Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., Chen, W.W., Barrett, F.G., Stransky N., Tsun, Z.Y., Cowley, GS, Barretina, J, Kalaany, NY., Hsu, P.P., Ottina, K., Chan, A.M., Yuan, B., Garraway, L.A., Root, D.E., Mino-Kenudson, M., Brachtel, E.F., Driggers, E.M., Sabatini, D.M. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 476, 346-350. <https://doi.org/10.1038/nature10350>.
31. Tajan, M., Hennequart, M., Cheung, E.C., Zani, F., Hock, A.K., Legrave, N., Maddocks, O.D.K., Ridgway, R.A., Athineos, D., Suarez-Bonnet, A., Ludwig, R.L., Novellademunt, L., Angelis, N., Li, V.S.W., Vlachogiannis, G., Valeri, N., Mainolfi, N., Suri, V., Friedman, A., Manfredi, M., Blyth, K., Sansom, O.J., Vousden, K.H. (2021). Serine synthesis pathway inhibition cooperates with dietary serine and glycine limitation for cancer therapy. *Nat Commun*. 12, 366. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20223-y>.
32. Jin, L., Kiang, K.M., Cheng, S.Y., Leung, G.K. (2022). Pharmacological inhibition of serine synthesis enhances temozolomide efficacy by decreasing O(6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression and reactive oxygen species (ROS)-mediated DNA damage in glioblastoma. *Lab Invest*. 102, 194-203. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00666-7>.
33. Itoyama, R., Yasuda-Yoshihara, N., Kitamura, F., Yasuda, T., Bu, L., Yonemura, A., Uchihara, T., Arima, K., Hu, X., Jun, Z., Okamoto, Y., Akiyama, T., Yamashita, K., Nakao, Y., Yusa, T., Kitano, Y., Higashi, T., Miyata, T., Imai, K., Hayashi, H., Yamashita, Y.I., Mikawa, T., Kondoh, H., Baba, H., Ishimoto, T. (2021). Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 523, 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.09.007>.

34. Luo, X., Ge, J., Liu, J., Liu, Z., Bi, C., Lan, S. (2022). TFCP2, a binding protein of ATF3, promotes the progression of glioma by activating the synthesis of serine. *Exp. Cell Res.* 416, 113136. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113136>.
35. Holeček M. (2022). Serine Metabolism in Health and Disease and as a Conditionally Essential Amino Acid. *Nutrients.* 14, 1987. <https://doi.org/10.3390/nu14091987>.
36. Holm, L.J., Buschard, K. (2019). L-serine: a neglected amino acid with a potential therapeutic role in diabetes. *APMIS.* 127(10), 655-659. <https://doi.org/10.1111/apm.12987>.
37. Li, A.M., Ye, J. (2020). Reprogramming of serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1866(10), 165841. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165841>.
38. Zeng, J.D., Wu, W.K.K., Wang, H.Y., Li, X.X. (2019). Serine and one-carbon metabolism, a bridge that links mTOR signaling and DNA methylation in cancer. *Pharmacol Res.* 149, 104352. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104352>.
39. Cappello, A., Tosetti, G., Smirnov, A., Ganini, C., Yang, X., Shi, Y., Wang, Y., Melino, G., Bernassola, F., Candi, E. (2023). p63 orchestrates serine and one carbon metabolism enzymes expression in head and neck cancer. *Biol Direct.* 18, 73. <https://doi.org/10.1186/s13062-023-00426-1>.
40. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M, Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci.* 39, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.004>.
41. Rathore, R., Schutt, C.R., Van Tine, B.A. (2020). PHGDH as a mechanism for resistance in metabolically-driven cancers, *Cancer Drug Resist.* 3, 762-774. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.46>.
42. Vie, N., Copois, V., Bascoul-Mollevis, C., Denis, V., Bec, N., Robert, B., Fraslon, C., Conseiller, E., Molina, F., Larroque, C., Martineau, P., Del Rio, M., Gongora, C. (2008). Overexpression of phosphoserine

- aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol Cancer*. 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-14>.
43. Liu, J., Guo, S., Li, Q., Yang, L., Xia, Z., Zhang, L., Huang, Z., Zhang, N. (2013). Phosphoglycerate dehydrogenase induces glioma cells proliferation and invasion by stabilizing forkhead box M1. *J Neurooncol*. 111, 245–255. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-1018-x>.
 44. Liao, L., Yu, H., Ge, M., Zhan, Q., Huang, R., Ji, X., Liang, X., Zhou, X. (2019). Upregulation of phosphoserine phosphatase contributes to tumor progression and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Torac Cancer*. 10, 1203–1212. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13064>.
 45. Park, S.M., Seo, E.H., Bae, D.H., Kim, S.S., Kim, J., Lin, W., Kim, K.H., Park, J.B., Kim, Y.S., Yin, J., Kim, S.Y. (2019). Phosphoserine Phosphatase Promotes Lung Cancer Progression through the Dephosphorylation of IRS-1 and a Noncanonical L-Serine-Independent Pathway. *Mol Cells*. 42, 604-616. <https://doi.org/10.14348/molcells.2019.0160>.
 46. Mullarky, E., Lucki, N.C., Beheshti Zavareh, R., Anglin, J.L., Gomes, A.P., Nicolay, B.N., Wong, J.C., Christen, S., Takahashi, H., Singh, P.K., Blenis, J., Warren, J.D., Fendt, S.M., Asara, J.M., DeNicola, G.M., Lyssiotis, C.A., Lairson, L.L., Cantley, L.C. (2016). Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113, 1778–1783. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521548113>.
 47. Pacold, M.E., Brimacombe, K.R., Chan, S.H., Rohde, J.M., Lewis, C.A., Swier, L.J.Y.M., Possemato, R., Chen, W.W., Sullivan, L.B., Fiske, B.P., Cho, S., Freinkman, E., Birsoy, K., Abu-Remaileh, M., Shaul, Y.D., Liu, C.M., Zhou, M., Koh, M.J., Chung, H., Davidson, S.M., Luengo, A., Wang, A.Q., Xu, X., Yasgar, A., Liu, L., Rai, G., Westover, K.D., Vander

