

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Лузіна Ольга Ярославівна

УДК 577.112.7:616

**РОЛЬ IRE1 В ЕКСПРЕСІЇ NAMPT ТА ЗАЛЕЖНИХ ВІД НЬОГО
ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ**

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ /Лузіна О.Я./

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

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Лузіна О.Я. Роль IRE1 в експресії NAMPT та залежних від нього протеїнів 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, 2021.

Актуальним напрямком сучасних біохімічних та медико-біологічних досліджень є вивчення молекулярних механізмів міжгенних взаємодій в пухлинах різного типу з метою удосконалення та створення нових стратегій боротьби з цим захворюванням. Гліоми є високоагресивними злоякісними пухлинами центральної нервової системи, що характеризуються швидкими темпами росту та важко піддаються терапії. Наразі ведеться пошук потенційних протеїнів-мішеней з метою їх комбінованого застосування у лікуванні пухлин.

Злоякісна трансформація супроводжується репрограмуванням тотального метаболізму клітини з метою адаптації до гіпоксії, дефіциту поживних речовин та підтримки процесів проліферації на сталому рівні. Для виживання та протидії стресовим чинникам у пухлинних клітинах відбувається активація мережі сигнальних каскадів, що веде до посилення процесів проліферації та ангіогенезу.

Стрес ендоплазматичного ретикулула поряд з гіпоксією є ключовими модуляторами пухлинного росту, а хронічна активація сигнальних шляхів стресу ER сприяє виживанню та проліферації онкоклетин, зокрема гліомних.

Сенсорно-сигнальний шлях ендоплазматичного ретикулула ERN/IRE1 є важливим активатором клітинної відповіді на стрес, а за умови блокади IRE1-опосередкованого сигнального шляху відбувається пригнічення процесів проліферації в результаті метаболічного репрограмування в клітинах гліоми. Тому дослідження міжгенних взаємодій в клітинах гліоми є вкрай важливим для розуміння анти-проліферативних ефектів пригнічення IRE1.

Плейтропний ензим NAMPT (фосфорибозилтрансфераза нікотинаміду) є ключовим фактором стабільності геному, експресія якого відіграє критичну роль у процесах метаболізму та проліферації. Внутрішньоклітинний NAMPT лімітує синтез NAD, важливого регулятора енергетичного обміну. Гіперекспресія NAMPT спостерігається в багатьох типах пухлин, а пригнічення його активності знижує проліферацію, міграцію, інвазію та сприяє апоптозу клітин. Оскільки NAMPT є одним з ключових регуляторів метаболізму та посилює проліферативні процеси, дослідження механізмів міжгенних взаємодій, зокрема через IRE1 сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума є важливим для розкриття механізмів пухлинного росту.

В даній роботі досліджувалась експресія пухлинозалежних генів, дерегуляція яких спостерігається при злоякісній трансформації, а їх протеїни пов'язані з процесами проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування. Вивчення експресії даних генів за умов пригнічення IRE1, а також NAMPT є надзвичайно актуальним для розуміння механізмів антипухлинного росту в гліомах.

Метою дисертаційної роботи було виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом дослідження експресії генів за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1, а також сайленсінгу мРНК NAMPT.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні завдання: 1) вивчити рівень експресії генів функціонально різних протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1; 2) дослідити рівень експресії мРНК та протеїну NAMPT за умов повного та часткового пригнічення функції IRE1; 3) визначити рівень експресії генів, що кодують пухлинозалежні протеїни за умови сайленсінгу мРНК NAMPT; 4) дослідити вплив гіпоксії на рівень експресії генів у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1; 5) визначити рівень експресії генів у клітинах гліоми за

дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1.

Дослідження рівня експресії мРНК генів протеїнів, що контролюють процеси проліферації, апоптозу, виживання, ангіогенезу та міграції, а також мікроРНК, здійснювали у клітинах гліоми лінії U87 за різних експериментальних умов методами кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази або лише ендорибонуклеази сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1 спостерігається різке зниження рівня експресії мРНК про-проліферативного гена *NAMPT* у порівнянні з контрольними клітинами, що свідчить про опосередкованість цих змін саме ендорибонуклеазою IRE1.

Виявлено, що пригнічення IRE1 підвищує експресію *miR-182*, сайти зв'язування з якою були виявлені на 3'-кінцевій нетранслюючій послідовності мРНК *NAMPT*. Таким чином, було показано, що IRE1-залежна регуляція експресії мРНК *NAMPT* може відбуватись на пост-транскрипційному рівні за рахунок підвищення активності мікроРНК *miR-182*.

Встановлено, що пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1 впливає на експресію більшості генів, пов'язаних з процесами проліферації, виживання та міграції у клітинах гліоми лінії U87, а за сайленсінгу мРНК *NAMPT* зафіксовані протилежно спрямовані зміни експресії генів. Так показано, що у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1 знижується експресія онкогенів *ATF6*, *BIRC5*, *GLO1*, *RAB5C*, *COL6A1* і *TGM2* тоді як за умов пригнічення *NAMPT* рівень експресії генів *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2* підвищується. Продемонстровано зниження експресії *ATF3* та *DEK* за умов пригнічення мРНК *NAMPT* та блокади функціональної активності IRE1, що свідчить про можливу причетність їх до активації антипроліферативних механізмів в клітинах гліоми.

Продемонстровано, що сайленсінг мРНК NAMPT підвищує рівень експресії генів *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* і *IRS1* та знижується рівень експресії мРНК *Ki-67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3* та *PER2*. Зниження рівня експресії маркера проліферації *Ki-67* та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) за даних умов свідчить про послаблення проліферативного потенціалу клітин гліоми.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором пухлинного росту.

Виявлено, що блокада активності IRE1 модифікує вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії більшості досліджених генів, що є одним з механізмів IRE-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

Отримані нами дані демонструють дерегуляцію більшості онкогенів після сайленсінгу *NAMPT* та складність міжгенних взаємодій в умовах порушення функціональної цілісності в гліомах. Результати роботи мають практичне значення, оскільки є важливими для оцінки і прогнозування наслідків таргетної терапії з урахуванням побічних ефектів, а також ідентифікації потенційних мішеней для подальших досліджень та створення нових підходів боротьби з цим захворюванням.

Ключові слова: гліома, експресія генів, пригнічення IRE1, сайленсінг NAMPT, стрес ендоплазматичного ретикулума, репрограмування геному, гіпоксія, дефіцит глутаміну.

ANNOTATION

Luzina O.Y. Role of IRE1 on the expression of NAMPT and related proteins in U87 glioma cells. Dissertation for the degree of doctor of philosophy, speciality 091 - "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The main research topic of the dissertation was to study molecular mechanisms of interactions at the level of gene expression in different types of tumors in order to improve and create new strategies to struggle against this disease.

Glioma is one of the most malignant of all brain tumors, characterized by rapid growth and difficult treatment. Currently, the scientific community is looking for potential target proteins for the purpose of their combined use in the treatment of tumors.

Malignant transformations are accompanied by metabolic reprogramming of cells for adaptation to hypoxia and nutrient deficiencies, as well as to support proliferation processes. The activation of a network of signaling pathways in tumor cells provides survival and protection against stressors and leads to enhancing angiogenesis and proliferation.

Endoplasmic reticulum (ER) stress, as well as hypoxia, are key modulators of tumor growth, and constitutive activation of ER signaling pathways promotes the survival and proliferation of cancer cells, particularly in glioma. ERN1/ IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress is a central mediator of the unfolded protein response and inhibition of this signaling pathway leads to a suppression of glioma growth through down-regulation of proliferation processes as a result of metabolic reprogramming of cancer cells. The study of interactions on the level of gene expression is very important for understanding the anti-proliferative mechanisms provided by inhibition of IRE1 in glioma cells.

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is a pleiotropic protein and an important factor of genome stability, and its expression plays a critical role in the processes of metabolism and proliferation and promotes the survival of tumor cells. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) catalyzes the first rate-limiting step in converting nicotinamide to NAD, a key regulator of energy metabolism. Many studies suggest that hyperexpression of NAMPT increases the growth and survival of cancer cells and its knockdown leads to an anti-tumor effect. The ability of NAMPT to reprogram the total metabolism and controlling proliferation and survival in a different type of cell, especially in glioma, make it

necessary to study mechanisms of reprogramming of gene expression under the suppression of NAMPT, as well as its interaction with IRE1 signaling pathway.

Therefore, the study of the expression of genes, whose products control the processes of proliferation, apoptosis, survival, angiogenesis, and migration in tumor cells under inhibition of IRE1 and NAMPT is actual for the discovery of the mechanisms of tumor growth of gliomas.

The current study aimed to investigate intergenic interactions in glioma cells by studying gene expression under conditions of silencing mRNA NAMPT and inhibition of the IRE1 signaling protein.

To achieve this goal, it was necessary to perform the following tasks: 1) to investigate the level of expression of genes encoding functionally different proteins in U87 glioma cells with full inhibition of IRE1; 2) to study the level of mRNA and NAMPT protein expression under conditions of complete and partial inhibition of IRE1 functional activity; 3) to investigate the effect of NAMPT silencing on the expression of genes encoding some other proliferation-related proteins in U87 glioma cells. 4) to evaluate the effect of hypoxia on the expression level of genes in glioma cells, depending on the functional activity of the signaling protein IRE1; 5) to study the expression level of genes in glioma cells under glutamine deprivation, depending on the function of the signaling protein IRE1.

The expression level of mRNA genes encoding proteins related to proliferation, apoptosis, survival, angiogenesis, and migration, as well as miRNAs, was measured by quantitative polymerase chain reaction methods in U87 glioma cells by inhibition of IRE1 functional activity.

For the first time it was shown that in U87 glioma cells with inhibited protein kinase and endoribonuclease activity or only endoribonuclease of IRE1, there is a decrease in the level of expression mRNA and protein of the pro-proliferative NAMPT in comparison with the control cells, indicating that these changes are mediated by endoribonuclease IRE1.

Moreover, we found binding sites for miR-182 miRNAs on 3'-untranslated regions of NAMPT mRNA, and the level of this miR-182 increases under conditions

of IRE1 inhibition. Thus, IRE-dependent regulation expression of mRNA NAMPT can be performed at the post-transcriptional level by increasing miR-182 miRNA activity.

It was shown that inhibition of the functional activity of IRE1 affects the expression of the most studied genes in U87 glioma cells, and silencing of NAMPT leads to opposite changes in mRNA expression.

Thus, it was found that inhibition of IRE1 leads to a decrease of the expression of oncogenes *ATF6*, *BIRC5*, *GLO1*, *RAB5C*, *COL6A1*, and *TGM2*, but the silencing of mRNA NAMPT up-regulate the expression of genes *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2*. It was demonstrated that silencing of NAMPT mRNA, as well as a blockade of functional activity of IRE1 down, regulates the expression of *ATF3* and *DEK*, suggesting their possible involvement in the activation of antiproliferative mechanisms in glioma cells.

It has been shown, that silencing mRNA *NAMPT* increases the expression of *BIRC5*, *RAB5C*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3*, and *IRS1*, as well as reduces expression of *Ki-67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3*, and *PER2*. Decreasing expression of the proliferation marker *Ki-67* and *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) indicates a weakening of the proliferative potential of glioma cells.

It has been shown that inhibition of IRE1 differentially modifies the effect of hypoxia, an important tumor growth factor, on the expression level of most studied genes.

It was demonstrated that glutamine deprivation affected the expression of most studied genes in IRE1 dependent manner and that these changes possibly contributed to the suppression of glioma growth from cells without IRE1 signaling enzyme function.

Dysregulation of most of the studied genes in glioma cells after silencing of NAMPT may be reflected by a complex of intergenic interactions in the conditions of metabolic changes in gliomas. This study provides unique insights into the molecular mechanisms of genome reprogramming in IRE1 and NAMPT knockdown glioma cells, are important for assessing and predicting the effects of targeted

therapy, and allow the identification of potential targets for further research and the creation of new approaches to combating the disease.

Keywords: glioma, gene expression, IRE1 inhibition, silencing of NAMPT, endoplasmic reticulum stress, hypoxia, glutamine deprivation.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Minchenko D.O., Tsymbal D.O., **Luzina O.Y.**, Riabovol O.O., Danilovskyi SV, Minchenko O.H. Silencing of NAMPT leads to up-regulation of insulin receptor substrate 1 gene expression in U87 glioma cells. *Endocr. Reg.*, 2020, 54 (1): 31-42. doi: 10.2478/enr-2020-0005. *Scopus*
2. Minchenko O.H., Kharkova A.P., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Kryvdiuk I.V., Kuznetsova A.Y. ERN1 modifies effect of glutamine deprivation on tumor growth related factors expression in U87 glioma cells. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90 (3): 49-61. doi.org/10.15407/ubj90.03.049. *Scopus*
3. Kharkova A.P., Garmash Y.A., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Danilovsky S.V., Kuznetsova A.Y., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on DEK, TPD52, BRCA1, ADGRE5, LIF, GNPDA1, and COL6A1 gene expressions in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Biotechnol. Acta*, 2017, 10(6): 19-27. doi: 10.15407/biotech10.06.019.
4. Minchenko O.H., **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Minchenko D.O., Garmash I.A., Ratushna O.O. Expression of tumor growth related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia. *Ukr. Biochem. J.*, 2017, 89 (5): 40-51. doi.org/10.15407/ubj89.05.040. *Scopus*
5. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., **Luzina O.Y.**, Garmash I.A., Minchenko O.H. Effect of hypoxia on the expression of subset proliferation related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. *Adv. Biol. Chem.*, 2017, 7: 195-210. doi: 10.4236/abc.2017.76014
6. Ratushna O.O., Minchenko D.O., Riabovol O.O., **Luzina O.Y.**, Minchenko O.H. Endoplasmic reticulum stress as a key factor of genome reprogramming in cancer cells. International VACTRAIN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases. Karolinska Institutet, Department of Microbiology,

Tumor and Cell Biology (MTC), Stockholm, January 16-17, 2017. Stockholm, Sweden, 2017, 5.

7. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Halkin O.V., Karbovskyi L.L. Hypoxic regulation of the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. Joint Meeting 25th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” & 2nd Conference of Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June 2017, Kyiv. Ukr. Biochem. J., 2017, 89(3): 87.

8. **Luzina O.**, Minchenko D., Hnatiuk O., Riabovol O., Garmash I. Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of proliferation related genes. Integrative Biology & Medicine, October 2-7, 2017, Kyiv, 2017: 47.

9. Мінченко О.Г., Ратушна О.О., Рябовол О.О., Мінченко Д.О., **Лузіна О.Я.** Молекулярні основи репрограмування метаболізму за онкологічних та метаболічних захворювань. 4-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, 5-6 жовтня 2017 року, Дніпро, 2017: 70-72.

10. **Luzina O.Y.**, Hnatiuk O.S., Garmash Y.A., Kharkova A.P. Effect of glutamine deprivation on the expression of *DEK*, *TPD52*, *BRCA1*, *ADGRE5*, *LIF*, *GNPDA1*, and *COL6A1* genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. Young scientists conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology - 2018”, May 23-25, Kyiv. Ukr. Biochem. J., 2018; 90(3): 124.

11. Hnatiuk O., **Luzina O.**, Minchenko D., Garmash I., Minchenko O. IRE1 inhibition modifies the expression of tumor growth related genes in glioma cells. Materials of symposium and summer school “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”. May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine. Experimental Oncology, 2018, 40(2): Conference Reports: 13.

12. **Luzina O.Y.**, Minchenko D.O., Hnatiuk O.S., Kuznetsova A.Y. Hypoxic regulation of endoplasmic reticulum stress responsive gene expressions in IRE1 knockdown glioma cells. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference – Young

Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, Kyiv, 2018: Ukr. Biochem. J. 2018, 90 (Special Issue): 136.

13. **Luzina O.Y.**, Tsybal D.O., Minchenko D.O., Lebid-Biletska K.M. The effect of IRE1 knockdown and silencing of NAMPT on the expression of a subset of proliferation related genes in U87 glioma cells. Young scientists conference: Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 21-22 March, 2019, Kyiv, Ukraine. Ukr. Biochem. J., 2019, 91(2): 84.

14. **Лузіна О.Я.**, Цимбал Д.О., Мінченко Д.О., Лагановська Ю.О., Мінченко О.Г. IRE1-залежний характер гіпоксичної регуляції експресії пропроліферативних генів у клітинах гліоми. 12-й Укр. біохім. конгрес, 2019. Медична та клінічна хімія, 2019, 21(3, додаток): 111-112.

15. Sliusar M.Y., Minchenko D.O., **Luzina O.Y.**, Khita O.O., Minchenko O.H. Molecular mechanisms of interaction of hypoxia with *endoplasmic reticulum stress signaling pathways*. The 5th Int. Sci. Conf. “Current Problems Biochem., Cell Biol. Physiol”, Dnipro, 1-2 October, 2020: 39-40.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ | 15 |
| ВСТУП | 17 |
| РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ | 24 |
| 1.1 Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у рості злоякісних пухлин.. | 24 |
| 1.2 Значення NAMPT у регуляції процесів проліферації в пухлинах | 28 |
| 1.3 Роль генів, що контролюють процеси проліферації, міграції та виживання в пухлинних клітинах. | 33 |
| 1.4 Значення гіпоксії в рості злоякісних пухлин і регуляція експресії генів за гіпоксії | 41 |
| 1.5 Значення метаболізму глутаміну та глюкози у контролі процесів проліферації у пухлинних клітинах..... | 44 |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 48 |
| 2.1. Матеріали та умови проведення експериментів | 48 |
| 2.2. Реактиви та обладнання | 50 |
| 2.3. Методи досліджень..... | 51 |
| 2.3.1. Виділення РНК з культури клітин і синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК | 51 |
| 2.3.2. Вивчення експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі..... | 52 |
| 2.3.3. Ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції | 58 |
| 2.3.4. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі | 59 |

| | |
|--|------------|
| | 13 |
| 2.3.5. Вестерн-блот аналіз протеїнів | 59 |
| 2.3.6. Зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT шляхом РНК-інтерференції | 61 |
| 2.4. Статистична обробка результатів | 61 |
| РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ | 62 |
| 3.1. Експресія генів, продукти яких контролюють процеси проліферації, виживання та міграції у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сигнального протеїну IRE1 та зниження рівня мРНК NAMPT | 62 |
| 3.2. Експресія асоційованих із пухлинним ростом генів за умов сайленсінгу мРНК NAMPT | 78 |
| 3.3. Вплив гіпоксії на експресію генів, задіяних у контролі проліферативних процесів, у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності IRE1 | 84 |
| 3.4. Експресія функціонально різних генів, що причетні до росту пухлин, за умови дефіциту глутаміну у клітинах гліоми в залежності від активності сигнального протеїну IRE1 | 96 |
| РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ | 109 |
| 4.1. Роль IRE1 та NAMPT в регуляції експресії генів, що контролюють процеси проліферації, виживання та міграції пухлинних клітин | 111 |
| 4.2. Зміни рівня експресії пухлинозалежних генів за умови сайленсінгу мРНК NAMPT | 117 |
| 4.3. IRE1-залежні механізми регуляції експресії генів за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну | 121 |
| 4.4. Взаємодія NAMPT із сигнальним протеїном IRE1 у процесах регуляції експресії генів | 125 |

| | |
|--|------------|
| | 14 |
| ВИСНОВКИ | 128 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ | 130 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- ADGRE5 – (adhesion G protein-coupled Receptor E5), адгезивний рецептор E5, спряжений з G-протеїном;
- ATF3 – (activating transcription factor 3), активуючий транскрипційний фактор 3;
- ATF6 – (activating transcription factor 6), активуючий транскрипційний фактор 6;
- BCL2L1 – (BCL2-like 1), BCL2 подібний 1 протеїн;
- Bcl-2 – (B-cell lymphoma 2), B-клітинна лімфома 2;
- BIRC5 – (survivin, baculoviral IAP repeat-containing 5), сурвівін;
- BRCA1 – (breast cancer 1, early onset), протеїн пухлини молочної залози 1;
- CD24 – (CD24 antigen), антиген CD24;
- CHOP – (C/EBP homologous protein), протеїн гомологічний C/EBP;
- COL6A1 – (collagen, type VI, alpha 1), колаген 6 типу, 1 альфа;
- DEK – (DEK proto-oncogene), протоонкоген DEK;
- E2F8 – (E2F transcription factor 8), транскрипційний фактор 8 групи E2F;
- ECM – (extracellular matrix), позаклітинний матрикс;
- ERAD – (ER-associated protein degradation), ER-асоційована деградація протеїнів;
- GADD34 – (growth arrest and DNA-damage-inducible 34), індукований арештом росту та пошкодженням ДНК 34;
- GLO1 – (glyoxalase 1), гліоксилаза 1;
- GNPDA1 – (glucosamine-6-phosphate deaminase 1), деаміназа 1 глюкозамінфосфату;
- HIF – (hypoxia inducible factor), фактор, що індукується гіпоксією;
- HOMER3 – (Homer scaffold protein 3), скафолд протеїн Гомер;
- HSPB8 – (heat shock protein B8), білок теплового шоку B8;
- IGFBP3 – (insulin-like growth factor binding protein 3), протеїн 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту;
- IRE1/ERN1 – (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), ензим, залежний від інозитолзалежний 1 / сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1;

Myс – (myelocytomatosis viral oncogene homolog), гомолог вірусного онкогена мієлоцитоматозу;

NAD – (nicotinamide adenine dinucleotide), нікотинамідаденіндинуклеотид;

NAM – (nicotinamide), нікотинамід;

NAMPT – (nicotinamide phosphoribosyltransferase), фософрибозилтрансфераза нікотинаміду;

NMN – (nicotinamide mononucleotide), нікотин мононуклеотид;

NFκB – (nuclear factor-κB), ядерний фактор κB;

P53 – (tumor protein p53), пухлинний протеїн p53;

PERK – (PRK-like endoplasmic reticulum kinase), PRK-подібна кінза ендоплазматичного ретикулума;

PTEN – (phosphatase and tensin homolog), гомолог фосфатази і тензину;

RAB5C – (member RAS oncogene family), член родини онкогена RAS;

Ras – (rat sarcoma viral oncogene), вірусний онкоген саркоми щурів;

RIDD – (regulated IRE1-dependent decay), IRE1-залежна деградація;

TGM2 – (transglutaminase 2), трансглутаміназа 2;

VEGF – (vascular endothelial growth factor), ендотеліальний фактор росту судин;

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

UPR – (unfolded protein response), реакція на незгорнуті протеїни

ВСТУП

Актуальність теми. Дослідження молекулярних механізмів патогенезу пухлин на генному рівні є важливими для створення нових стратегій антипухлинної терапії. IRE1 сенсорно-сигнальний шлях ендоплазматичного ретикулума є потужним молекулярним перемикачем та регулятором виживання, проліферації та апоптозу клітин як в нормі, так і за патологій. Відомо, що IRE1-залежна активація сигнальних каскадів сприяє адаптації та виживанню пухлинних клітин в екстремальних умовах мікрооточення [1]. На сьогодні ведеться пошук потенційних генів мішеней, що відіграють важливу роль у IRE1-залежній регуляції проліферації пухлинних клітин.

Гліоми – найпоширеніші злоякісні новоутворення центральної нервової системи, що походять від нейроепітеліальних стовбурових клітин головного мозку [2]. Стандартне лікування включає резекцію пухлини в поєднанні з променевою та хемотерапією, а також введення протипухлинних препаратів (Temozolomide, Bevacizumab). Швидкі темпи проліферації та активна інфільтрація клітин гліоми в оточуюче середовище вкрай ускладнюють лікування даного захворювання та робить терапію малоефективною [3]. Середня тривалість життя пацієнтів з гліомами важкого ступеня складає 12-15 місяців з моменту встановлення діагнозу [4]. Глибше розуміння молекулярних механізмів патогенезу цих пухлин є надзвичайно важливе для виявлення побічних ефектів таргетної терапії, підвищення ефективності лікування, а також розробки нових стратегій протипухлинної терапії.

Злоякісна трансформація супроводжується репрограмуванням тотального метаболізму клітини та перебуває під впливом стресових чинників, таких як гіпоксія, оксидативний стрес, дефіцит поживних речовин, порушення обміну кальцію, надмірне навантаження метаболізму, пошкодження геному. При цьому відбувається збій процесів посттрансляційної модифікації та фолдингу протеїнів [5, 6]. Ендоплазматичний ретикулум є спеціалізованою органелою, що здійснює контроль якості протеому та миттєво реагує на зміни

клітинного гомеостазу. Саме в люмені ендоплазматичного ретикулула накопичуються не згорнуті та неправильно згорнуті протеїни, що спричинює стрес ER. З метою відновлення протеостазу в клітині запускається інтегрована мережа адаптивних внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни» [7].

Сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулула як в нормі, так і за патологій визначають долю клітини та є своєрідним важелем між процесами виживання та апоптозу. В умовах стресу ER відбувається активація транскрипційних факторів, таких як XBP1, ATF4 та ATF6, що сприяє росту пухлини та підвищенню резистентності до терапії за рахунок активації процесів виживання [1,8]. IRE1/ERN (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1) є найбільш консервативним сенсорно-сигнальним протеїном, що активується у відповідь на стрес. Трансдукція сигналу по IRE1-залежному каскаду сприяє як виживанню клітин, проте може ініціювати апоптичну відповідь в процесі IRE1-опосередкованої деградації антиапоптотичних міРНК [8]. Відомо, що хронічна активація шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула є облігатним фактором виживання онкоклетин, зокрема й клітин гліоми. Раніше на моделі ембріонів курчат було показано, що в клітинах гліоми U87 з блокадою кіназної та ендорибонуклеазної функціональної активності IRE1 спостерігаються виражені протипухлинні ефекти та блокада неоваскуляризації [1]. Крім того, продемонстровано зниження проліферації клітин гліоми за умови пригнічення IRE1-опосередкованого сигнального шляху [9]. Проте молекулярні механізми IRE1-залежного пригнічення росту пухлин до кінця не з'ясовані і потребують детального вивчення. На сьогодні ведеться активний пошук потенційних генів - мішеней для ефективного лікування канцерогенезу.

Плейтропний ензим NAMPT (фосфорибозилтрансфераза нікотинаміду) являється фактором стабільності геному та відіграє важливу роль у процесах метаболізму, репарації, проліферації та апоптозу [10,11]. Внутрішньоклітинний NAMPT лімітує синтез NAD, важливого регулятора

енергетичного обміну, модулятора інвазії в пухлинних клітинах, зокрема й в гліомних [12]. Гіперекспресія NAMPT спостерігається в багатьох типах пухлин, а пригнічення його активності знижує проліферацію, міграцію та інвазію, а також має проапоптичний ефект. Більше того, в ході численних досліджень показано, що NAMPT посилює ріст і виживання злоякісних пухлин, а фармакологічне пригнічення цього ензиму чинить антипухлинну дію [13,14]. Внаслідок пошкодження ДНК в пухлинних клітинах активується ряд NAD-залежних протеїнів (сіртуїни, PARP) з метою відновлення структури ДНК та запобігання апоптозу. Останні дослідження виявили, що NAMPT утворює стабільний комплекс з гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназою (GAPDH) та транслокується в ядро для підтримки стрес-індукованого шляху реутилізації NMN/NAD [15]. В ядрі NAMPT забезпечує оперативне поповнення пулу NAD, що активно споживається NAD-залежними ензимами, тим самим підтримує клітинний гомеостаз та сприяє виживанню злоякісних клітин [16].

В позаклітинному просторі NAMPT функціонує в якості цитокіна де проявляє гемопоетичну, імуномодулюючу, прозапальну, проангіогенну, гемотоксичну та антиапоптичну активність. Позаклітинна форма NAMPT, відома також як адипокін вісфатин, характеризується гормоноподібними властивостями та імітує дію інсуліну [17]. Висока токсичність інгібіторів NAMPT, таких як FK866, CHS-828 і GMX-1777 робить актуальними дослідження його ролі у репрограмуванні геному та механізмів взаємодії на генному рівні з різними сигнальними системами з метою пом'якшення побічних ефектів таргетної терапії та підвищення ефективності антипухлинної терапії [16].

Мета і завдання роботи. Метою дисертаційної роботи було виявлення міжгенних взаємодій у клітинах гліоми шляхом дослідження експресії генів за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1, а також сайленсінгу мРНК NAMPT.

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні завдання:

1. Дослідити рівень експресії мРНК та протеїну NAMPT за умов повного та часткового пригнічення функції IRE1.
2. Визначити рівень експресії генів, що кодують пухлино-залежні протеїни за умови сайленсінгу мРНК NAMPT.
3. Вивчити рівень експресії генів *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A* та *ATF3* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1.
4. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії генів у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності сигнального протеїну IRE1.
5. Дослідити рівень експресії досліджених генів у клітинах гліоми за дефіциту глутаміну залежно від функції сигнального протеїну IRE1.

Об'єкт дослідження: експресія генів *NAMPT*, *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BRCA1*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A*, *ATF3*, *Ki-67*, *PCNA*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *LIF*, *CLU*, *IGFBP3*, *IRS1*, *BNIP3*, *PER2*, *GADD45A*, *HK2*, *HOMER3*, *ADGRE5* та *GNPDA1*.

Предмет дослідження: рівень експресії генів, що контролюють процеси проліферації у клітинах гліоми лінії U87 за умов повного пригнічення функціональної активності IRE1, за умови зниження рівня мРНК і протеїну NAMPT за допомогою siRNA технології.

Методи дослідження: у даній роботі використовували методи культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричне визначення концентрації і спектральних характеристик нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної, вестерн-блот аналіз протеїнів (отримання цитозольних фракцій протеїнів з культури клітин, визначення концентрації протеїнів, електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному гелі, протеїнів у поліакриламідному гелі, імуноблотинг), сайленсінг мРНК, методи статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю протеїнкінази та ендорибонуклеази або лише ендорибонуклеази сенсорно-сигнального протеїну IRE1 спостерігається різке зниження рівня експресії про-проліферативного гена *NAMPT* у порівнянні з контрольними клітинами, що свідчить про опосередкованість цих змін саме ендорибонуклеазою IRE1.

Виявлено, що пригнічення IRE1 підвищує експресію *miR-182*, сайти зв'язування з якою були виявлені на 3'-кінцевій нетранслюючій послідовності мРНК *NAMPT*. Таким чином, IRE-залежна регуляція експресії мРНК *NAMPT* може здійснюватись на пост-транскрипційному рівні за рахунок активації мікроРНК *miR-182*.

Встановлено, що пригнічення функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE1 впливає на експресію більшості досліджених генів у клітинах гліоми лінії U87, а за сайленсінгу мРНК *NAMPT* зафіксовані протилежно спрямовані зміни експресії мРНК даних генів. Так показано, що у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1 знижується експресія онкогенів *ATF6*, *BIRC5*, *GLO1*, *RAB5C*, *COL6A1* і *TGM2* тоді як за умов пригнічення *NAMPT* рівень експресії генів *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2* підвищується. Продемонстровано зниження експресії *ATF3* та *DEK* за умов пригнічення мРНК *NAMPT* та блокади функціональної активності IRE1, що свідчить про можливу причетність їх до активації антипроліферативних механізмів в клітинах гліоми.

Виявлено, що сайленсінг мРНК *NAMPT* підвищує рівень експресії генів *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* і *IRS1* та знижується рівень експресії мРНК *Ki-67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3* та *PER2*. Зниження рівня експресії маркера проліферації *Ki-67* та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) за даних умов свідчить про послаблення проліферативного потенціалу клітин гліоми.

Показано, що пригнічення функціональної активності IRE1 по-різному модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до умов гіпоксії, а це є важливим фактором пухлинного росту.

Виявлено, що блокада активності IRE1 модифікує вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії більшості досліджених генів, що є одним з механізмів IRE-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

Практичне значення отриманих результатів полягає у з'ясуванні ролі сенсорно-сигнального протеїну IRE1 та протеїну NAMPT у репрограмуванні геному клітин гліоми, а також регуляції експресії пухлино-залежних генів, що кодують протеїни причетні до проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування.