- Heiden, M.G., Shen, M., Gray, N.S., Boxer, M.B., Sabatini, D.M. (2016). A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat Chem Biol.* 12, 452–458. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2070>.
48. Metcalf, S., Dougherty, S., Kruer, T., Hasan, N., Biyik-Sit, R., Reynolds, L., Clem, B.F. (2020). Selective loss of phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) suppresses migration, invasion, and experimental metastasis in triple negative breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 37, 187–197. <https://doi.org/10.1007/s10585-019-10000-7>.
49. Ding, R., Hong, W., Huang, L., Shao, J., Yu, W., Xu, X. (2022). Examination of the effects of microRNA-145-5p and phosphoserine aminotransferase 1 in colon cancer. *Bioengineered.* 13, 12794–12806. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2071010>.
50. Gao, Y., Jing, N., Teng, X., Wang, Y. (2023). Serine hydroxymethyltransferase 1 promotes low-grade glioma progression by activating mTORC1 signaling. *Neurol Res.* 45 (5), 415–422. <https://doi.org/10.1080/01616412.2022.2149516>.
51. Kim, D., Fiske, B.P., Birsoy, K., Freinkman, E., Kami, K., Possemato, R.L., Chudnovsky, Y., Pacold, M.E., Chen, W.W., Cantor, J.R., Shelton, L.M., Gui D.Y., Kwon, M., Ramkisson, S.H., Ligon, K.L., Kang, S.W., Snuderl, M., Vander Heiden, M.G., Sabatini, D.M. (2015). SHMT2 drives glioma cell survival in ischaemia but imposes a dependence on glycine clearance. *Nature.* 520, 363–367. <https://doi.org/10.1038/nature14363>.
52. Zeng, Y., Zhang, J., Xu, M., Chen, F., Zi, R., Yue, J., Zhang, Y., Chen, N., Chin, Y.E. (2021). Roles of Mitochondrial Serine Hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2) in Human Carcinogenesis. *J Cancer.* 12, 5888–5894. <https://doi.org/10.7150/jca.60170>.
53. Wu, S., Zhang, G., Li, P., Chen, S., Zhang, F., Li, J., Jiang, C., Chen, X., Wang, Y., Du, Y., Sun, Q., Zhao, G. (2016). miR-198 targets SHMT1 to

- inhibit cell proliferation and enhance cell apoptosis in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 37, 5193-5202. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4369-z>.
54. Wang,W., Wang,M., Du,T., Hou,Z., You,S., Zhang,S., Ji,M., Xue,N., Chen,X. (2023). SHMT2 Promotes Gastric Cancer Development through Regulation of HIF1alpha/VEGF/STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci.* 24(8), 7150. <https://doi.org/10.3390/ijms24087150>.
 55. Ducker, G.S., Ghergurovich, J.M., Mainolfi, N., Suri, V., Jeong, S.K., Hsin-Jung Li, S., Friedman, A., Manfredi, M.G., Gitai, Z., Kim, H., Rabinowitz, J.D. (2017). Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114(43), 11404-11409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706617114>.
 56. Nguyen, T.H., Vemu, P.L., Hoy, G.E., Boudjadi, S., Chatterjee, B., Sher, J.F., Khan, J., Sun, W., Barr, F.G. (2021). Serine hydroxymethyltransferase 2 expression promotes tumorigenesis in rhabdomyosarcoma with 12q13-q14 amplification. *J Clin Invest.* 131(15), e138022. <https://doi.org/10.1172/JCI138022>.
 57. Qiao, Z., Li, Y., Cheng, Y., Li, S., Liu, S. (2023). SHMT2 regulates esophageal cancer cell progression and immune escape by mediating m6A modification of c-myc. *Cell Biosci.* 13, 203. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01148-7>.
 58. Shan, Y., Liu, D., Li, Y., Wu, C., Ye, Y. (2024). The expression and clinical significance of serine hydroxymethyltransferase2 in gastric cancer. *PeerJ.* 12, e16594. <https://doi.org/10.7717/peerj.16594>.
 59. Xie, S.Y., Shi, D.B., Ouyang, Y., Lin, F., Chen, X.Y., Jiang, T.C., Xia, W., Guo, L., Lin, H.X. (2022). SHMT2 promotes tumor growth through VEGF and MAPK signaling pathway in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 12, 3405-3421.

60. Morscher, R.J., Ducker, G.S., Li, S.H., Mayer, J.A., Gitai, Z., Sperl, W., Rabinowitz, J.D. (2018). Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature*. 554, 128-132. <https://doi.org/10.1038/nature25460>.
61. Minton, D.R., Nam, M., McLaughlin, D.J., Shin, J., Bayraktar, E.C., Alvarez, S.W., Sviderskiy, V.O., Papagiannakopoulos, T., Sabatini, D.M., Birsoy, K., Possemato, R. (2018). Serine Catabolism by SHMT2 Is Required for Proper Mitochondrial Translation Initiation and Maintenance of Formylmethionyl-tRNAs. *Mol Cell*. 69, 610-621.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.024>.
62. He, L., Ding, Y., Zhou, X., Li, T., Yin, Y. (2023). Serine signaling governs metabolic homeostasis and health. *Trends Endocrinol Metab*. 34(6), 361-372. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2023.03.001>.
63. Pikman, Y., Ocasio-Martinez, N., Alexe, G., Dimitrov, B., Kitara, S., Diehl, F.F., Robichaud, A.L., Conway, A.S., Ross, L., Su, A., Ling, F., Qi, J., Roti, G., Lewis, C.A., Puissant, A., Vander Heiden, M.G., Stegmaier, K. (2022). Targeting serine hydroxymethyltransferases 1 and 2 for T-cell acute lymphoblastic leukemia therapy. *Leukemia*. 36, 348-360. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01361-8>.
64. Rawat V, Malvi P, Della Manna D, Yang ES, Bugide S, Zhang X, Gupta R, Wajapeyee N. (2021). PSPH promotes melanoma growth and metastasis by metabolic deregulation-mediated transcriptional activation of NR4A1. *Oncogene*. 40, 2448–2462. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01683-y>.
65. Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J., Asara, J.M., Manning, B.D. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science*. 351, 728–733. <https://doi.org/10.1126/science.aad0489>.
66. Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine

- synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109, 6904-6909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204176109>.
67. Li, X., Gracilla, D., Cai, L., Zhang, M., Yu, X., Chen, X., Zhang, J., Long, X., Ding, HF, Yan, C. (2021). ATF3 promotes the serine synthesis pathway and tumor growth under dietary serine restriction. *Cell Rep*. 36(12), 109706. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109706>.
 68. Gao, S., Ge, A., Xu, S., You, Z., Ning, S., Zhao, Y., Pang, D. (2017). PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3beta/beta-catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 36, 179. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0648-4>.
 69. Ahmad, A., Rashid, S., Chaudhary, A.A., Alawam, A.S., Alghonaim, M.I., Raza, S.S., Khan, R. (2023). Nanomedicine as potential cancer therapy via targeting dysregulated transcription factors. *Semin Cancer Biol*. 89, 38-60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.01.002>.
 70. Vishnoi, K., Viswakarma, N., Rana, A., Rana, B. (2020). Transcription Factors in Cancer Development and Therapy. *Cancers*. 12(8), 2296. <https://doi.org/10.3390/cancers12082296>.
 71. Lambert, SA, Jolma, A, Campitelli, LF, Das, PK, Yin, Y, Albu, M, Chen, X, Taipale, J, Hughes, TR, Weirauch, MT. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*. 172(4), 650-665. [10.1016/j.cell.2018.01.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029).
 72. Minchenko, A., Caro, J. (2000). Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol Cell Biochem*. 208(1-2), 53–62. <https://doi.org/10.1023/a:1007042729486>.
 73. Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., Caro, J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3

- (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem.* 277, 6183–6187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110978200>.
74. Hasan, A., Khan, N.A., Uddin, S., Khan, A.Q., Steinhoff, M. (2024). Deregulated transcription factors in the emerging cancer hallmarks. *Semin Cancer Biol.* 98, 31-50. [10.1016/j.semcancer.2023.12.001](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.12.001).
 75. Wicks, E.E., Semenza, G.L. (2022). Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 132(11), e159839. <https://doi.org/10.1172/JCI159839>.
 76. Kant R, Manne RK, Anas M, Penugurti V, Chen T, Pan BS, Hsu CC, Lin HK. (2022). Deregulated transcription factors in cancer cell metabolisms and reprogramming. *Semin Cancer Biol.* 86(Pt 3), 1158-1174. [10.1016/j.semcancer.2022.10.001](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.001).
 77. DeNicola, G.M., Chen, P.H., Mullarky, E., Sudderth, J.A., Hu, Z., Wu, D., Tang, H., Xie, Y., Asara, J.M., Huffman, K.E., Wistuba, I.I., Minna, J.D., DeBerardinis, R.J., Cantley, L.C. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet.* 47, 1475–1481. <https://doi.org/10.1038/ng.3421>.
 78. Issaq, S.H., Mendoza A., Kidner, R., Rosales, T.I., Duveau, D.Y., Heske, C.M., Rohde, J.M., Boxer, M.B., Thomas, C.J., DeBerardinis, R.J., Helman, L.J. (2020). EWS-FLI1-regulated Serine Synthesis and Exogenous Serine are Necessary for Ewing Sarcoma Cellular Proliferation and Tumor Growth. *Mol Cancer Ther.* 19(7), 1520-1529. <https://doi.org/10.1158/1535-7163>.
 79. Sun, L., Song, L., Wan, Q., Wu, G., Li, X., Wang, Y., Wang, J., Liu, Z., Zhong, X., He, X., Shen, S., Pan, X., Li, A., Wang, Y., Gao, P., Tang, H., Zhang, H. (2015). cMyc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions. *Cell Res.* 25, 429-444. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.33>.

80. Zhang, Y., Huang, H., Liu, P., Xie, Y. (2023). NFYB increases chemosensitivity in glioblastoma by promoting HDAC5-mediated transcriptional inhibition of SHMT2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 82, 911-920. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlad073>.
81. Hetz, C., Zhang, K., Kaufman, R.J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21, 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.
82. Chen, X., Cubillos-Ruiz, J.R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 21(2), 71-88. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>.
83. Oakes, S.A. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am J Pathol.* 190, 934-946. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>.
84. Braakman, I., Bulleid, N.J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 80, 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062209-093836>.
85. Read, A., Schröder, M. (2021). The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology (Basel).* 10, 384. <https://doi.org/10.3390/biology10050384>.
86. Moenner, M, Pluquet, O, Bouchecareilh, M, Chevet, E. (2007). Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 67, 10631-10634. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1705>.
87. Schonthal, A.H. (2013). Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer. *Biochem Pharmacol.* 85, 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.012>.
88. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., Dynlacht, B.D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell.* 27, 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>.

89. Minchenko, D.O., Tsymbal, D.O., Riabovol, O.O., Viletska, Y.M., Lahanovska, Y.O., Sliusar, M.Y., Bezrodnyi, B.H., Minchenko, O.H. (2019). Hypoxic regulation of EDN1, EDNRA, EDNRB, and ECE1 gene expressions in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 53, 250–262. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0025>.
90. Minchenko, D.O., Khita, O.O., Tsymbal, D.O., Danilovskyi, S.V., Rudnytska, O.V., Halkin, O.V., Kryvdiuk, I.V., Smeshkova, M.V., Yakymchuk, M.M., Bezrodnyi, B.H., Minchenko, O.H. (2020). Expression of IDE and PITRM1 genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia and glucose deprivation. *Endocr Regul.* 54, 183–195. <https://doi.org/10.2478/enr-2020-0021>.
91. Minchenko, O., Tsymbal, D., Minchenko, D., Moenner, M., Kovalevska, O., Lypova, N. (2015). Inhibition of kinase and endoribonuclease activity of ERN1/IRE1 α affects expression of proliferation related genes in U87 glioma cells. *Cell Pathology*, 2, 18-29. <https://doi.org/10.1515/ersc-2015-0002>.
92. Minchenko, O.H., Khita, O.O., Krasnytska, D.A., Viletska, Y.M., Rudnytska, O.V., Hnatiuk, O.S., Minchenko, D.O. (2024). ERN1 knockdown affects the expression of TGIF1 and other homeobox genes in U87MG glioblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 758, 110073. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110073>.
93. Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* 39, 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>.
94. Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol.* 186, 323–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>.
95. Moore, K., Hollien, J. (2015). Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Mol Biol Cell.* 26, 2873–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0074>.