Розуміння механізмів регуляції експресії генів в процесі репрограмування геному за умов зміни рівня експресії NAMPT чи активності IRE1 є важливими для оцінки та прогнозування побічних ефектів таргетної терапії, а також поліпшення ефективності лікування гліом.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2016 – 2020 р.р. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження з вивчення експресії пухлино-залежних генів за умов інгібування функціональної активності сенсорно-сигнального протеїну IRE/ERN1 та сайленсінгу мРНК NAMPT, а також за гіпоксії і нестачі глутаміну у клітинах гліоми U87. Також виконано статистичний аналіз отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню експресії певних генів проводились за участі наукових співробітників Мінченка Д. О., Цимбал Д.О., та Хіта О. О.; планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., член-кор. НАН України Мінченка О. Г.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2016–2020 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Роль стресу

ендоплазматичного ретикулума у функціональній перебудові геному і пошук генів-мішеней для пригнічення росту гліом», № ДР 0116U001027 (2016–2020 рр.) та „Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів”, № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на вітчизняних та міжнародних конгресах та конференціях: International V ASTRAN/3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, 2017; Joint meeting of the 25th annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» & 2nd conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017; Integrative Biology & Medicine, Kyiv, 2017; Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології”, Дніпро, 2017; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2018», Kyiv, 2018; Materials of symposium and summer school “Fundamental Principles of Cancer Biotherapy”, Kyiv, 2018, XI Parnas Conference – Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine», Kyiv, 2018; Young scientists conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019», Kyiv, 2019, 12-ий Український Біохімічний конгрес, Тернопіль, 2019, та «Current Problems biochemistry, cell biology and physiology», Dnipro, 2020.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 робіт, із них 5 статей в іноземних та українських фахових наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, і 10 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конгресах і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 129 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, анотації, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 228 посилань. Робота містить 50 рисунків та 3 таблиці.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у рості злоякісних пухлин

Ендоплазматичний ретикулум – це поліфункціональна органела, де синтезується третина протеому клітини та здійснюються процеси згортання та дозрівання протеїнів [7].

Такі стресові чинники, як дефіцит поживних речовин, порушення обміну кальцію, процесів глікозилування, оксидативний стрес, пошкодження ДНК та енергетичний дисбаланс, посилений синтез секреторних протеїнів змінюють протеостаз та активують мережу внутрішньоклітинних сигнальних каскадів [18]. В люмені ЕР відбувається контроль якості протеїнів, де правильно згорнуті експортуються, а неправильно і не згорнуті протеїни зазнають убіквітин-залежної протеолітичної деградації — ERAD [19]. Для протидії накопиченню протеїнів з помилковою конформацією в клітинах еукаріот існує комплекс сенсорно-сигнальних шляхів, що йдуть від ЕР до цитозолу та ядра. Реакція сенсорно-сигнальних шляхів ЕР на накопичення не згорнутих чи не правильно згорнутих протеїнів отримала назву (unfolded protein response), а такий стан клітини — “стресу ендоплазматичного ретикулуму”. Стрес ЕР реалізується трьома сенсорно-сигнальними шляхами: protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), inositol-requiring enzyme-1 (IRE1) та activating transcription factor-6 (ATF6). Індукція стресу ЕР приводить до загального зниження ініціації трансляції з метою знаття навантаження на клітину та вибірковою трансляцією мРНК що кодують стрес-залежні протеїни [20, 21].

В неактивному стані сенсорно-сигнальні протеїни ЕР асоційовані з BiP (binding immunoglobulin protein), також відомий як GRP78 (78 кДа) / 70 kDa протеїн 5 теплового шоку (HSPA5), який виконує роль негативного регулятора. При накопиченні протеїнів з помилковою конформацією

відбувається дисоціація GRP78 та активація сигнальних шляхів стресу [22]. Слід зазначити, що гіперекспресія GRP78 корелюється з високим ступенем важкості захворювання, підвищеною частотою рецидивів та скороченням тривалості життя у пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями [23].

Активація PERK призводить до аутофосфорилування, фосфорилування фактору ініціації трансляції eIF2 α , що результується в послабленні загальної трансляції та протеомного навантаження на ER [24]. Фосфорильована форма EIF2A посилює синтез транскрипційного фактору ATF4, який відіграє важливу роль в регуляції багатьох процесів та активує експресію генів, причетних до фолдингу, антиоксидантних механізмів, аутофагії, метаболізму амінокислот та апоптозу [25,26]. Більше того, активація ATF4 відіграє важливу роль для росту злоякісних пухлин і резистентності до гіпоксії [24, 27]. Відомо, що ATF4 активує транскрипційний фактор CHOP, регулятор проапоптичної відповіді. Інший шлях ATF4-опосередкованої регуляції апоптозу полягає в активації фосфорилування онкосупресора TP53 та індукції експресії оксидази ERO1 α . Даний ензим за умови пролонгованого стресу в люмені ER індукує накопичення активних форми кисню (ROS), що веде до апоптичного сценарію в результаті оксидативного стресу [28]. З іншого боку, CHOP бере участь у відновленні гомеостазу, оскільки стимулює експресію ще одного представника PERK-сигнального каскаду GADD34 [29,30]. GADD34 являє собою регуляторну (інгібіторну) субодиницю 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A) і дефосфорилує альфа субодиницю фактора ініціації трансляції EIF2A, тим самим опосередковує зняття транскрипційної репресії та вихід клітини зі стану стресу [31,32].

ATF6 сигнальний шлях стресу ER представлений трансмембранним попередником транскрипційного фактору ATF6, який функціонує в двох ізоформах ATF6 α та ATF6 β . ATF6 α містить в цитозольному домені транскрипційний фактор bZIP, який за умови стресу ER транслокується до Апарату Гольджі, де піддається обмеженому протеолізу з відщепленням

трансмембранного домену [33]. Розчинна форма ATF6 α bZIP в подальшому активує експресію низки стрес-залежних генів, зокрема генів ERAD[7].

IRE1 є еволюційно найбільш консервативною та головною сенсорно-сигнальною системою стресу ER [34]. Активація IRE1 – XBP1 шляху пов'язана з багатьма фізіологічними та патологічними процесами, такими як ERAD, секрецією протеїнів, синтезом ліпідів та жирних кислот [35, 36]. Даний сигнальний шлях представлений біфункціональним трансмембранним протеїном, який має сенсорний домен, локалізований в люмені ER, а також трансмембранний домен і цитоплазматичну частину з двома ензиматичними активностями: серин/треонінової протеїнкінази та ендорибонуклеази. За індукції стресу ER відбувається дисоціація IRE1 від шаперону GRP78/BIP та активація протеїнкіназної субодиниці, що приводить до аутофосфорилування ензиму кіназним доменом, в результаті чого відбувається ди/олігомеризація IRE1 у мембрані ER [37]. Головна функція ендорибонуклеазного домену IRE1 полягає у вирізанні шляхом альтернативного сплайсингу короткого фрагмента з 26 нуклеотидів з кодуючої послідовності мРНК транскрипційного фактора XBP1 (протеїн-1, що зв'язується з X-боксом). Далі за участю hRtcB лігази відбувається зшивання вкороченого сплайс-варіанту мРНК XBP1 (XBP1s) [38]. Саме альтернативний сплайс-варіант мРНК XBP1s кодує синтез більшого за розміром транскрипційного фактору зі зміненою амінокислотою послідовністю С-кінця внаслідок зсуву рамки зчитування. Далі відбувається транслокація XBP1s в ядро, де ним здійснюється регуляція експресії декількох сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також деградації не правильно згорнутих протеїнів [16]. Відомо, що сплайсинг XBP1 сприяє виживаності клітини за рахунок підвищення регуляції шаперонів ER, компонентів ERAD та транскрипційних факторів, які полегшують навантаження протеїнів на ER [39].

Окрім сплайсингу пре-мРНК XBP1, інша функція РНКазы IRE1 α полягає у розщепленні низки мРНК, що кодують секреторні та ER-асоційовані продукти. Цей процес отримав назву регульованої IRE1-залежної деградації

(RIDD – Regulated IRE1-Dependent Decay). За низьких рівнів стресу активність ендорибонуклеази IRE1 специфічна до певних ділянок мРНК, проте посилення стресу збільшує кількість субстратів даного ензиму, включаючи мРНК, що кудують мембрані протеїни ER [40]. Варто зазначити, що сплайсинг XBP1 та RIDD протікають незалежним чином та по різному визначають долю клітини. Для індукції сплайсингу XBP1 необхідна олігомеризація IRE1 α , тоді як для активації RIDD передумовою є димеризація сенсорного протеїну IRE1 α . Відомо, що індукція IRE1 α – XBP1 гілки сприяє виживанню клітин, тоді як RIDD стимулює апоптоз через активацію проапоптичної протеази та репресію антиапоптотичних пре-міРНК, зокрема анти-CASP2 пре-мікроРНК та CASP2 [41].

Іншим механізмом IRE1-сигнального шляху являється взаємодія IRE1 α з TRAF2 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2), що веде до активації кінази ASK1 та JNK та посиленні проапоптичного сигналювання [42]. Є данні про те, що саме транзйєтна активація JNK (менше 1 год) призводить до стимуляції трансдукції сигналів виживання, тоді як пролонгуюча активація JNK (від 1-6 год) необхідна для ініціації загибелі клітини [43].

Уповільнення загальної трансляції на фоні вибіркового синтезу компонентів стресу є адаптивним механізмом в пухлинах, що сприяє виживанню та призводить до арешту клітинного циклу та зупинки диференціації [44]. Трансдукція сигналів по каскадам стресу ER сприяє адаптації пухлини до несприятливого мікрооточення, зумовленого швидкими темпами проліферації та посиленою васкуляризацією. [45]. Саме IRE1 є ключовим регулятором процесів проліферації, ангиогенезу та інвазії в злоякісних гліомах [1,46]. Так продемонстровано, що виключення функціональних активностей протеїну IRE1 пригнічує ангиогенез у межах пухлини, проте посилює інвазію клітин гліоми [47]. На моделях ембріонів курчат було показано, що в клітинах гліоми блокада функції IRE1/ERN1 пригнічувала ріст онкоклетин за рахунок змін експресії про-ангиогенних та

анти-ангіогенних факторів, пухлинних супресорів і циклінів [1, 48]. Показано, що інгібування ключових факторів ангіогенезу, таких як HIF-1 α , VEGF-A та його рецептора KDR, VE-кадгерину і MMP посилює процеси інвазії в гліомах [45]. Відомо, що пригнічення IRE1, окрім антипроліферативного ефекту, посилює міграційний потенціал клітин гліоми за рахунок підвищення експресії протеїнів позаклітинного матриксу з наступною перебудовою актинового цитоскелету та є адаптивним механізмом пухлинних клітин до змін мікрооточення [48, 49].

Отже, IRE1 сенсорно-сигнальний шлях ER є потужним регулятором пухлинного росту та сприяє проліферації, ангіогенезу, виживанню та формуванню резистентності до терапії.

1.2 Значення NAMPT у регуляції процесів проліферації в пухлинах

NAMPT (нікотинамід фосфорибозилтрансфераза, EC 2.4.2.12) — плейотропний ензим, ключовий регулятор внутрішньоклітинного пулу NAD та загального метаболізму в клітині [50, 51]. NAMPT є стресзалежним протеїном та відіграє важливу роль у процесі злоякісної трансформації. В пухлинах різного типу спостерігається підвищена експресія NAMPT. Відомо, що внутрішньоклітинний iNAMPT надекспресується в мієломі, меланомі, астроцитомі, карциномі яєчників, молочної залози, шлунку, простати, щитоподібної залози та ендометрію, товстої кишки, а також при злоякісних лімфомах. Слід зазначити, що надекспресія iNAMPT корелює з глибшою інвазією пухлини, метастазуванням в лімфатичні вузли, вищою клінічною стадією TNM (Classification of Malignant Tumors) та низькою виживаністю онкохворих [52].

Вперше NAMPT був виявлений як колонізуючий фактор росту та отримав назву PBEF (Pre-B Cell Enhancing Factor, колонієстимулюючий фактор прекурсорів β -клітин) [53]. Подальші дослідження показали, що NAMPT функціонує в якості ензиму в середині клітини (intracellular NAMPT)

та як фактор росту, ензим та цитокін (адипокін вісфатин) в позаклітинному просторі (extracellular NAMPT). Цитокін eNAMPT проявляє гемопоетичну, імуномодулюючу, прозапальну, проангіогенну та антиапоптотичну активність. Позаклітинна форма NAMPT відома також як адипокін вісфатин, що характеризується гормоноподібними властивостями та імітує дію інсуліну [17, 54, 55]. Було показано, що рівень циркуляції адипокіна NAMPT тісно корелює з накопиченням білої жирової тканини, порушенням метаболізму та судинними ускладненнями [56, 57]. Доведено, що eNAMPT координує шляхи, пов'язані з патофізіологією ожиріння, діабету, атеросклерозу і серцево-судинних захворювань. Відомо, що вісфатин синтезується адипоцитами та залучений в регуляції вторинної імунної відповіді [58]. Високий рівень eNAMPT спостерігається при порушеннях обміну речовин та канцерогенезі. Також eNAMPT бере участь в прозапальних процесах, задіяний у апоптозі та оксидативному стресі. Є данні про те, що позаклітинний NAMPT є важливим регулятором метаболізму в пухлинних клітинах, сприяє епітеліально-мезенхімальним переходам та формуванню мікрооточення пухлини [59].

Внутрішньоклітинний NAMPT каталізує реакцію перетворення нікотинаміду (NAM) в нікотинамідмононуклеотид (NMN). NMN являється прекурсором для синтезу нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD), потужного регулятора енергетичного балансу в клітині [60]. Таким чином, iNAMPT лімітує рівень NAD — універсальної енергетичної сигнальної молекули, метаболіта ключових процесів в клітині, який функціонує як кофермент багатьох окисно-відновних реакцій та є субстратом для NAD-залежних ензимів (гістонові деацетилази (SirT1-T7), гідролази CD38, полі(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP), що відіграють важливу роль у підтримці метаболічного гомеостазу та стабільності геному в цілому. [50, 61, 62].

Однією з ознак злоякісного новоутворення є вроджена або набута резистентність до апоптозу [29]. За даними багатьох досліджень, NAMPT посилює ріст та протидіє апоптозу, а фармакологічне пригнічення цього ензиму сповільнює процеси проліферації в пухлинах різного типу [63, 64, 65].

Надекспресії NAMPT індукує сповільнення процесів старіння, підвищення виживаності та стійкості до окисного стресу [66]. При цьому, показано, що регуляція апоптичних процесів в пухлинних клітинах здійснюється іNAMPT за рахунок контролю внутрішньоклітинного пулу NAD та, в свою чергу, активності NAD-залежних ензимів [67, 68]. Відомо, що NAMPT підвищує активність SIRT1 NAD-залежної деацетилази, яка опосередковує деградацію протеїну TP53, супресію p21 та протидіє реплікативному старінню в клітинах [66, 69]. Відомо, що за умови оксидативного, генотоксичного та карбонільного стресу відбувається транслокація іNAMPT в ядро, активація полі(АДФ-рибоза)-полімерази (PARP) та сіртуїнів, що призводить до зростання споживання загального пулу NAD [16]. Надходження іNAMPT в ядро, на думку вчених, необхідне для оперативного поповнення внутрішньоядерних запасів NAD. При цьому виявлено, що зміна специфічної амінокислотної послідовності в структурі NAMPT блокує ядерний транспорт даного ензиму та уповільнює ріст клітини [70]. Нещодавно було показано, що NAMPT утворює стабільний комплекс з ензимом гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназою (GAPDH) та транслокується до ядра для підтримки стрес-індукованого шляху реутилізації NMN/NAD⁺ [15]. Специфічне інгібування транспорту NAMPT в ядро на разі розглядається як потенційний напрямок дослідження, що може бути використаний в антипухлинній терапії [16].

Нещодавно було виявлено один з механізмів регуляції проліферації NAMPT, який пов'язаний з надекспресією SIRT1 та, в свою чергу, з дерегуляцією протоонкоген c-MYC [71]. Варто відмітити, що c-MYC разом із NAMPT та деацетилазою SIRT1 утворюють петлю зворотного зв'язку, що призводить до посилення проліферації та виживаності клітин аденокарциноми шлунку [72, 73]. Ще один шлях NAMPT-опосередкованої індукції проліферації був виявлений в клітинах грудної залози ліній MCF-7 та MDA-MB-231. При цьому NAMPT активує сигнальні шляхи АКТ/PI3K та ERK/MAPK, сприяє підвищенню рівня онкопротеїну з антиапоптичною активністю сурвівіну (BIRC5) [74]. Виявлено, що рівень NAMPT корелює зі

зростанням ступеня важкості пухлини, зокрема астроцитоми різного ступеня. При цьому найбільший рівень експресії NAMPT спостерігається в клітинах гліобластоми [64].

Є дані про те, що позаклітинний eNAMPT в нормі експресується в якості цитокіна ембріональними клітинами, а його рівень істотно зростає при інфікуванні даного типу клітин [75]. Крім того доведено, що рівень eNAMPT значно підвищується при гострих і хронічних запальних процесах [76].

Багатьма дослідженнями показано, що пригнічення ензиму NAMPT специфічними інгібіторами зменшує ріст пухлини, посилює сприятливість до окисного стресу й темозоломідну та індукує апоптоз в клітинних гліобластоми [77–81]. Вченими Hasmann et al. в 2003 році було вперше описано специфічний до NAMPT інгібітор, низькомолекулярну сполуку FK866, що на разі активно використовується в комбінованій антипухлинній терапії [82]. Відомо, що FK866 блокує NAMPT та пригнічує інтенсивність проліферації онкоклетин, знижує рівень NAD та експресію 325 протеїнів, включаючи протеїни залучені до процесів репарації ДНК (PCNA та PARP1) та антиоксидантних механізмів (GRX1), а також дерегулює мітохондріальні рибосомні протеїни [79, 80]. Клінічні дослідження показали, що високі дози інгібіторів NAMPT являються вкрай високотоксичними та викликають тромбоцитопенію, анемію і нейтропенію кісткового мозку [83].

Процес активації апоптозу та істотне пригнічення проліферації було виявлено також у клітинах множинної мієломи RPMI 8226 після сайленсінгу мРНК NAMPT за допомогою специфічної siRNA [84]. Вченими показано, що зменшення експресії мРНК NAMPT, опосередковане активністю miR-206, послаблювало виживання пухлинних клітин молочної залози [85–87].

Репрограмування енергетичного метаболізму являється характерною ознакою зляканої трансформації [88]. При цьому спостерігається інтенсивне споживання глюкози для активації гліколітичних процесів в умовах нормоксії, з метою підтримки швидких темпів проліферації [89]. Коензим нікотинамід аденіндинуклеотид (NAD) опосередковує окисно-відновні реакції низки

метаболічних шляхів, зокрема й при гліколізі. Загальний пул NMN/NAD в цитозолі так і в ядрі клітини знаходиться під контролем ензима NAMPT [15]. Відомо, що внаслідок підвищення рівня NAD відбувається посилення гліколітичних процесів, при цьому пухлинні клітини отримують будівельні блоки у вигляді нуклеотидів, амінокислот, ліпідів і фолієвої кислоти, які далі використовуються для підтримки інтенсивних проліферативних процесів. Багато досліджень демонструють, що модуляція рівня NAD важлива на фазі профілактики, ініціації та прогресування злоякісних новоутворень, та є стратегічним напрямком терапії пухлин [90]. Відомо, що Внутрішньоклітинний NAD є важливим регулятором обміну серину в пухлинних клітинах, оскільки NAD-залежний ензим PHGDH лімітує швидкість біосинтезу даної амінокислоти [91]. Крім того NAD являється субстратом для PARP, сіртуїнів та глікогідролази (CD38 і CD157), тим самим сприяє репарації ДНК, координує експресію генів та реакцію клітини на стрес [90].

Отже, NAMPT відіграє ключову роль в метаболізмі та проліферації пухлин різного типу, проте механізми регуляції пухлинного росту до кінця не розкриті потребують глибокого вивчення. У зв'язку з цим, надзвичайно актуальним є дослідження рівня експресії генів, ключових факторів процесів проліферації, апоптозу, виживання та метастазування *PERK*, *ATF6*, *ATF3*, *BRCA1*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A*, *TGM2*, *Ki-67(MKI67)*, *PCNA*, *LIF*, *TPD52*, *CLU*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *IRS1*, *IGFBP3*, *BNIP3*, *PER2*, *HK2* та *GADD45A* у клітинах гліоми за умов пригнічення рівня мРНК та протеїну NAMPT за допомогою siRNA технологій. Оскільки відомо, що пригнічення функціональної активності IRE1 та інгібування NAMPT чинить антипроліферативний ефект на пухлинні клітини, важливим для нас було порівняти напрямок зміни експресії досліджуваних генів за РНК-інтерференції та за умов пригнічення функції протеїну IRE1, для виявлення особливостей репрограмування геному за умов порушення функціональної цілісності клітини та вивчення механізмів проліферації в клітинах гліоми.

1.3 Роль генів, що контролюють процеси проліферації, міграції та виживання в пухлинних клітинах

Злоякісна трансформація супроводжується набуттям клітинами функціональних особливостей, що надають їм перевагу у селективному рості, неконтрольованій проліферації та уникнення проапоптичного сигналювання. В пухлинних клітинах спостерігається ряд необоротних змін на генному рівні, а саме: точкові мутації, варіації числа копій гена, інверсії, транслокації, делеції, аномальні злиття генів [92]. При цьому велика кількість транскрипційних факторів, що кодуються пухлинозалежними генами, можуть як активувати, так і пригнічувати ріст онкоклітин залежно від типу пухлини. Співвідношення експресії онкогенів, активаторів пухлинного росту та онкосупресорів складає основу виникнення канцерогенезу [93].

Нещодавно було показано, що ряд мікроРНК відіграють важливу роль у контролі процесів диференціації, проліферації, апоптозу, метаболізму та пухлинної трансформації [94]. Було виявлено, що певні мікроРНК активуються у відповідь на гіпоксію, а їх надмірна експресія інгібує проапоптотичне сигналювання в умовах нестачі кисню [95]. Відомо, що мікроРНК, індуковані гіпоксією, гіперекспресуються в пухлинах різного типу, зокрема *miR-21* сприяє міграції та інвазії клітин гліоми шляхом активації транскрипційного фактору *Sox2* та β -катенін сигналювання [96]. Також показано, що *miR-103*, *microRNA-195*, *miR-15b* пригнічують проліферацію клітин гліоми U251, міграцію та інвазію, індуюють апоптоз та знижують рівень проонкогена *SALL4* [97]. Отже, мікроРНК є на сьогодні потенційними терапевтичними маркерами пухлин різного типу, зокрема і гліом.

Порушення тканиноспецифічної транскрипції клітин є однією з причин виникнення канцерогенезу [93]. Цей процес є висококонтрольованим і забезпечується специфічними послідовностями ДНК а також ехансерами, що зв'язуються з транскрипційними факторами. Конститутивна активація проонкогенних шляхів сигналювання, мутації послідовності нуклеотидів,

порушення роботи транскрипційних факторів спричиняють збій клітинних процесів і є передумовою злоякісної трансформації [98]. Важливу роль в експресії генів відіграють супер-енхансери (кластери з енхансерів), асоційовані з некодуючими ділянками РНК, що контролюють експресію генів та відіграють ключову роль в тканиноспецифічній транскрипції [99]. На стадії диференціювання клітин відбувається «вимикання» супер-енхансеру, який відповідає за підтримку плюрипотентності та «увімкнення» суперенхансеру, що контролює експресію тканиноспецифічних генів. Гіперактивація онкозалежних суперенхансерів зафіксована в пухлинах багатьох типів, зокрема суперенхансера протоонкогена *Myc* [98].

Активуючий транскрипційний фактор 3 (**ATF3**) – відноситься до родини транскрипційних факторів ATF/CREB. ATF3 являється фактором адаптивної відповіді та бере участь у трансдукції сигналювання від різноманітних рецепторів. Відомо, що ATF3 є важливим регулятором транскрипції, апоптозу, проліферації та виживання, бере участь у процесах інвазії та міграції. Його роль у злоякісному рості залежить від типу пухлин [100]. Відомо, що ATF3 утворює димер з іншими представниками даної родини (ATF2, c-Jun, Jun B та Jun D) та функціонує в якості активатора чи репресора [101].

DEK протоонкоген кодує ДНК-зв'язуючий протеїн, регулятор транскрипції, реплікації, сплайсингу та репарації [102]. Відомо, що DEK надекспресується в численних типах пухлин, сприяє прогресії шляхом інгібування процесів диференціювання та клітинного старіння, індукує трансформацію клітин та протидіє апоптозу. В різних типах пухлин спостерігається ампліфікація і реорганізація локуса в бр22.3 хромосоми, де розташований ген *DEK* [103]. Відомо, що сайленсінг *DEK* в гліобластомах U251 призводить до супресії проліферації та блокади G0/G1 клітинного циклу. При цьому спостерігається індукція проапоптичних процесів, а саме підвищення експресії онкосупресорів P53 і P21 і зниження експресії онкогенів Bcl-2 і c-MYC, а також активація каспази-3 у клітинах гліобластоми U251 [104]. Оскільки DEK бере участь в регуляції росту і проліферації пухлинних

клітин, він експресія даного онкогена являється важливим об'єктом дослідження в клітинах гліом за умов стресу ER.

LIF (фактор інгібування лейкемії) є мультифункціональним цитокіном, що входить до складу суперсімейства інтерлейкін-6 цитокінів. Трансдукція LIF-сигналювання відбувається за рахунок зв'язування даного фактора з LIF-рецепторним комплексом, що складається з самого рецептора (LIF-R) і глікопротеїну GP130, який в свою чергу активує селективні сигнальні шляхи, такі як JAK/STAT3, PI3K/AKT, MAPK та/або ERK1/2. В пухлинних клітинах різного типу спостерігається гіперекспресія LIF, проте його роль в канцерогенезі до кінця не з'ясована. В стовбурових клітинах гліоми LIF було ідентифіковано як фактор стовбуровості [105]. Ряд досліджень демонструють залежність експресії даного фактору від типу пухлини, при цьому показано, що LIF посилює ріст пухлини та метастазування в клітинах молочної залози шляхом активації Akt - mTOR сигнального шляху [106]. В дослідженні регуляторного гена стовбурових клітин ZEB1, що аберрантно експресується в гліомі, було ідентифіковано сайти зв'язування ZEB1 у промоторній ділянці LIF. Було продемонстровано репресію LIF за рахунок ZEB1 зв'язування в стовбурових пухлинних клітинах гліоми (GCSCs). Варто відзначити, що при нокдауні ZEB1 спостерігається активація LIF та інгібування диференціації клітин гліоми [105].

BRCA1 виступає онкосупресором в певних типах пухлин, зокрема в злоякісних клітинах молочної залози, бере участь у репарації ДНК, ремоделюванні хроматину та регуляції клітинного циклу. В ряді досліджень було показано, що мутація гена BRCA1 підвищують ймовірність утворення пухлини молочної залози та яєчників [107]. BRCA1 представлений регуляторною субодиницею 53 протеїнфосфатази, проявляє Е3-убіквітинлігазну активність, яка необхідна для його пухлиносупресорних функцій, бере участь у регуляції транскрипції. Відомо, що BRCA1 містить численні функціональні домени та взаємодіє з багатьма транскрипційними факторами [108].

Протоонкоген ***TPD52*** відіграє важливу роль у проліферації, міграції та апоптозі, а його надекспресія зафіксована в пухлинах різного типу, зокрема в гліомах, проте його роль до кінця не з'ясована [109]. Є дані про те, що нокдаун ***TPD52L2*** інгібує проліферацію клітин і формування колоній, а також індукує зупинку на G0 / G1 фазі клітинного циклу *in vitro*, відіграє важливу роль у злоякісній трансформації клітин гліоми [23].

Резистентність до апоптозу є характерною рисою усіх пухлинних клітин та супроводжується блокуванням трансдукції апоптичних сигналів, активацією антиапоптичних і/або дисфункцією проапоптичних факторів [110].

Поліфункціональний протеїн ***CLU*** (кластерін) експресується у всіх типах клітин, надекспресія якого спостерігається у відповідь на стресові чинники [111]. ***CLU*** кодує гетеродимерний дисульфідний глікопротеїн, що бере участь у процесах транспорту ліпідів, клітинній адгезії та коорд апоптоз[112]. Шляхом альтернативного сплайсингу гена ***CLU*** кодує три ізоформи протеїна, два з яких локалізовані в цитоплазмі (s***CLU***) та проявляють антиапоптичну активність, ядерна ізоформа n***CLU*** виступає індуктором апоптозу. Відомо, що цитозольна форма ***CLU*** надекспресується в умовах клітинного стресу та захищає клітини від апоптозу шляхом блокування активності Вах на мембрану мітохондрії. Водночас ***CLU*** спричинює активацію РІЗК сигнального шляху, підвищує ангіогенез, модулює NF-κB сигнальний шлях [113]. Зниження експресії s***CLU*** призводить до активації p53, зміни співвідношення про/антиапоптичних факторів родини Bcl-2, що індукує дисфункцію мітохондрій та спричинює апоптоз [114].

BIRC5 кодує протеїн сурвівін, що належить до родини інгібіторів апоптозу. Ряд досліджень показують, що в пухлинних клітинах пригнічення сурвівіну призводить до активації каспази 3 та стимулює проапоптичну відповідь [115].

Фосфосерин амінотрансфераза 1 (***PSAT1***) є ключовим ензимом біосинтезу серину, каталізує реакцію перетворення фосфопірувату на фосфосерин. Відомо, що ***PSAT1*** надекспресується в клітинах пухлини товстої

кишки, де він сприяє проліферації та активує резистентність до хіміотерапії [116].

Глюкозамін-6-фосфат деаміназа 1 (GNPDA1) – алостеричний ензим, що каталізує першу реакцію гексозамінового шляху синтезу UDP-GlcNAc (Уридин-5'-дифосфат-N-ацетилглюкозамін), а саме оборотне перетворення метаболіту гліколізу фруктозо-6-фосфату на глюкозамін-6-фосфат. Далі, з UDP-GlcNAc відбувається перенесення N-ацетилглюкозаміну на серинові або треонінові залишки амінокислот протеїнів, а данна реакція каталізується ензимом OGT-глікозилтрансферазою (O-linked n-acetyl glucosamine transferase). Завдяки цьому відбуваються пострасляційні модифікації, що змінюють активність сотень цитоплазматичних, мітохондріальних та ядерних протеїнів, у тому числі й транскрипційних факторів [117].

GLO1 (гліоксилаза 1) в пухлинних клітинах сприяє глутатіон-залежній детоксикації метилгліоксала, що є побічним продуктом анаеробного гліколізу, таким чином запобігає утворенню проапоптичних кінцевих продуктів глікації [118]. Доведено, що підвищена експресія даного гену сприяє росту пухлин різного типу і зумовлює множинну резистентність до лікарських препаратів [119].

HOMER3 належить до родини цитоплазматичних протеїнів, регуляторів численних сигнальних шляхів. HOMER3 регулює транскрипцію та відіграє надважливу роль у диференціації та розвитку тканин різного типу (зокрема, м'язової та нервової) [120]. Оскільки експресія гену *HOMER3* зростає в деяких типах пухлин, вчені припускають його причетність до пухлинного росту [121].

Набуття клітинами інвазивних властивостей тісно пов'язане з явищем епітеліально-мезенхімального переходу, що супроводжується порушенням міжклітинних контактів та клітини з позаклітинним матриксом, втратою клітинної полярності, пригніченням експресії компонентів цитоскелету та епітеліальних маркерів, таких як E-кадгерини, клаудини, цитокератини, окклюдини [122]. Так, було показано, що за умови блокування функції IRE1 в

сублініях клітин з dnIRE1 посилюється міграція клітин гліоми внаслідок гіперактивації протеїну позаклітинного матриксу SPARC. При цьому виявлено, що регуляція експресії мРНК SPARC безпосередньо здійснюється IRE1 на пост-транскрипційному рівні, що сприяє ауто/паракринній сигналізації SPARC в клітинах пухлини [9].

COL6A1, *ADGRE5*, *TGM2*, *RAB5A* та *TSPAN13* відіграють важливу роль в розвитку онкологічних захворювань різного типу та кодують протеїни, асоційовані з процесами інвазії, міграції та метастазування.

COL6A1 кодує протеїн позаклітинного матриксу колаген VI типу, що задіяний у процесах міграції. Аналіз імуногістохімічних зразків 61 хворих на гліому показав, що рівень його експресія істотно зростає та корелює зі ступенем важкості захворювання [123].

ADGRE5 (adhesion G protein-coupled receptor E5) кодує протеїни EGF-TM7 підродина G-зв'язуючих протеїнових рецепторів адгезії, що опосередковують міжклітинні взаємодії. Відомо, що *ADGRE5* бере участь в міграції та інвазії онкоклетин, а підвищення рівня експресії даного гену спостерігається в пухлинах різного типу [124].