96. Upton, J.P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F.R., Oakes, S.A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*. 338(6108), 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>.
97. Maurel, M., Chevet, E. (2013). Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 304, C1117-1126. [10.1152/ajpcell.00061.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00061.2013).
98. Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Dev Cell*. 13, 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>
99. Zhao, N., Cao, J., Xu, L., Tang, Q., Dobrolecki, L.E., Lv, X., Talukdar, M., Lu, Y., Wang, X., Hu, D.Z., Shi, Q., Xiang, Y., Wang, Y., Liu, X., Bu, W., Jiang, Y., Li, M., Gong, Y., Sun, Z., Ying, H., Yuan, B., Lin, X., Feng, X.H., Hartig, S.M., Li, F., Shen, H., Chen, Y., Han, L., Zeng, Q., Patterson, J.B., Kaiparettu, B.A., Putluri, N., Sicheri, F., Rosen, J.M., Lewis, M.T., Chen, X. (2018). Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer. *J Clin Invest*. 128, 1283–1299. <https://doi.org/10.1172/JCI95873>.
100. Tameire, F., Verginadis, I.I., Leli, N.M., Polte, C., Conn, C.S., Ojha, R., Salas Salinas, C., Chinga, F., Monroy, A.M., Fu, W., Wang, P., Kossenkov, A., Ye, J., Amaravadi, R.K., Ignatova, Z., Fuchs, S.Y., Diehl, J.A., Ruggero, D., Koumenis, C. (2019). ATF4 couples MYC-dependent translational activity to bioenergetic demands during tumour progression. *Nat Cell Biol*. 21(7), 889–899. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0347-9>.
101. Fels, D.R.; Koumenis, C. (2006). The perk/eif2 α /atf4 module of the upr in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol Ther*. 5, 723–728. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.7.2967>.

102. Ghosh, R., Lipson, K.L., Sargent, K.E., Mercurio, A.M., Hunt, J.S., Ron, D., Urano, F. (2010). Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One*. 5, e9575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009575>.
103. Minchenko, O.H., Kubaichuk, K.I., Minchenko, D.O., Kovalevska, O.V., Kulinich, A.O. Lypova N.M. (2014). Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol*. 5, 1-22. <https://doi.org/10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i1.10>.
104. Romero-Ramirez, L., Cao, H., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A.H., Yoshida, H., Mori, K., Glimcher, L.H., Denko, N.C., Giaccia, A.J., Le, Q.T., Koong, A.C. (2004). Xbp1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*. 64, 5943–5947. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
105. Rezghi Barez, S., Movahedian Attar, A., Aghaei, M. (2021). MicroRNA-30c-2-3p regulates ER stress and induces apoptosis in ovarian cancer cells underlying ER stress. *EXCLI J*. 20, 922-934. <https://doi.org/10.17179/excli2020-2970>.
106. Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., Kaufman, R.J. (2006). Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol*. 4(11), e374. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040374>.
107. Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*. 16, 533–544. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160523143937>.

108. Avril, T., Vauleon, E., Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis*. 6, e373. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.72>.
109. Le Reste, P.J., Pineau, R., Voutetakis, K., Samal, J., Jégou, G., Lhomond, S., Gorman, A.M., Samali, A., Patterson, J.B., Zeng, Q., Pandit, A., Aubry, M., Soriano, N., Etcheverry A., Chatziioannou, A., Mosser, J., Avril, T., Chevet, E. (2020). Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo. *Cancer Lett*. 494, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.028>.
110. Chan, C. (2021). Palmitate-Induced IRE1-XBP1-ZEB Signaling Represses Desmoplakin Expression and Promotes Cancer Cell Migration. *Mol Cancer Res*. 19, 240-248. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0480>.
111. Urra, H., Henriquez, D.R., Canovas, J., Villarroel-Campos, D., Carreras-Sureda, A., Pulgar, E., Molina, E., Hazari, Y.M., Limia, C.M., Alvarez-Rojas, S., Figueroa, R., Vidal, R.L., Rodriguez, D.A., Rivera, C.A., Court, F.A., Couve, A., Qi, L., Chevet, E., Akai, R., Iwawaki, T., Concha, M.L., Glavic, A., Gonzalez-Billault, C., Hetz, C. (2018). IRE1alpha governs cytoskeleton remodelling and cell migration through a direct interaction with filamin A. *Nat Cell Biol*. 20, 942-953. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0141-0>.
112. Almanza, A., Mnich, K., Blomme, A., Robinson, C.M., Rodriguez-Blanco, G., Kierszniowska, S., McGrath, E.P., Le Gallo, M., Pilalis, E., Swinnen, J.V., Chatziioannou, A., Chevet, E., Gorman, A.M., Samali, A. (2022). Regulated IRE1 α -dependent decay (RIDD)-mediated reprogramming of lipid metabolism in cancer. *Nat Commun*. 13(1), 2493. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30159-0>.
113. Krasnytska, D.A., Khita, O.O., Viletska, Y.M., Minchenko, D.O., Halkin, O.V., Rudnytska, O.V., Hoian, S.L., Minchenko, O.H. (2024). ERN1

- knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Regul.* 58, 47-56. <https://doi.org/10.2478/enr-2024-0006>.
114. Minchenko, D.O., Khita, O.O., Tsymbal, D.O., Viletska, Y.M., Sliusar, M.Y., Yefimova, Y.V., Levadna, L.O., Krasnytska, D.A., Minchenko, O.H. (2021). ERN1 knockdown modifies the impact of glucose and glutamine deprivations on the expression of EDN1 and its receptors in glioma cells. *Endocr Regul.* 55, 72-82. <https://doi.org/10.2478/enr-2021-0009>.
 115. Krasnytska, D.O., Viletska, Y. M., Minchenko, D.O., Khita, O.O., Tsymbal, D.O., Cherednychenko, A.A., Kozynkevych, H.E., Oksiom, N.S., Minchenko, O.H. (2023). ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on PBX3, PBXIP1, PAX6, MEIS1, and MEIS2 genes expression in U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 57, 37-47. <https://doi.org/10.2478/enr-2023-0005>.
 116. Lhomond, S., Avril, T., Dejeans, N., Voutetakis, K., Doultisinos, D., McMahon, M., Pineau, R., Obacz, J., Papadodima, O., Jouan, F., Bourien, H., Logotheti, M., Jégou, G., Pallares-Lupon, N., Schmit, K., Le Reste, P. J., Etcheverry, A., Mosser, J., Barroso, K., Vauléon, E., Maurel M, Samali A, Patterson JB, Pluquet O, Hetz C, Quillien V, Chatziioannou A, Chevet, E. (2018). Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Mol Med.* 10(3), e7929. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707929>.
 117. Hetz, C., Chevet, E., Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 12, 703–719. <https://doi.org/10.1038/nrd3976>.
 118. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O. Minchenko D.O. (2015). IRE-1alpha signaling as a key target for suppression of tumor growth. *Single Cell Biology.* 4(3), 118. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3235>.