Трансглутаміназа 2 (*TGM2*) являється унікальним мультфункціональним протеїном, що каталізує кальцієзалежну посттрансляційну модифікацію протеїнів позаклітинного матриксу, а також є активатором низки ензимів, а саме: дисульфідних ізомераз, гуанозинтрифосфат/АТФ гідролаз і серин/треонінкіназ [125]. В пухлинних клітинах різного типу спостерігається підвищена експресія *TGM2*, що асоціюється з резистентністю пухлини до лікарських препаратів [126]. Відомо, що надекспресія *TGM2* призводить до конститутивної активації NfκB (nuclear factor-κB), важливого регулятора росту клітини, апоптозу та метастазування [127].

RAB5C (Ras-related protein) кодує протеїн з ГТФ-азною активністю, який контролює процеси ендоцитозу, фагоцитозу, екзоцитозу, внутрішньоклітинного транспорту, бере участь в пост-трансляційних

модифікаціях протеїнів. Відомо, що RAB5C надекспресується в пухлинних клітинах, де є позитивним регулятором клітинного циклу за рахунок активації циклінів D1, A, E а також сприяє міграції злоякісних клітин [128].

TSPAN13 кодує трансмембранний протеїн та координує міграцію, внутрішньоклітинний трафік та бере участь в патогенезі неоплазій різного типу [129]. Відомо, що представники родини TSPAN відіграють важливу роль у багатьох клітинних процесах, міжклітинній адгезії, взаємодії матрикс-клітина, контролює ріст клітин та процеси виживання [130]. Відомо, що гіперекспресія miR-369-3p, що безпосередньо взаємодіє з TSPAN13, призводить до пригнічення росту пухлини та індукує апоптоз у клітинах папілярної карциноми щитоподібної залози [131].

IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) належить до протеїнів родини IGFBP, що зв'язують та стабілізують IGF (інсуліноподібний фактор росту), а їх експресія суттєво пригнічена в пухлинах різного типу. Родина IGFBP являються ключовими регуляторами ендокринної дії IGF, є потужними проапоптотичними факторами та регулюються онкосупресором p53. Відомо, що за рахунок координації активності IGF, представники родини протеїнів IGFBP (від 1 до 6) беруть участь в контролі проліферації, диференціації, міграції, ангиогенезу та апоптозу клітин [132]. Також відомо, що IGFBP3 проявляє антипроліферативну та проапоптотичну дію IGF-незалежним шляхом, за участю його рецептора IGFBP-3R/TMEM219, що в свою чергу призводить до активації каспази 8, а також каспаз 3, 6, 7, інактивації NF-κB та врешті-решт ініціації апоптозу [133].

IRS1 (субстрат 1 інсулінового рецептора) являється цитоплазматичним адапторним протеїном, який опосередковує передачу сигналу з IGF-1R (рецептор інсуліноподібного фактору росту 1 типу) та залучений до IGF1-залежного сигнального шляху трансдукції сигналу. Було виявлено, що пухлини з низьким рівнем експресії IRS-1 асоційовані з поганими прогнозами у пацієнтів, хворих на аденокарциному [134]. Вченими було показано, що *miR-126* функціонує як супресор в клітинах гліоми, де

здійснює негативну регуляцію IRS1, а також пригнічує активацію фосфоінозитид 3-кінази PI3K/АКТ шляху, тим самим пригнічує проліферацію пухлинних клітин [135].

BNIP3 (Bcl2/adenovirus E1b 19-kDa interacting protein 3) надмірно експресується в пухлинах різного типу, зокрема в клітинах гліоми [136]. Відомо, що, даний протеїн локалізований у мітохондріях та сприяє ішемічно-реперфузійному пошкодженню (I/R) шляхом індукції мітохондріальної дисфункції [137]. Підвищена експресія BNIP3 опосередкована транскрипційним фактором HIF-1 в пухлинах різного типу [138]. Є дані про те, в клітинах гліоми, ядерний протеїн BNIP3 проявляє антиапоптичну дію, в комплексі з гістоновою деацетилазою 1 (HDAC1) та РТВ-асоційованим фактором сплайсингу (PSF) пригнічує експресію AIF (фактор індукції апоптозу мітохондрій), тим самим опосередковує резистентність онкоклетин до дії темозоломідів [139]. Було показано, що miR-145 індукує апоптоз клітин гліоми шляхом інгібування BNIP3, що призводить до супресії сигналізації Notch [140].

PER2 (period circadian protein homolog 2) циркадний протеїн, що функціонує як репресор транскрипції, та являється ключовим компонентом циркадного годинника . Позитивні фактори транскрипції CLOCK та BMAL1 утворюють гетеродимер, та в комплексі регулюють транскрипцію генів *PER2* та *CRY* (cryptochrome). В свою чергу продукти експресії *PER2* та *CRY* поєднуються в комплекс та утворюють петлю зворотного зв'язку, транслокуються в ядро, де пригнічують активність CLOCK/ BMAL1 [141]. Відомо, що порушення циркадних ритмів асоціюються з різними формами канцерогенезу людини, а генетично чи екологічно обумовлені невпорядковані циркадні годинники пришвидшують прогресування пухлини [142]. Було показано, що PER2 діє як онкоген в пухлинному середовищі, де підвищує проліферацію та метастазування, а виключення активності даного гена на ранніх стадіях призводить до пригнічення метастазування [143].

Відомо, що **GADD45A (growth arrest and DNA damage–inducible 45A)** сприяє репарації ДНК за рахунок взаємодії з ядерним антигеном проліферуючих клітин (PCNA). Експресія GADD45A активує зупинку клітинного циклу у фазі G2/M у нормальних та пухлинних клітинах шляхом взаємодії з циклін-залежною кіназою 2 (CDC2), цикліном B1, а також протеїнами PCNA та p21, що є індукторами p53. Роль GADD45A в процесах виживання та апоптозу залежить від типу пухлин [144]. Вченими Wang та ін. було показано, що GADD45A індукує стійкість клітин гліоми до термозоламиду, тим самим підвищує резистентність пухлини p53-опосередкованим шляхом [145].

HK2 гексокіназа 2 належить до класу трансфераз та каталізує фосфорилування глюкози до глюкозо-6-фосфат на стадії ініціації гліколізу та відіграє ключову роль в процесі аеробного гліколізу (ефекту Варбурга) [146]. Відомо, що гексокіназа 2 локалізована на зовнішній мембрані мітохондрій, де ініціює прогресування канцерогенезу та надмірно експресується у всіх типах агресивних пухлин [147]. Нещодавно було встановлено, що регуляція HK2 відбувається за участю miR-218, а сайленсінг даного ензиму значно зменшує проліферацію, міграцію, інвазію в клітинах гліоми лінії U87 та U251 [148].

1.4 Значення гіпоксії в рості злоякісних пухлин і регуляція експресії генів за гіпоксії

Гіпоксія являється характерною ознакою більшості злоякісних пухлин і важливим регулятором проліферації, ангиогенезу, виживання, метастазування та репрограмування метаболізму [21]. Гіпоксія притаманна більшості солідних пухлин, де активує проангіогенні та антиапоптичні фактори, стимулює арешт клітинного циклу, координує вихід сумарної енергії при гліколізі, сприяє стійкості пухлинних клітин до радіо- та хіміотерапії, змінюючи фізіологію пухлинних клітин в напрямку до більш агресивного фенотипу [149, 150]. Вченими продемонстровано, що гостра короткотривала гіпоксія, на відміну від хронічної форми, посилює ангиогенез та

метастазування [151]. В пухлинних клітинах за гіпоксичних умов активується мережа сигнальних каскадів, таких як HIF, PI3K, MAPK та NF- κ B. Взаємодія ланок трансдукції сигналів утворюють петлі зворотного зв'язку та координують величину гіпоксичних ефектів [152].

Родина транскрипційних факторів HIF (hypoxia inducible factor) відіграють ключову роль в адаптації пухлинних клітин до умов гіпоксії [21]. Протеїн HIF відноситься до родини helix–loop–helix (bHLH) та являє собою гетеродимер з киснев-чутливою субодиницею HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α або HIF-3 α), та стабільної конститутивно експресованої HIF- β . Субодиниця HIF- α є ключовим регулятором кисневого балансу в клітині та активується в умовах низьких концентрацій кисню та координує репрограмування метаболізму на транскрипційному рівні. HIF-1 α та HIF-1 β утворюють комплекс, який транслокується до ядра, де регулює експресію багатьох таргетних генів, що містять консенсусні послідовності, чутливі до гіпоксії (hypoxia-response elements, HREs), в промоторних ділянках яких є послідовність 5'-RCGTG-3' [153].

Варто наголосити, що індукція асоційованих з гіпоксією каскадів сигналювання відбувається як за умов гіпоксії, так і незалежним чином, за участю цитокінів, факторів росту, хемокінів, що також здатні стимулювати HIF-1 α . В той же час, стабільність та активність HIF- α можуть регулюватись епігенетичними змінами й мутаціями, які призводять до втрати функцій пухлинних супресорів (p53, PTEN) й активації онкогенів (Ras, Src, mTOR і Myc). Так, дерегуляція онкосупресорів PTEN або p53 посилює синтез та стабілізує субодиницю HIF-1 α . Також було показано, що активація тирозинкіназ EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептор епідермального фактора росту) та HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор епідермального фактора росту типу 2) підвищує експресію HIF-1 α за рахунок трансдукції сигналів PI3K/АКТ, що стимулює активність mTOR у пухлинних клітинах передміхурової та молочної залози. mTOR в свою чергу активує

трансляцію мРНК HIF1 α шляхом фосфорилування фактору ініціації трансляції eIF4E [152].

Отже, активація факторів росту та онкогенів поряд з пригніченням функції генів супресорів пухлин, в значній мірі, визначають інтенсивність протікання онко- та HIF-залежних процесів [154, 155]. Контроль апоптозу та виживання здійснюється HIF-1 за рахунок активації пухлинозалежних факторів, таких як BNIP3, TGF- β та bFGF [156]. Слід відмітити, що HIF1 α є важливим регулятором проангіогенного фактора VEGF (vascular endothelial growth factor, ендотеліальний фактор росту судин), який відіграє важливу роль в процесах ангіогенезу як в нормі та при злоякісній трансформації. Відомо, що HIF-1 також являється активатором транскрипції низки генів, що кодують ангіогенні цитокіни та фактори росту [157].

Для пухлин характерним є посилений метаболізм глюкози та швидкі темпи гліколізу у порівнянні з нормальними клітинами. Високі рівні пірувату та лактату в пухлинах підтримуються завдяки підвищеній експресії ензимів гліколізу та переносників глюкози (GLUT-1, GLUT-3). HIF-1 на транскрипційному рівні стимулює експресію мРНК низки гліколітичних ензимів, зокрема гексокінази 2 (hexokinase 2, HK2), ключового регулятора гліколізу, надекспресія якого зафіксована й в гліомах. Крім того, HIF-1 α індукує експресію кінази 1 піруватдегідрогенази (PDK1), що пригнічує піруватдегідрогеназу та надходження пірувату до циклу трикарбонових кислот [158].

Відомо, що гіпоксія являється одним з факторів, що зумовлює виникнення стресу ендоплазматичного ретикулума. За умов гіпоксії підвищується рівень експресії шаперона GRP78/BiP та транскрипційного фактору XBP1 в клітинах фібросаркоми та карциноми легень людини. Також зафіксована активація транскрипційного фактору ATF4 за рахунок PERK-залежного фосфорилування eIF2 α (еукаріотичного фактора ініціації трансляції-2 α) у відповідь на гіпоксію в пухлинних клітинах товстої кишки [159]. Зв'язок гіпоксії зі стресом ER опосередковується транскрипційним

фактором HIF. З одного боку, гіпоксія стимулює виникнення стресу ER, проте існує і зворотній механізм, коли саме стрес ER активує гіпоксію шляхом посилення експресії HIF через регуляторні сигнальні каскади [160]. Численні експериментальні дані свідчать, що IRE1-опосередкована гілка сигнальних шляхів стресу ER відповідає за адаптацію пухлинних клітин до гіпоксичних умов [21].

1.5 Значення метаболізму глутаміну та глюкози у контролі процесів проліферації у пухлинних клітинах

Глюкоза є основним джерелом вуглецю та енергії в клітинах та посідає центральне місце в метаболізмі ссавців [161]. Швидке вивільнення глюкози зі складу внутрішньоклітинних полімерів забезпечує клітини енергією внаслідок аеробного чи анаеробного синтезу АТФ. Глюкоза не лише універсальне “паливо”, але й попередник низки проміжних метаболітів, компонентів для багатьох біосинтетичних реакцій. Так, молекула глюкози включається до пентозофосфатного шляху, в результаті чого утворюється рибозо-5-Р, що є попередником для синтезу нуклеотидів [162]. Відновлений NADP, що синтезується в результаті пентозофосфатного шляху, використовується для біосинтезу ліпідів, нуклеотидів та амінокислот. Кінцевий продукт гліколізу піруват надходить до циклу трикарбонових кислот, звідки трансформується у ацетилСоА - основний донор вуглецю в біосинтезі ліпідів [163].

Для пухлинних клітин характерними є швидкі темпи метаболізму, інтенсивність поглинання глюкози та глутаміну при цьому підвищується [164]. При цьому, репрограмування шляхів метаболізму глюкози та глутаміну відіграють ключову роль для росту, адаптації та виживання онкоклітин в умовах несприятливого мікрооточення [156, 165, 166].

Нормальні диференційовані клітини отримують основний пул енергії внаслідок окисного фосфорилування в мітохондріях, проте в більшості пухлинних клітин переважає аеробний гліколіз (ефект Варбурга), що сприяє проліферації та метастазуванню пухлинних клітин [164]. Завдяки підвищених

темтів гліколізу відбувається постачання більшої кількості інтермедіатів для синтезу амінокислот, нуклеотидів та ліпідів [167]. При цьому спостерігається зниження активності ферменту піруват дегідрогенази (PHD), який опосередковує перехід пірувату до циклу трикарбонових кислот (ТСА), частково за рахунок підвищеної експресії кінази піруватдегідрогенази (PDK). Є данні про те, що інгібування PDK підвищує входження пірувату до циклу ТСА, що веде до реверсії аеробного гліколізу, та результується в посиленні дихання мітохондрій, генерації АФК, та індукції апоптозу в пухлинних клітин різного типу [65].

Швидкі темпи гліколізу потребують безперервного використання пулу NAD, оперативне поповнення якого відбувається в процесі лактатдегідрогеназного відновлення пірувату до лактату. Таким чином, онкоклетини здатні обмежувати окислення глюкози в мітохондріях з метою максимально збільшити конверсію лактату і NAD рециркуляцію, що дозволяє підтримувати високі темпи гліколізу на сталому рівні [168]. Родина NAD – залежних сіртуїнових деацителаз відіграє важливу роль у метаболізмі та прогресуванні пухлин. Відомо, що сіртуїни задіяні у контролі метаболізму глюкози через модуляцію транскрипційної активності онкогенів HIF-1 та c-Myc, та відповідно зміну активності ензимів гліколізу [169].

Відомо, що онкогенна активація сигнальних шляхів HIF, PI3K-Akt-mTOR, c-Myc, kRas, мутантний p53 призводить до посилення аеробного гліколізу в пухлинних клітинах [88]. Так, при низьких концентраціях кисню онкоген HIF є потужним регулятором метаболізму глюкози та активатором експресії транспортерів глюкози та ензимів гліколізу (GLUT1, GLUT3, HK1/2, LDHA, PDK1, GAPDH, PGK1 та PKM2 [170].

Інтенсивний катаболізм глутаміну поряд з аеробним гліколізом є однією з характерних ознак злоякісного новоутворення [171]. Глутамін та глутамат відіграють провідну роль у катаболізмі амонію та аміногруп у процесі окислення амінокислот [172]. Азот амідної групи глутаміну є джерелом аміногруп для великого спектру біосинтетичних процесів. Глутамін

утворюється з глутамату в ході реакції, що каталізується глутамінсинтетазою, ключовим регуляторним ензимом метаболізму азоту. Крім того, глутамін являється прекурсором глутатіону – важливого антиоксиданту, є донором нітрогену в синтезі пуринів та піримідинів [173–175].