119. Bartoszewska, S., Sławski, J., Collawn, J.F., Bartoszewski, R. (2023). Dual RNase activity of IRE1 as a target for anticancer therapies. *J Cell Commun Signal.* 17, 1145-1161. <https://doi.org/10.1007/s12079-023-00784-5>.
120. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* 15, 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
121. Hompland, T., Fjeldbo, C.S., Lyng, H. (2021). Tumor Hypoxia as a Barrier in Cancer Therapy: Why Levels Matter. *Cancers (Basel).* 13, 499. <https://doi.org/10.3390/cancers13030499>.
122. Koh, M.Y., Powis, G. (2012). Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 37(9), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.004>.
123. Krock, B.L., Skuli, N., Simon, M.C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2, 1117–1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>.
124. Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., Azab, A.K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* 3, 83-92. <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
125. Sermeus, A., Genin, M., Maincent, A., Fransolet, M., Notte, A., Leclere, L., Riquier, H., Arnould, T., Michiels, C. (2012). Hypoxia-induced modulation of apoptosis and BCL-2 family proteins in different cancer cell types. *PLoS One.* 7(11), e47519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047519>.
126. Sørensen, B.S., Horsman, M.R. (2020). Tumor Hypoxia: Impact on Radiation Therapy and Molecular Pathways. *Front Oncol.* 10, 562. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00562>.
127. Chédeville, A.L., Madureira, P.A. (2021). The Role of Hypoxia in Glioblastoma Radiotherapy Resistance. *Cancers (Basel).* 13, 542. <https://doi.org/10.3390/cancers13030542>.

128. Lee SH, Golinska M, Griffiths JR. (2021). HIF-1-Independent Mechanisms Regulating Metabolic Adaptation in Hypoxic Cancer Cells. *Cells*. 10, 2371. <https://doi.org/10.3390/cells10092371>.
129. Rashid, M., Zadeh, L.R., Baradaran, B., Molavi, O., Ghesmati, Z., Sabzichi, M., Ramezani, F. (2021). Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene*. 798, 145796. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145796>.
130. Semenza, G.L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 35(2), 71-103. <https://doi.org/10.1080/10409230091169186>.
131. Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. 88, 2606–2618. PMID: 10861440.
132. Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., Oberhuber, G. (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*. 60, 4693–4696. PMID: 10987269.
133. Schödel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, Mole DR. (2016). Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol*. 69(4), 646-657. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.007>.
134. Бобарикіна, А.Ю., Мінченко, Д.О., Опентанова, І.Л., Ковтун, О.О., Комісаренко, С.В., Есумі, Г., Мінченко, О.Г. (2006). Експресія мРНК HIF-1 α , HIF-2 α та VHL у різних лініях клітин при гіпоксії. *Укр біохім журн*. 78(2), 62-72.
135. Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. 16(10), 1151-1162. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0944rev>.

136. Tuckerman, J.R., Zhao, Y., Hewitson, K.S., Tian, Y.M., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Mole, D.R. (2004). Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett.* 576, 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.005>.
137. Appelhoff, R.J., Tian, Y.M., Raval, R.R., Turley, H., Harris, A.L., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Gleadle, J.M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 279, 38458-38465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406026200>.
138. Metzen, E., Ratcliffe, P.J. (2004). HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem.* 385, 223-230. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.016>.
139. Mole, D.R., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001). Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life.* 52, 43-47. <https://doi.org/10.1080/15216540252774757>.
140. Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 343-354. <https://doi.org/10.1038/nrm1366>.
141. Willam, C., Nicholls, L.G., Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H. (2004). The prolyl hydroxylase enzymes that act as oxygen sensors regulating destruction of hypoxia-inducible factor alpha. *Adv Enzyme Regul.* 44, 75-92. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2003.11.017>.
142. Minchenko, O.H., Ochiai, A., Opentanov, I.L., Ogura, T., Minchenko, D.O., Caro, J., Komisarenko, S.V., Esumi, H. (2005). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie.* 87 (11), 1005-1010. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.007>.
143. Bobarykina, A.Y., Minchenko, D.O., Opentanov, I.L., Moenner, M., Caro, J., Esumi, H., Minchenko, O.H. (2006). Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer

- cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochim. Pol.* 53, 789-799.
144. Yfantis, A, Mylonis, I., Chachami, G., Nikolaidis, M., Amoutzias, G.D., Paraskeva, E., Simos, G. (2023). Transcriptional Response to Hypoxia: The Role of HIF-1-Associated Co-Regulators. *Cells.* 12, 798. <https://doi.org/10.3390/cells12050798>.
 145. Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., Caro, J. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest.* 71, 374-379.
 146. Semenza, G.L. (2017). A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Exp Cell Res.* 356, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.041>.
 147. Lauer V, Grampp S, Platt J, Lafleur V, Lombardi O, Choudhry H, Kranz F, Hartmann A, Wullich B, Yamamoto A, Coleman ML, Ratcliffe PJ, Mole DR, Schödel J. (2020). Hypoxia drives glucose transporter 3 expression through hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-mediated induction of the long noncoding RNA NIC1. *J Biol Chem.* 295, 4065-4078. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009827>.
 148. Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. (2019). Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets. *Exp Mol Med.* 51(6), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0235-1>.
 149. Ma, Z., Wang, L.Z., Cheng, J.T., Lam, W.S.T., Ma, X., Xiang, X., Wong, A.L., Goh, B.C., Gong, Q., Sethi, G., Wang, L. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1-Mediated Metastasis for Cancer Therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2021 34(18), 1484-1497. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7935>.
 150. Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 22, 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>.