Пухлинні клітин, для яких характерним є ефект Варбурга, демонструють підвищену потребу в глутаміні, відому як «глутамінова залежність» [176]. Відомо, що надекспресія онкогена Мус являється одним з головних факторів, необхідних для активації інтенсивного катаболізму глутаміну [177, 178]. Для підтримки функціонування мітохондрій при обмеженому доступі до пірувату за умов аеробного гліколізу, пухлинні клітині поповнюють метаболіти циклу ТСА за допомогою процесу, відомого як анаплероз [179]. Важливим кроком у підвищенні катаболізму глутаміну є активація ферменту мітохондрій глутамінази, який каталізує гідроліз глутаміну до глутамату та амонію. Надалі, глутамат в реакції окисного дезамінування в мітохондріях за участю дегідрогенази (GLUD1) переходить до α -кетоглутарата (α -КГ), що надходить до циклу ТСА. Іншим шляхом конвертації глутамату в α -КГ є реакція переамінування в мітохондріях та цитозолі. Данна серія реакцій є особливо важливою для інтенсивно проліферуючих клітин, в яких значна частина цитрату циклу ТСА експортується з мітохондрій з метою синтезу цитозольного ацетил-СоА для біосинтезу ліпідів [163]. Таким чином, потреба в поповненні інтермедіатів циклу ТСА онкоклітинами робить глутамін ключовим анаплеротичним субстратом за рахунок його конверсії через глутамат до α -КГ.

Відомо, що в пухлинних клітинах глутамін є активатором проліферативного сигналіngu [180]. За участю антипортера LAT1 відбувається обмін внутрішньоклітинного глутаміну на незамінну амінокислоту лейцин. Остання активує пропроліферативну кіназу mTORC1, яка в кооперації з іншими факторами бере участь в регуляції трансляції білка, рибосомного біогенезу і аутофагії. Цікаво, що mTOR є транскрипційним репресор SIRT4,

який може негативно регулювати активність дегідрогенази GLUD, тим самим пригнічувати глютаміновий анаплероз [181].

Нещодавно було ідентифіковано численні мікроРНК, які націлені на гени метаболізму, в тому числі й ключових гліколітичних ферментів, тим самим регулюють метаболізм глюкози та глютаміну в пухлинних клітинах [182].

Є данні про те, що глютамін активує резистентність до апоптозу [178]. Доведено, що глютамін стимулює споживання глюкози пухлинними клітинами, а блокада метаболізму глютаміну обмежує поглинання глюкози, та врешті-решт виснажує клітину. Блокування гліколізу та глютамінолізу є стратегічними напрямками досліджень канцерогенезу [183].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та умови проведення експериментів

Експериментальні дослідження проводились на культурі клітин гліоми мозку людини лінії U87, яка була отримана з ATCC (American Type Culture Collection, США) та були надані для роботи професором Мішелем Моне (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангиогенезу, Університет Бордо 1, Франція). У даній роботі використовувались три сублінії клітин гліоми лінії U87: перша сублінія, контрольна, була стабільно трансфікована вектором pcDNA3.1 (Invitrogen, США); друга сублінія – клітини (dn-ERN1) з повним пригніченням функції сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 домінант-негативною кДНК-конструкцією dnERN1, що кодує протеїн ERN1, який не має кіназного та ендорибонуклеазного доменів; 3) третя сублінія dn^rERN1 [GenBank accession number JQ425696] – клітини з частково пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1 домінант-негативною кДНК-конструкцією, що кодує протеїн ERN1, який має кіназний, але не має ендорибонуклеазного домена, була отримана професором О. Г. Мінченко (відділ молекулярної біології, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України).

Пригнічення функції сигнального протеїну IRE1/ERN1 визначалась попередньо за наявністю фосфорильованої форми IRE1/ERN1 та утворенням альтернативного сплайс-варіанту XBP1 за умов індукованого тунікаміцином (10 мкг/мл протягом 2 годин) стресу ендоплазматичного ретикулума [48,184].

На рисунку 2.1 схематично представлено зображення структури нативної форми сенсорно-сигнального ензиму ERN1 та його ізоформи без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1), а також ізоформи з мутацією в ендорибонуклеазному домені (dn^rERN1).

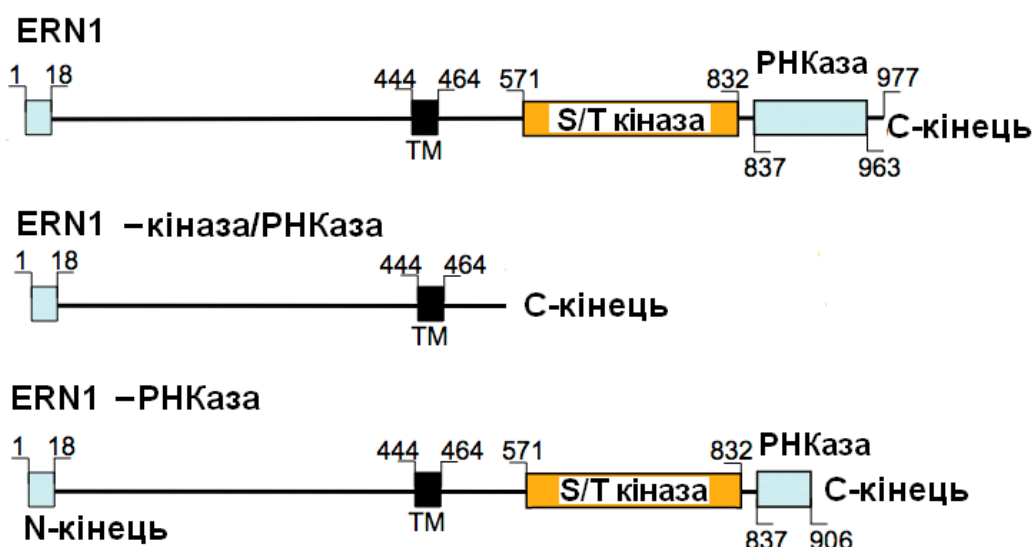


Рис. 2.1. Структура нативної (зверху), домінант-негативних за протеїнкіназою та ендорибонуклеазою (по середині) та лише за ендорибонуклеазою (знизу) конструкторів ERN1 (IRE1). Цифрами позначені амінокислотні залишки в послідовності цього сигнального протеїну.

Клітини гліоми порівнювали з нормальними астроцитами людини лінії NHA/TS, яку отримали від докторів Sasai K. та Tanaka S. [185].

Досліджені лінії клітин культивували у середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), в яке додавали глютамін (2 ммоль/л), 10% ембріональної сироватки телят (Equitech-Біо, Inc., США), пеніцилін (100 одиниць/мл; Gibco, США) та стрептоміцин (0,1 мг/мл; Gibco, США). Ростили клітини в інкубаторі з 5% CO₂ при температурі +37 °C в чашках для культур клітин CellStar діаметром 10 см (Greiner bio-one, Німеччина).

При дослідженні впливу глютаміну клітини промивали однократним натрій-фосфатним буфером (Thermo Fisher Scientific, США), додавали середовище DMEM (Gibco, США) без глютаміну і витримували протягом 16 годин.

В експериментах по визначенню впливу гіпоксії, чашки з культурами клітин залишали в інкубаторі на 16 годин з 3% O₂, 5% CO₂, та 92% N₂, як це було описано [48]. Стрес ER індукований додаванням у середовище тунікаміцину (10 мкг/мл), при цьому клітини інкубували протягом 2 годин [186].

2.2. Реактиви та обладнання

Для виділення РНК використовували реактив Трізол («Trisol Reagent», *Invitrogen*, США), центрифугування РНК та протеїнів здійснювали за допомогою центрифуги Centrifuge 5415 R (*Eppendorf*, Німеччина). Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували реакційну суміш «HotStartTaq Master Mix Kit», для зворотної транскрипції і синтезу кДНК - набір реагентів «QuantiTect Reverse Transcription Kit» (*Qiagen*, Німеччина), для проведення кількісної ПЛР кДНК використовували реагенти «2xSYBR Green Mix» (AB gene, *Thermo Fisher Scientific*, Великобританія). Також у роботі використовували маркери молекулярної ваги для ДНК та протеїнів виробництва *Thermo Fisher Scientific* (Великобританія), прямі та зворотні праймери (*Metabion*, Німеччина) і воду вільну від нуклеаз та колонки для виділення плазмід фірми *Qiagen* (Німеччина).

Для проведення напівкількісної ПЛР використовували Tris, додецилсульфат натрію (SDS), 40% суміш акриламідом з біс-акриламідом і бета-меркаптоетанол компанії *Sigma-Aldrich* (США) та TEMED з *Fluka* (Швейцарія). Використовували ампліфікатор MasterCycler Personal (*Eppendorf*, Німеччина). Для проведення горизонтального електрофорезу застосовували камеру компанії *Advance Co.Ltd.* (Японія), а для візуального відтворення його результатів - транслюмінатор ECX-15L компанії *Vilber Lourmat* (Франція) і фотокамеру 168P фірми *Mintron* (Тайвань).

Для проведення кількісної ПЛР використовували ампліфікатор “QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (*Applied Biosystems*, США).

Також для проведення експериментів застосовували ваги аналітичні RADWAG WPS 510/C/1 (*Radwag Balances and Scales*, Польща), рН метр CYBERSCAN рН 510 (Eutech Instruments, США) та хімічні реактиви вітчизняних виробників кваліфікації о.с.ч. та х.ч.

2.3. Методи досліджень

У дисертаційній роботі використані методи культивування клітин, виділення РНК та екстрактів протеїнів з клітин, спектрофотометричні методи визначення кількості та якості зразків РНК, синтез комплементарних ДНК за допомогою зворотних транскриптаз, методи полімеразної ланцюгової реакції, в тому числі кількісної, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, вестерн-блот аналіз протеїнів, метод siRNA, методи статистичного аналізу.

Аналіз результатів проводили у програмі Excel – статистичний аналіз даних.

2.3.1. Виділення РНК з культури клітин і синтез комплементарних ДНК методом зворотної транскрипції мРНК

Тотальну РНК виділяли із клітин гліоми лінії U87 за допомогою реагента Trisol згідно протоколу виробника (*Invitrogen*, США), так як це було описано раніше. Культуральні чашки ($d = 10$ см, *Greiner bio-one*, Німеччина) з досліджувальними клітинами поміщали на льодяну баню, промивали охолодженим фосфатно-сольовим буфером (Thermo Fisher Scientific, США), додавали 1 мл реагента Trisol та інкубували протягом 5 хв. при 4 °C. Лізат клітин переносили у центрифужні мікропробірки, додавали 200 мкл хлороформу, та центрифугували до повного розділення фаз протягом 10 хв при 15000 g при 4°C. Потім зразки центрифугували протягом 10 хв при 12000 g за температури 4 °C на Centrifuge 5415 R (*Eppendorf*, Німеччина) до повного розділення на водну та фенольну фазу. Водну фазу відбирали у нову мікропробірку та додавали ізопропіловий спирт у рівних співвідношеннях. Зразки перемішували та ставили в морозильну камеру протягом 120 хв при

температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Центрифугували протягом 10 хв при 12000 g за температури $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Осад РНК промивали 75% етанолом і промивали їх у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували 95% етанолом і знову розчиняли у воді. Концентрацію виділеної РНК вимірювали на безкюветному спектрофотометрі NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез кДНК проводили за допомогою QuaniTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника.

Виділену РНК далі використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК за допомогою набору „QuaniTect Reverse Transcription Kit” (QIAGEN, Німеччина), в якому передбачено етап, що забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК. Для синтезу кДНК брали 1 мкг РНК, додавали 12 мкл води і короткочасно (протягом 2 хвилин) інкубували з реагентом 2 мкл gDNA Wipeout Buffer (буфер, що містить ДНКазу та використовується для видалення можливих домішок ДНК) при температурі $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Додавали 1 мкл Quantiscript Reverse Transcriptase в присутності 1 мкл суміші олігонуклеотидних праймерів (Primers mix) та 4 мкл буферу Quantiscript RT Buffer та інкубували 15 хв при температурі $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 хвилин, швидко охолоджували на льоду і отриману таким чином кДНК використовували для дослідження експресії генів шляхом проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Для синтезу кДНК використовували по 3 екстракти тотальної РНК з кожної сублінії клітин гліоми. Для проведення ПЛР отриману суміш кДНК розводили в 5 - 20 разів, в залежності від дослідженого гена.

2.3.2. Вивчення експресії мРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

Рівень експресії досліджених генів у сублініях клітин гліоми та астроцитах досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті „QuantStudio 5 Real-Time PCR

System” (Applied Biosystems, США), використовуючи ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Велика Британія) та специфічні для цих генів пари праймерів, отриманих із компанії Sigma-Aldrich (США) або Metabion (Німеччина). Для усіх досліджених генів проводили ампліфікацію протягом 40 циклів за таких температурних умов циклу: 95°C – 20 сек., 55°C – 20 сек. та 72°C – 30 сек. Усі реакції проводили в трьох повторностях.

Для вивчення рівня експресії гена *NAMPT* (nicotinamide phosphoribosyltransferase; EC_number="2.4.2.12"), відомого ще як *PBEF* (pre-B-cell colony-enhancing factor) або вісфатин, були використані такі праймери: прямий 5'- TCTTCACGGTGGAAAACACA -3' і зворотний 5'- GCTCCTATGCCAGCAGTCTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 700 – 719 та 931 – 912 кДНК *NAMPT* людини (GenBank номер NM_005746); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 232 п.н.з.

Ампліфікацію фрагмента гена *PERK* (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase; EC_number="2.7.11.1"), відомого ще як *EIF2AK3* (Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3) проводили з використанням прямого – 5'- CTCACAGGCAAAGGAAGGAG -3' і зворотного 5'- AACAACTCCAAAGCCACCAC -3' праймерів, які відповідали нуклеотидним послідовностям 1945 – 1964 та 2123 – 2104 кДНК *EIF2AK3* людини (GenBank номер NM_004836); розмір ампліфікованого фрагмента складав 179 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *TSPAN13* (tetraspanin 13, NET-6) були використані такі праймери: прямий (5'– GCAACCACAGGTTCCAAGAT –3' та зворотний (5'– CTCGGAGACTGGAAATCAGC –3'). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 225 – 244 та 375 – 356 кДНК *TSPAN13* людини (GenBank номер NM_014399). Розмір ампліфікованого фрагмента 151 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *CLU* (clusterin) були використані такі праймери: прямий 5'- ACATTTGGTGCCSAGAAGTC -3' і зворотний 5'- CTGTGGTCCAGGGAAAGGTA -3', які відповідали нуклеотидним

послідовностям 2199 – 2218 та 2388 – 2369 кДНК *CLU* людини (GenBank номер NM_001831); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 190 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *ATF6* (activating transcription factor 6) були використані такі праймери: прямий – 5'– TGAACCTCGAGGATGGGTTC –3' та зворотний – 5'– TCACTCCCTGAGTTCCTGCT –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1510-1529 та 1689 – 1670 кДНК *ATF6* людини (GenBank номер NM_007348). Розмір ампліфікованого фрагмента 180 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *ATF3* (activating transcription factor 3) проводили з такими праймерами: прямим – 5'– CAAGTGCATCTTTGCCTCAA –3' та зворотним – 5'– CCACCCGAGGTACAGACACT –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1024 - 1043 та 1090 – 1071 кДНК *ATF3* людини (GenBank номер NM_004024). Розмір ампліфікованого фрагмента 167 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *BIRC5* (baculoviral IAP repeat-containing 5) були використані такі праймери: прямий 5'- GGACCACCGCATCTCTACAT -3' і зворотний 5'- GACAGAAAGGAAAGCGCAAC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 166 – 185 та 388 – 369 кДНК *BIRC5* людини (GenBank номер NM_001168); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 204 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *RAB5C* (*RAB5C*, member *RAS* oncogene family) були використані такі праймери: прямий – 5'– GAGTCTGCGGTAGGCAAATC –3' та зворотний – 5'– CCCGTGCAAATGTATCTGTG –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 285 – 304 та 534 – 515 кДНК *RAB5C* людини (GenBank номер NM_004583). Розмір ампліфікованого фрагмента 250 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *BRCAl* (breast cancer 1, early onset), відомого ще як RING Finger Protein 53 – RNF53 та Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 53, проводили з такими праймерами: прямим – 5'– TGAAGAAAGAGGAACGGGCT –3' та зворотним – 5'–

TGGCTCCCATGCTGTTCTAA –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 4264 – 4283 та 4503 – 4484 кДНК *BRCA1* людини (GenBank номер NM_007294). Розмір ампліфікованого фрагмента 240 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *COL6A1* (collagen, type VI, alpha 1) проводили за допомогою прямого (5’– CTGGGCGTCAAAGTCTTCTC –3’) та зворотного (5’– ATTCSGAAGGAGCAGCACACT –3’) праймерів, які відповідають послідовності 646 – 665 та 856 – 837 кДНК *COL6A1* людини (GenBank номер NM_001848). Розмір ампліфікованого фрагмента 211 п.н.з.

Ампліфікацію фрагмента гена *DEK* (DEK Proto-Oncogene) проводили з використанням прямого – 5’- GGTCAGTTCAGTGGCTTTCC -3’ і зворотного 5’- CCTTGCCATTCCAGAACTGT -3’ праймерів, які відповідали нуклеотидним послідовностям 575 – 594 та 838 – 819 кДНК *DEK* людини (GenBank номер NM_003472); розмір ампліфікованого фрагмента складав 264 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *GLO1* (glyoxalase 1) були використані такі праймери: прямий 5’- GCGTAGTGTGGGTGACTCCT -3’ і зворотний 5’- TCACTCGTAGCATGGTCTGC -3’, які відповідали нуклеотидним послідовностям 61 – 80 та 240 – 231 кДНК *GLO1* людини (GenBank номер NM_006708).

Для вивчення рівня експресії гена *BCL2L1* (BCL2-like1) були використані такі праймери: прямий 5’- TCTGGTCCCTTGCAGCTAGT -3’ і зворотний 5’- CAGGGAGGCTAAGGGGTAAG -3’, які відповідали нуклеотидним послідовностям 1016 – 1035 та 1211 – 1192 кДНК *BCL2L1* людини (GenBank номер NM_001191); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 196 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *LIF* (leukemia inhibitory factor) були використані такі праймери: прямий – 5’– CCCTGGTCCСТАCTСААСАА –3’ та зворотний – 5’– CTGGACCCTGACACCСТААА –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1850-1869 та 2083 – 2064 кДНК *LIF*

людини (GenBank номер NM_002309). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. Розмір ампліфікованого фрагмента 242 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *PSAT1* (phosphoserine aminotransferase 1) були використані такі праймери: прямий 5'- AGAATCTTGTGCGGGAATTG -3' і зворотний 5'- CCCAAGTTTAGGGTGAACGA -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 238 – 257 та 455 – 436 кДНК *PSAT1* людини (GenBank номер NM_021154); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 218 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК *TGM2* (transglutaminase 2, C polypeptide) були використані такі праймери: прямий – 5'– СТАССАГГГАТССАГСТТТГ –3' та зворотний – 5'– СТГСССААААТТССААГГТА –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 472 – 491 та 652 – 633 кДНК *TGM2* людини (GenBank номер NM_004613). Розмір ампліфікованого фрагмента 180 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *TPD52* (tumor protein D52) проводили з такими праймерами: прямим – 5'– САСАГАГАСССТСТСГГААГ –3' та зворотним – 5'– СССТТТГГСААТГТТСТГТТ –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 89 – 108 та 266 – 247 кДНК *TPD52* людини (GenBank номер NM_005079). Розмір ампліфікованого фрагмента – 178 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *GNPDA1* здійснювали за допомогою прямого (5'– ТТААСССАГГГССАГАГААГ –3') та зворотного (5'– ТГГГТГТТТТСТГГГТГГАТ –3') праймерів. Дані нуклеотидні послідовності відповідають ділянкам 147 – 166 та 381 – 362 кДНК *GNPDA1* людини (GenBank номер NM_005471). Розмір ампліфікованого продукту – 235 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *IGFBP3* (insulin-like growth factor binding protein 3) були використані такі праймери: прямий 5'- GGGGTGTACACATТСССААС -3' і зворотний 5'- GGTCATGTCСТТГГСАГТСТ -3', які відповідали нуклеотидним

послідовностям 830 – 849 та 1080 – 1071 кДНК IGFBP3 людини (GenBank номер NM_000598); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 251 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *IRS1* (insulin receptor substrate 1) здійснювали за допомогою прямого (5'– AGTCCCAGCACCAACAGAAC –3') та зворотного (5'– TCATCCGAGGAGATGAAACC –3') праймерів. Дані нуклеотидні послідовності відповідають ділянкам 1094 – 1113 та 1341 – 1322 кДНК *IRS1* людини (GenBank номер NM_005544). Розмір ампліфікованого продукту – 248 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *ADGRE5* (adhesion G protein-coupled receptor E5) були використані такі праймери: прямий 5'- CCTCAGAACTCCTCGTGTGT –3' і зворотний 5'- TGTTCAGCAGTCCGAGAAT –3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 471 – 490 та 633 – 614 кДНК *ADGRE5* людини (GenBank номер NM_001784); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 163 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК *BNIP3* (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) здійснювали за допомогою прямого (5'– CTGGACGGAGTAGCTCCAAG –3') та зворотного (5'– GAATATTTTCCGGCCGACTT –3') праймерів. Дані нуклеотидні послідовності відповідають ділянкам 368 – 387 та 589 – 587 кДНК *BNIP3* людини (GenBank номер NM_004052). Розмір ампліфікованого продукту – 222 п.н.з.

Для вивчення рівня експресії гена *MKI67* (marker of proliferation Ki-67) були використані такі праймери: прямий 5'- GCCCСТААAGTAGAACCCGT -3' і зворотний 5'- GGGTTCGGATGATTTGCCTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 9088 – 9107 та 9327 – 9308 кДНК *MKI67* людини (GenBank номер NM_002417); розмір ампліфікованого фрагменту дорівнював 240 п.н.з.

Ампліфікацію фрагмента гена *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) проводили з використанням прямого – 5'- AGGCACTCAAGGACCTCATC -3' і зворотного 5'- GCCAAGGTATCCGCGTTATC -3' праймерів, які відповідали

нуклеотидним послідовностям 289 – 308 та 538 – 519 кДНК PCNA людини (GenBank номер NM_003376); розмір ампліфікованого фрагмента складав 250 п.н.з.

Для ампліфікації бета-актину (*ACTB*) використовували наступні праймери: прямий - 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG -3' та зворотний - 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG -3', що починаються із 747-го (5'-позиція) та 980-го (3'-позиція) нуклеотидних залишків, відповідно; GenBank номер NM_001101, а довжина фрагмента ампліфікації – 234 п.н.з.

Відносну кількість транскриптів генів *PERK*, *ATF6*, *CLU*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A*, *TPD52*, *LIF*, *PSAT1*, *ATF3*, *TSPAN13*, *Ki-67*, *PCNA*, *IGFBP3*, *IRS1*, *BNIP3*, *PER2*, *GADD45A* та *HK2* нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину (*ACTB*) і виражали у % по відношенню до контролю (клітини гліоми лінії U87, трансфіковані неспецифічною siRNA), прийнятого за 100 %. Контролем у дослідах з пригніченням активності протеїну IRE1 слугували клітини гліоми, трансфіковані вектором pcDNA3.1 (рис.2.1)

2.3.3. Ампліфікація комплементарних ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції

Для ампліфікації фрагментів кДНК досліджених генів використовували ампліфікатор MasterCycler Personal (Eppendorf, Німеччина). Брали 2 мкл кДНК, додавали 10 мкл суміші «HotStartTaq Master Mix Kit» (*Qiagen*, Німеччина), по 1 мкл прямого та зворотного праймерів. Водюю, вільною від нуклеаз, доводили загальний об'єм зразка до 20 мкл.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в ампліфікаторі MasterCycler Personal, фірми *Eppendorf* (Німеччина). Для активації ДНК-полімерази досліджену суміш нагрівали до 95 °С та інкубували протягом 10 хв. Ампліфікацію проводили протягом 40 – 45 циклів за температурних умов +95 °С, 30 сек. (денатурація дволанцюгової ДНК), +55 °С, 30 сек. (асоціація

праймерів), +72 °C, 30 сек. (ампліфікація). Для припинення реакції реакційну суміш охолоджували до температури 4 °C.

Усі реакції проводили в трьох повторах. Кількісна оцінка продуктів ампліфікації здійснювалась шляхом порівняння із кількістю продукту ампліфікації бета-актину.

2.3.4. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному гелі

Аналіз продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в 0,7% агарозному гелі. Агарозу розчиняли у однократному буфері TAE (0,14 M Tris-HCl; 20 mM оцтова кислота, 2 mM EDTA (pH 8,0) шляхом нагрівання до 100 °C. Потім цей розчин охолоджували до 50 °C і вносили у форму для електрофоретичної камери для полімеризації на 35 – 40 хв при кімнатній температурі.

До продуктів ампліфікації додавали TRIS-ацетатний буфер з EDTA (TAE буфер) для нанесення. У кожну лунку вносили по 5 – 10 мкл зразка, а в окрему лунку – 5 мкл маркера молекулярної маси ДНК (GeneRuler 100-bp DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, США) для визначення розміру фрагментів. Електрофоретичний аналіз проводили при напрузі 10 В/см протягом 60 хвилин. Після закінчення електрофорезу, ДНК забарвлювали флуоресцентним барвником SYBR* Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, США) і детектували на цифровій фотокамері 168P (*Mintron*, Тайвань) в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм.

2.3.5. Вестерн-блот аналіз протеїнів

Виділення екстрактів протеїнів із субліній клітин гліоми та астроцитів здійснювалось за раніше описаною методикою [187]. Культуральні чашки (d=10 см) з культурою клітини лінії U87 поміщались на лід. Клітини промивали забуференим фосфатом фізіологічний розчин 0,14 моль (0,85%) (Phosphate buffered saline, PBS) для видалення залишків поживного

середовища. До чашок вносили 1 мл фосфатно-сольового буферу, зішкрібали клітини з дна чашок. Далі клітини переносили у мікроцентрифужні пробірки та осаджували центрифугуванням протягом 30 сек при 3000 g. Ресуспендували осад клітин у 100 мкл охолодженого розчину А (10 ммоль/л HEPES-KOH, 1,5 ммоль/л MgCl₂, 10 ммоль/л KCl, 0,5 ммоль/л дитіотриітолу, 0,5 ммоль/л фенілметилсульфоніл флуориду, 1 ммоль/л бензамідину, 1 мг/л леупептину, 1 мг/л пепстатину А та 0,5% NP-40, рН 7,9 при 4°C) та інкубували на льоду протягом 10 хв. Супернатант, отриманий після центрифугування переносили у стерильну мікроцентрифужну пробірку та зберігали при -20°C.

Для проведення вестерн-блот аналізу використовували цитозольні фракції протеїнів. Концентрації протеїнів в екстрактах визначали спектрофотометрично, використовуючи реагент Coomassie Protein assay Reagent (Sigma-Aldrich, США) згідно інструкції виробника.

Протеїни розділяли електрофорезом у 10% поліакриламідному гелі з додецил-сульфатом натрію та переносили на PVDF мембрану (Immobilon-P Transfer Membrane; Millipore, США) шляхом напів-сухого переносу. Залишкові сайти зв'язування насичували інкубуючи мембрани у 5% розчині сухого молока в TPBS (фосфатно-сольовий буфер що містить 0.1% Tween 20). Для проявки використовували набір Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent kit (Invitrogen, США). Детекція сигналу проводилась у авторадіографічній касеті FisherBiotech (Fisher Scientific, США).

Для вестерн-блот аналізу рівня протеїну NAMPT у клітинах гліоми були використані поліклональні кролячі антитіла (rabbit anti-visfatin, PBEF (412-431) (human) IgG, G-003-82) із компанії "Phoenix Pharmaceuticals, Inc" (США), для визначення ATF6 - anti-ATF6α мишачі моноклональні антитіла (Santa Cruz Biotechnology), для HIF-1α – поліклональні кролячі антитіла (anti-HIF-1α antibody із Novus Biologicals), а для визначення бета-актину (ACTB) використовували поліклональні кролячі антитіла із компанії "Santa Cruz Biotechnology" або моноклональний IgG миші (Mouse monoclonal [mAbcam 8224] to beta Actin) із компанії "Abcam", США.

Протеїни розділяли електрофорезом у 10% поліакриламідному гелі з додецил-сульфатом натрію. Перенос протеїнів на PVDF мембрану (Millipore, Німеччина) здійснювався з допомогою електроблотера (Bio-Rad, США) протягом 90 хв при 60 В. Після трансферу мембрану блокували у 5% розчині сухого молока в TPBS (фосфатно-сольовий буфер що містить 0.1% Tween 20). Для детекції протеїнів використовували реагенти для проявки WesternBright ECL (Advansta, США).

2.3.6. Зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT шляхом РНК-інтерференції

Для експериментів із siRNA були використані специфічна до PBEF/NAMPT siRNA (h) (sc-45873) та контрольна siRNA-A (sc-37007) із компанії “Santa Cruz Biotechnology”, США. Для трансфекції ці РНК розводили спеціальним буфером (siRNA Dilution Buffer sc29527) і вносили в систему трансфекції до кінцевої концентрації 100 нМ. Трансфекцію проводили протягом 5 годин, використовуючи lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, США). Після цього змінювали середовище на DMEM і інкубували ще 43 години. Далі виділяли РНК та екстракти протеїнів з культури клітин, як описано раніше. Чистоту препаратів РНК оцінювали по спектрам поглинання на спектрофотометрі NanoDrop.

2.4. Статистична обробка результатів

Результати кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі обробляли з допомогою програмного пакету „Differential expression calculator”, для статистичного аналізу використаний двовибірковий t-тест для середнього, обчислення проводили в програмному пакеті Excel. Результати виражали як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна похибка середнього. При значенні $p < 0,05$ різницю між двома середніми приймали за достовірну [188].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Експресія генів, продукти яких контролюють процеси проліферації, виживання та міграції у клітинах гліоми за умов пригнічення функції сигнального протеїну IRE1 та зниження рівня мРНК NAMPT

З метою виявити молекулярні механізми взаємодії на генному рівні, ми дослідили експресію мРНК пухлинозалежних генів *PERK*, *ATF6*, *ATF3*, *BRCA1*, *DEK*, *BIRC5*, *GLO1*, *COL6A1*, *RAB5A* та *TGM2* за умови блокування активності протеїну IRE1/ERN1, а також за умови зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT внаслідок РНК-інтерференції в клітинах гліоми.

Відомо, що NAMPT є потужним регулятором енергетичного балансу в усіх типах клітин як в нормі, так і за патологій. Раніше було показано, що пригнічення функціональної активності IRE1, як і фармакологічне інгібування NAMPT сповільнює процеси проліферації в пухлинах гліоми [8, 14, 16]. Оскільки NAMPT відіграє важливу роль у регуляції процесів проліферації як в нормі, так і при пухлиноутворенні, можна припустити, що даний ензим задіяний в регуляції росту гліомних пухлин та пригнічення їх проліферації при інгібуванні сенсорно-сигнального ензиму IRE1. Тому для нас було важливим дослідити експресію генів за умови блокади IRE1, а також сайленсінгу NAMPT та порівняти отримані результати для розкриття механізмів пухлинного росту.

На початковому етапі наших досліджень завданням було вивчити залежність експресії NAMPT від функціонування протеїну IRE1/ERN1 в клітинах гліоми лінії U87. Було показано, що рівень експресії *NAMPT* за умов пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1/ERN1 в клітинах гліоми значно знижується (майже у 17 разів) у порівнянні з не модифікованими клітинами гліоми цієї ж лінії (Рис. 3.1). За умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності протеїну IRE1/ERN1 також спостерігається різке зниження рівня експресії мРНК *NAMPT*, що свідчить про

опосередкованість регуляції експресії цього гена саме ендорибонуклеазою IRE1. За індукції стресу EP тунікаміцином ми спостерігали підвищення (майже вдвічі) рівня експресії мРНК *NAMPT*, у порівнянні з сублінією клітин з *dnIRE1* (Рис. 3.1). Отримані данні свідчать про багатогранність стрес-опосередкованих механізмів регуляції даного гена і можливу причетність як протеїнкінази IRE1, так й інших сигнальних систем стресу EP.