151. Minchenko, D.O., Kharkova, A.P., Hubenia, O.V., Minchenko, O.H. (2013). Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRAD, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation. *Endocr Regul.* 47, 15–26. https://doi.org/10.4149/endo_2013_01_15.
152. Minchenko, D.O., Danilovskyi, S.V., Kryvdiuk, I.V., Bakalets, T.V., Lypova, N.M., Karbovskyi, L.L. Minchenko, O.H. (2014). Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. *Endoplasm Reticul Stress Dis.* 1, 18-26. <https://doi.org/10.2478/ersc-2014-0001>.
153. Minchenko O.H., Garmash I.A., Kovalevska O.V., Tsymbal D.O., Minchenko D.O. (2014). Expression of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase genes in U87 glioma cells with ERN1 knockdown: effect of hypoxia and endoplasmic reticulum stress. *Ukr Biochem J.* 86 (6), 74-83. <https://doi.org/10.15407/ubj86.06.074>.
154. Minchenko, O.H., Kharkova, A.P., Kubaichuk, K.I., Minchenko, D.O., Hlushchak, N.A., Kovalevska, O.V. (2014). Effect of hypoxia on the expression of CCN2, PLA2, PLAUR, SLURP1, PLAT and ITGB1 genes in ERN1 knockdown u87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 86(4), 79–89. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.079>.
155. Danilovskyi, S.V., Minchenko, D.O., Moliavko, O.S., Kovalevska, O.V., Karbovskyi, L.L., Minchenko, O.H. (2014). ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of TP53, MDM2, USP7 and PERP gene expressions in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 86(4), 90–102. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.090>.
156. Minchenko, O.H., Kharkova, A.P., Minchenko, D.O., Karbovskyi, L.L. (2015). Effect of hypoxia on the expression of IGFBP6, IGFBP7, NOV, CYR61, WISP1, and WISP2 genes in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. *Ukr Biochem J.* 87(6), 52–63. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.052>.

157. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Kovalevska, O.V., Karbovskiy, L.L., Bikfalvi, A. (2015). Inhibition of ERN1 signaling enzyme affects hypoxic regulation of the expression of E2F8, EPAS1, HOXC6, ATF3, TBX3 and FOXF1 genes in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 87(2), 76–87. <https://dx.doi.org/10.15407/ubj87.02.076>.
158. Minchenko, D.O., Kharkova, A.P., Karbovskiy, L.L., Minchenko, O.H. (2015). Expression of insulin-like growth factor binding protein genes and its hypoxic regulation in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. *Endocr Regul.* 49, 73–83. https://doi.org/10.4149/endo_2015_02_73.
159. Minchenko, D.O., Kharkova, A.P., Halkin, O.V., Karbovskiy, L.L., Minchenko, O.H. (2016). Effect of hypoxia on the expression of genes encoding insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without IRE1 function. *Endocr Regul.* 50, 43–54. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0008>.
160. Minchenko, O.H., Kryvdiuk, I.V., Riabovol, O.O., Minchenko, D.O., Danilovskyi, S.V., Ratushna, O.O. (2016). Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 88(2), 25–34. <https://doi.org/10.15407/ubj88.02.025>.
161. Minchenko, O.H., Kryvdiuk, I.V., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Halkin O.V. (2016). 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. *Endoplasm Reticul Stress Dis.* 3(1), 1-15. [10.1515/ersc-2016-0001](https://doi.org/10.1515/ersc-2016-0001).
162. Minchenko, O., Tsymbal, D., Minchenko, D., Riabovol, O., Halkin, O., Ratushna, O. (2016). IRE-1 α regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells. *Cell Pathology*, 3, 50-62. <https://doi.org/10.1515/ersc-2016-0003>.
163. Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Ratushna, O.O., Minchenko, O.H. (2016). Inhibition of IRE1 signaling affects the

- expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 50, 127–136. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0014>.
164. Minchenko, O.H., Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Ratushna, O.O. (2016). Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 88(3), 54–65. <https://doi.org/10.15407/ubj88.03.054>.
 165. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Ratushna, O.O., Karbovskiy, L.L. (2016). Hypoxic regulation of the expression of cell proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of ire1 signaling enzyme. *Ukr Biochem J.* 88(1), 11–21. <https://doi.org/10.15407/ubj88.01.011>.
 166. Akman, M., Belisario, D.C., Salaroglio, I.C., Kopecka, J., Donadelli, M., De Smaele, E., Riganti, C. (2021). Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons. *J Exp Clin Cancer Res.* 40, 28. doi: 10.1186/s13046-020-01824-3.
 167. Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D.Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M.D., Ferrari, M., Shin, S.J., Brown, M., Chang, J.C., Liu, X.S., Glimcher, L.H. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature.* 508, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature13119>.
 168. Awale, S., Lu, J., Kalauni, S. K., Kurashima, Y., Tezuka, Y., Kadota, S., Esumi, H. (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res.* 66, 1751–1757. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3143>.
 169. He, Y., Fan, Q., Cai, T., Huang, W., Xie, X., Wen, Y., Shi, Z. (2018). Molecular mechanisms of the action of Arctigenin in cancer. *Biomed Pharmacother.* 108, 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.158>.

170. Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Lebid-Biletska, K.M., Sliusar, M.Y., Rudnytska, O.V., Minchenko, O.H. (2019). Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 53, 237–249. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0024>.
171. Minchenko, O.H., Kharkova, A., Hnatiuk, O.S., Luzina, O.Y., Kryvdiuk, I.V., Kuznetsova, A.Y. (2018). ERN1 modifies effect of glutamine deprivation on tumor growth related factors expression in U87 glioma cells. *Ukr Biochem J.* 90 (3), 49-61. <https://doi.org/10.15407/ubj90.03.049>.
172. Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Ratushna, O.O., Minchenko O.H. (2016). IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine and glucose deprivations on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Biotechnol Acta.* 9 (2), 37-47. <https://doi.org/10.15407/biotech9.02.037>.
173. Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Ratushna, O.O., Minchenko, O.H. (2016). IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells. *Biotechnol Acta.* 9(1), 26-37. <https://doi.org/10.15407/biotech9.01.026>.
174. Halkin, O.V., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Telychko V.V., Ratushna, O.O., Minchenko, O.H. (2017) Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation. *Ukr Biochem J.* 89(5), 52-61. <https://doi.org/10.15407/ubj89.05.052>.
175. Krasnytska, D.A., Khita, O.O., Tsymbal, D.O., Luzina, O.Y., Cherednychenko, A.A., Kozynkevych, H.E., Bezrodny, B.H., Minchenko, D.O. (2022). The impact of glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Regul.* 56, 38-47. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0005>.

176. Minchenko, D.O., Krasnytska, D.A., Khita, O.O., Viletska, Y.M., Rudnytska, O.V., Kozynkevych, H.E., Hoian, S.L., Minchenko, O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. *J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia*. 2023, 1, 1-10. <https://doi.org/10.59657/jedr.brs.23.004>.
177. Sun, R.C., Denko, N.C. (2014). Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell Metab*. 19, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.022>.
178. Pinweha, P., Rattanapornsompong, K., Charoensawan, V., Jitrapakdee, S. (2016). MicroRNAs and oncogenic transcriptional regulatory networks controlling metabolic reprogramming in cancers. *Comput Struct Biotechnol J*. 14, 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.05.005>.
179. Hussen, B.M., Hidayat, H.J., Salihi, A., Sabir, D.K., Taheri, M., Ghafouri-Fard, S. (2021). MicroRNA: A signature for cancer progression. *Biomed Pharmacother*. 138, 111528. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111528>.
180. Ho, P.T.B., Clark, I.M., Le, L.T.T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci*. 23(13), 7167. <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>.
181. Shahzad, U., Krumholtz, S., Rutka, J. T., Das, S. (2021). Noncoding RNAs in Glioblastoma: Emerging Biological Concepts and Potential Therapeutic Implications. *Cancers*. 13(7), 1555. <https://doi.org/10.3390/cancers13071555>.
182. Kim, S. H., Lim, K. H., Yang, S., Joo, J. Y. (2021). Long non-coding RNAs in brain tumors: roles and potential as therapeutic targets. *J Hematol Oncol*. 14, 77. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01088-0>.

183. DeSouza, P. A., Qu, X., Chen, H., Patel, B., Maher, C. A., Kim, A. H. (2021). Long, Noncoding RNA Dysregulation in Glioblastoma. *Cancers*. 13, 1604. <https://doi.org/10.3390/cancers13071604>.
184. Lu, C., Wei, Y., Wang, X., Zhang, Z., Yin, J., Li, W., Chen, L., Lyu, X., Shi, Z., Yan, W., You, Y. (2020). DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Mol Cancer*. 19, 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1137-5>.
185. Roh, J., Im, M., Kang, J., Youn, B., Kim, W. (2023). Long non-coding RNA in glioma: novel genetic players in temozolomide resistance. *Animal cells and systems*. 27, 19–28. <https://doi.org/10.1080/19768354.2023.2175497>.
186. Ahmed, S.P., Castresana, J.S., Shahi, M.H. (2021). Glioblastoma and MiRNAs. *Cancers (Basel)*. 13(7), 1581. <https://doi.org/10.3390/cancers13071581>.
187. Dong, C.G., Wu, W.K., Feng, S.Y., Wang, X.J., Shao, J.F., Qiao, J. (2012). Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. *Int J Oncology*. 41(3), 1005–1012. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1542>.
188. Petri, B.J., Piell, K.M., Wilt, A.E., Howser, A.D., Winkler, L., Whitworth, M.R., Valdes, B.L., Lehman, N.L., Clem, B.F., Klinge, C.M. (2023). MicroRNA regulation of the serine synthesis pathway in endocrine-resistant breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 30(11), e230148. <https://doi.org/10.1530/ERC-23-0148>.
189. Pan, Y., Huang, Q., Pen, X., Yu, S., Liu, N. (2022). Circ_0015756 promotes ovarian cancer progression via the miR-145-5p/PSAT1 axis. *Reprod Biol*. 22(4), 100702. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100702>.
190. Wang, M., Yue, S., Yang, Z. (2023). Downregulation of PSAT1 inhibits cell proliferation and migration in uterine corpus endometrial carcinoma. *Sci Rep*. 13, 4081. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31325-0>.

191. Fang, Y., Liang, X., Xu, J., Cai, X. (2018). miR-424 targets AKT3 and PSAT1 and has a tumor-suppressive role in human colorectal cancer. *Cancer Manag Res.* 10, 6537-6547. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S185789>.
192. Wang, H., Fang, Q., You, S., Wu, Y., Zhang, C. (2023). miRNA-195-5p/PSAT1 feedback loop in human triple-negative breast cancer cells. *Genes Genomics.* 45, 39-47. <https://doi.org/10.1007/s13258-022-01327-9>.
193. Qi, C., Qin, X., Zhou, Z., Wang, Y., Yang, Q., Liao, T. (2020). Circ_0072995 Promotes Cell Carcinogenesis via Up-Regulating miR-149-5p-Mediated SHMT2 in Breast Cancer. *Cancer Manag Res.* 12, 11169-11181. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S272274>.
194. Yang, G., Tan, J., Guo, J., Wu, Z., Zhan, Q. (2022). Exosome-mediated transfer of circ_0063526 enhances cisplatin resistance in gastric cancer cells via regulating miR-449a/SHMT2 axis. *Anticancer Drugs.* 33(10), 1047-1057. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001386>.
195. Bi, X., Wang, L., Li, H., Ma, Y., Guo, R., Yue, J., Kong, L., Gong, X., Jiao, F., Chinn, E., Hu, J. (2024). MiR-383-5p inhibits the proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by targeting SHMT2. *J Cancer.* 15, 2746-2758. <https://doi.org/10.7150/jca.89733>.
196. Sasai, K., Akagi, T., Aoyanagi, E., Tabu, K., Kaneko, S., Tanaka, S. (2007). O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: implications for anti-glioma therapies. *Mol Cancer.* 6, 36. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-36>.
197. Maadi, H., Soheilifar, M.H., Wang, Z. (2022). Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2579, 183-195. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_14.
198. Rudnytska, O.V., Khita, O.O., Minchenko, D.O., Tsymbal, D.O., Yefimova, Y.V., Sliusar, M.Y., Minchenko, O.H. (2021). The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes

- in normal human astrocytes. *Curr Res Toxicol.* 2, 64-71.
<https://doi.org/10.1016/j.crttox.2021.02.001>.
199. Minchenko, O., Opentanova, I., Minchenko, D., Ogura, T., Esumi, H. (2004). Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett.* 576, 14-20.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.053>.
 200. Minchenko OH, Sliusar MY, Khikhlo YP, Halkin OV, Viletska YM, Khita OO, Minchenko DO. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 759: 110104.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104>.
 201. Minchenko OH, Sliusar MY, Khita OO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Minchenko DO. Endoplasmic reticulum stress-dependent regulation of the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. *Endocr Regul.* 2024, 58(2): 1-9.
<https://doi.org/10.2478/enr-2024-001x>.
 202. Sliusar MY, Minchenko DO, Khita OO, Tsymbal DO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Ratushna OO, Minchenko OH. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. *Endocr Regul.* 2023, 57(4): 252-261.
<https://doi.org/10.2478/enr-2023-0028>.
 203. Minchenko OH, Sliusar MY, Khita OO, Minchenko DO, Viletska YM, Halkin OV, Levadna LO, Cherednychenko AA, Khikhlo YP. Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Regul.* 2024, 58(1): 91-100. <https://doi.org/10.2478/enr-2024-0010>.
 204. Minchenko, O.H., Abramchuk, A.I., Khita, O.O., Sliusar, M.Y., Viletska, Y.M., Minchenko, D.O. (2024). Endoplasmic reticulum stress-dependent

regulation of carboxypeptidase E expression in glioblastoma cells. *Endocr Regul.* 58, 206-214. <https://doi.org/10.2478/enr-2024-0024>.

205. Iovino, M., Colonval, M., Wilkin, C., L'homme, L., Lassence, C., Campas, M., Peulen, O., de Tullio, P., Piette, J., Legrand-Poels, S. (2023). Novel XBP1s-independent function of IRE1 RNase in HIF-1alpha-mediated glycolysis upregulation in human macrophages upon stimulation with LPS or saturated fatty acid. *Front Immunol.* 14, 1204126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1204126>.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації:

1. **Sliusar MY**, Minchenko DO, Khita OO, Tsymbal DO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Ratushna OO, Minchenko OH. Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. *Endocrine Regulations*, 2023, 57(4): 252-261. doi:10.2478/enr-2023-0028. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії генів *SHMT1* та *ATF4*. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Юлія Вілецька, Сергій Даніловський та Оксана Ратушна приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

Scopus i PubMed

2. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khikhlo YP, Halkin OV, Viletska YM, Khita OO, Minchenko DO. Knockdown of ERN1 disturbs the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and related genes in glioblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 2024, 759: 110104. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.110104>. *(Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка отриманих результатів та участь у написанні статті)*. Дмитро Мінченко і Євген Хіхло допомагали у вивченні експресії генів *PSAT1*, *SHMT1* та *ATF4*. Олена Хіта, Олег Галкін та Юлія Вілецька приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus, Web of Sciences**

3. Minchenko OH, **Sliusar MY**, Khita OO, Minchenko DO, Viletska YM, Halkin OV, Levadna LO, Cherednychenko AA, Khikhlo YP. Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells.

Endocr Reg, 2024, 58(1): 91-100. doi:10.2478/enr-2024-0010. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 та ATF4, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів SHMT1 та ATF4. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Олег Галкін, Людмила Левадна та Євген Хіхло приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

4. Minchenko OH, **Slusar MY**, Khita OO, Viletska YM, Luzina OY, Danilovskyi SV, Minchenko DO. Endoplasmic reticulum stress-dependent regulation of the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. Endocr Reg, 2024, 58(2): 1-9. doi:10.2478/enr-2024-001x. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії гена SHMT2 за умов пригнічення ERN1, гіпоксії і дефіциту глутаміну чи глюкози, обробка даних та участь у написанні статті*). Дмитро Мінченко допомагав у вивченні регуляції експресії цього гена за дефіциту глюкози. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Лузіна та Сергій Даніловський приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

5. **Слюсар М.**, Хіта О. Вплив гіпоксії на експресію генів, що відповідають за біосинтез серину, у клітинах гліоми з пригніченим ERN1. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 42-43.

6. Khita O, **Slusar M**, Viletska Y, Minchenko O. Downregulation of the expression of genes responsible for serine synthesis may contribute to suppression of glioma cell proliferation introduced by ERN1 inhibition. FEBS Open Bio, 2023, 13 (Suppl. S2):64. doi: 10.1002/2211-5463.13646. The 47th FEBS Congress, July 8-12, 2023, Tours, France.

7. Minchenko DO, Khita OO, **Sliusar MY**, Krasnytska DA, Viletska YM, Cherednychenko AA, KhikhloYP, Minchenko OH. Hydrocortisone modifies the impact of tunicamycin, thapsigargin, and hypoxia on the expression of ATF3 and other transcription factors in normal human astrocytes and U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 73.

8. **Sliusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of PSAT1, PSPH, and PHGDH mRNA expressions in U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 79.

9. **Sliusar MY**, Minchenko OH. The endoplasmic reticulum stress controls the expression of serine hydroxymethyltransferase 2 in glioblastoma cells. XVIII All-Ukrainian Conference of Young Scientists, May 21-22, IMBG, Book of abstracts, Kyiv 2024: 54.

10. Abramchuk AI, **Sliusar MY**, Minchenko OH. Regulation of carboxypeptidase E expression in glioblastoma cells is controlled by ERN1. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology”, Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 48-50.

11. Khikhlo EP, **Sliusar MY**, Minchenko OH. ERN1 knockdown disrupts the expression of phosphoserine aminotransferase 1 and associated genes in glioblastoma cells. The 7 International Scientific Conference "Current Problems of Biochemistry, Cell biology and Physiology”, Dnipro, Ukraine, 3-4 October, 2024, 53-54.