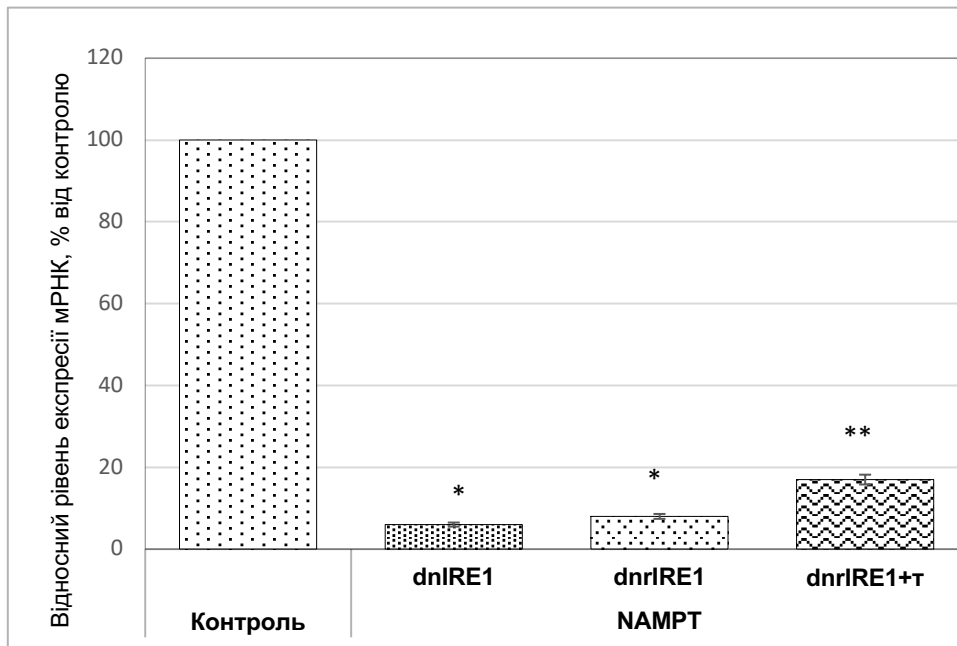


Рис. 3.1. Рівень експресії мРНК *NAMPT/PBEF* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором *pcDNA3.1* (Контроль), та сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (*dn-IRE1*), а також лише ендорибонуклеазної активності (*dnr-IRE1*). Значення експресії *NAMPT/PBEF* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100 % (Контроль). Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * - $p < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Отримані дані вестерн-блот аналізу також показують різке зниження рівня протеїну NAMPT, як за умов пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1/ERN1 (*dnIRE1*), так і в сублінії лише з кіназною активністю (*dnrIRE1*), до рівня ензиму NAMPT в нормальних аastroцитах людини лінії

NHA/TS (Рис.3.2). Це спостереження повністю узгоджується із даними, отриманими за допомогою кількісної ПЛР (Рис.3.1).

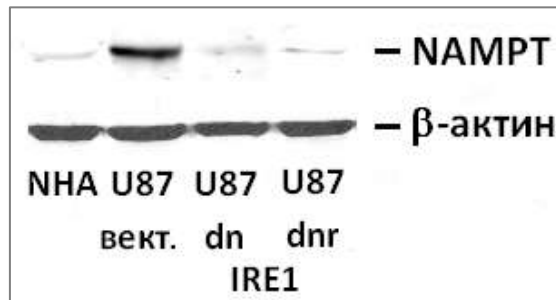


Рис. 3.2. Рівень протеїну NAMPT у клітинах гліоми лінії U87 та в сублініях цих клітин з повним пригніченням функції сигнального ензиму IRE1/ERN1, трансфікованих домінант-негативною конструкцією IRE1/ERN1 (dnIRE), або частковим пригніченням його активності, а саме лише ендорибонуклеазної, (dnrIRE), а також у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. В якості контролю кількості протеїнів, взятих для аналізу, використовували бета-актин (β -актин).

Оскільки NAMPT є стрес-залежним протеїном та координує процеси метаболізму, проліферації і апоптозу, зниження рівня його експресії за умов блокади функціональної активності IRE1 повністю узгоджується з даними про пригнічення проліферації клітин гліоми за даних умов [1, 14, 189].

Наступним етапом було провести біоінформатичний аналіз 3'кінцевих некодуючих послідовностей мРНК NAMPT, з метою дослідити можливі механізми його взаємодії з сигнальним протеїном IRE1/ERN1. В ході аналізу було виявлено наявність численних сайтів зв'язування на послідовності мРНК NAMPT для багатьох miRNA, зокрема для *miR-182* (Рис. 3.3). У зв'язку з цим, ми провели дослідження рівня експресії *miR-182* у гліобlastомах у порівнянні з умовно нормальною тканиною, а також у клітинах гліоми лінії U87 у порівнянні з нормальними астроцитами людини та у клітинах гліоми лінії U87

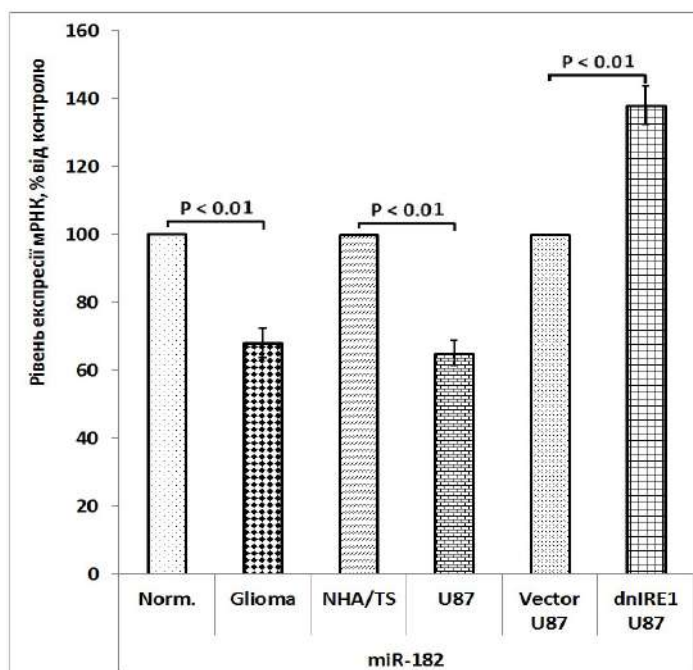


Рис. 3.4. Рівень експресії мікроРНК *miR-182* в умовно нормальній тканині головного мозку (Norm.) та гліобlastомах (Glioma) людини, у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS та клітинах гліоми лінії U87, а також у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector), та сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1). Інтенсивність експресії *miR-182* нормалізували по рівню експресії мРНК *GAPDH* і виражали у % по відношенню до контролю, прийнятого за 100 %; n = 3.

Наступним кроком було дослідити рівень експресії мРНК генів з різною функціональною активністю за умов інгібування IRE1/ERN1 та нокдауну мРНК та протеїну NAMPT внаслідок РНК-інтерференції.

В ході дослідження нами показано, що трансфекція клітин гліоми лінії U87 специфічною до NAMPT siRNA істотно знижує рівень мРНК NAMPT (на 82 %) (Рис. 3.5), а також протеїну (Рис. 3.6), що кодується даною мРНК, через 48 годин після трансфекції у порівнянні з клітинами гліоми, трансфікованими контрольною (неспецифічною) siRNA.

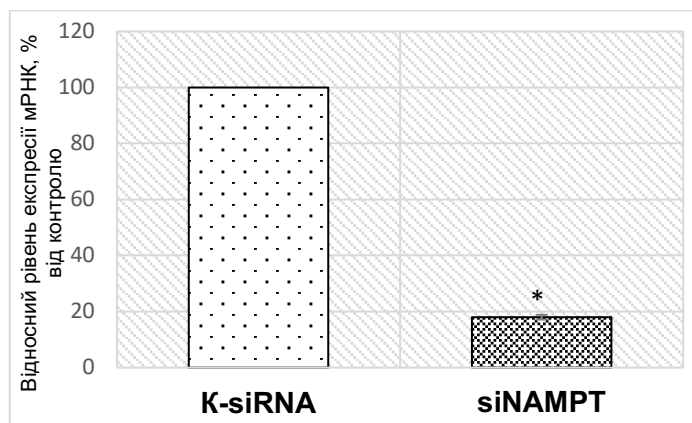


Рис. 3.5. Рівень експресії мРНК *NAMPT* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК *NAMPT* siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *NAMPT* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (K-siRNA).

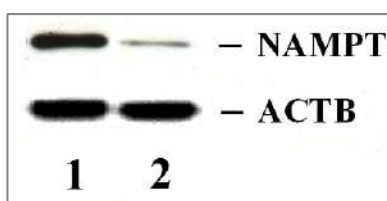


Рис. 3.6 Рівень протеїну *NAMPT* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих неспецифічною (1) та специфічною до мРНК *NAMPT* (2) siRNA. Рівень АСТВ (бета-актин) є додатковим контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

При дослідженні рівня експресії *PERK*, що кодує один з сигнальних протеїнів стресу ER, у сублініях клітин гліоми з повним пригніченням активностей IRE1 (dnIRE1) не виявлено істотних змін. Проте, в сублініях клітин зі дефіцитним рівнем *NAMPT* спостерігається зниження експресії мРНК *PERK* на 36 % у порівнянні з контролем (Рис. 3.7).

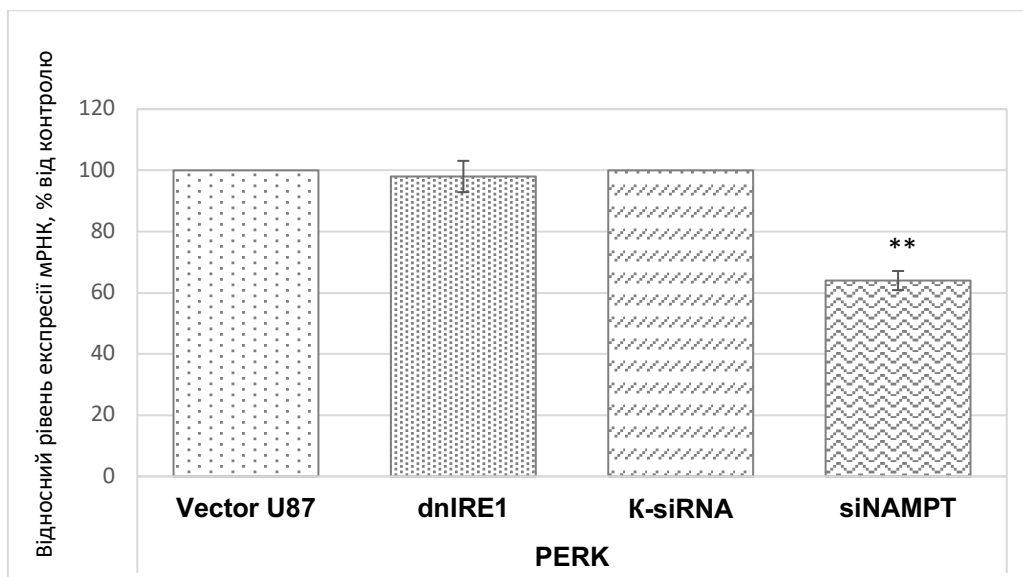


Рис. 3.7. Рівень експресії мРНК *PERK* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *PERK* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); ** – $P < 0.01$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Сигнальний протеїн ATF6 є представником третьої гілки стресу ER. Дослідження експресії мРНК *ATF6* у сублініях клітин гліоми з повним пригніченням активностей IRE1 (dnIRE1) демонструють істотне зниження рівня експресії мРНК даного гена на 41% у порівнянні з контролем, проте в сублініях клітин гліоми трансфікованих siNAMPT, зміни в експресії мРНК *ATF6* не зафіксовані (Рис. 3.8).

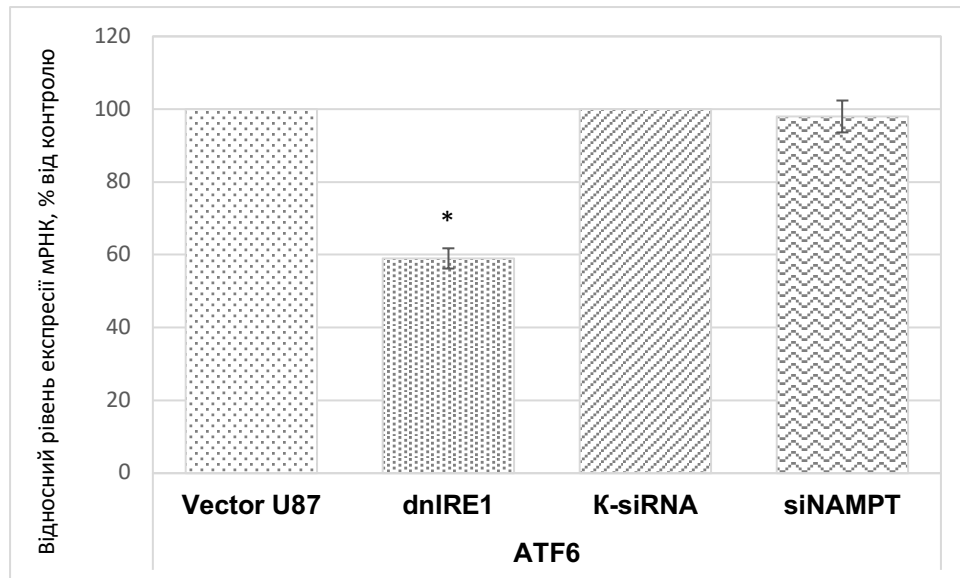


Рис. 3.8. Рівень експресії мРНК *ATF6* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *ATF6* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.01$ у порівнянні з контролем (Vector U87);

Транскрипційний фактор ATF3 контролює процеси проліферації, апоптозу та виживання [191]. За умови пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1/ERN1, експресія дослідженого гена знижується у 7 разів (Рис. 3.9). В той же час, ми спостерігали менш істотне зниження рівня експресії мРНК *ATF3* при нокдауні NAMPT (на 38%), в порівнянні з контролем 2 (K-siRNA) (Рис. 3.9). Таким чином, зміни в експресії мРНК *ATF3* йдуть в одному напрямку за умови інгібування активності IRE1 та сайленсінгу NAMPT. Отже, антипроліферативний ефект пригнічення IRE1 та NAMPT може бути обумовлений саме за рахунок зняження експресії активатора проліферації ATF3.

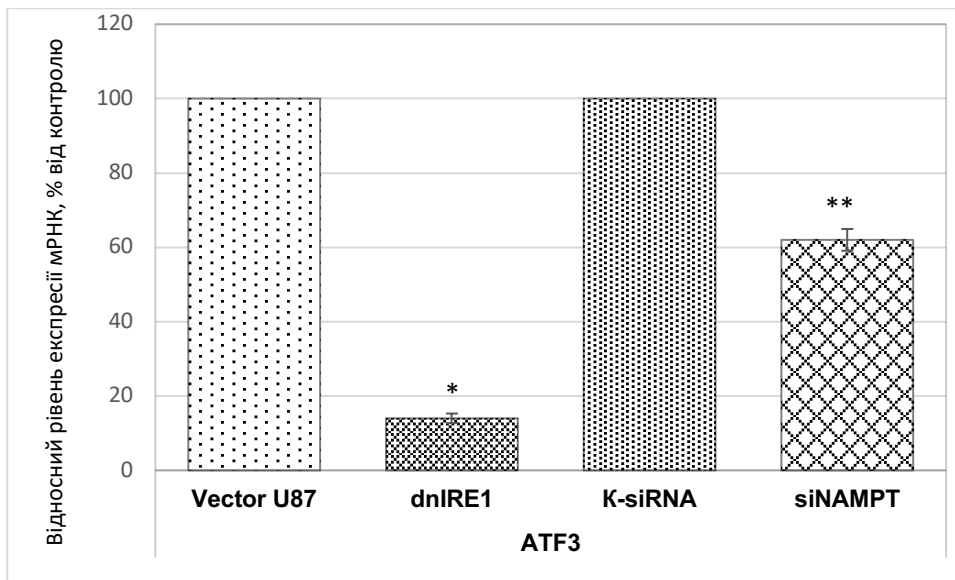


Рис. 3.9. Рівень експресії мРНК транскрипційного фактора *ATF3* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *ATF3* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0,001$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.01$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Були також проведені дослідження експресії мРНК *BRC1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих специфічною до мРНК *NAMPT* siRNA у порівнянні з K-siRNA, які показали зниження рівня експресії мРНК *BRC1* на 21%, у порівнянні з контролем. Із даних, наведених на Рис. 3.10 видно, що рівень експресії мРНК цього гена підвищується на 83 % у клітинах гліоми з пригніченою активністю сигнального протеїну IRE1, в порівнянні з контрольними клітинами, що були трансфіковані вектором pcDNA3.1 (Рис. 3.10).

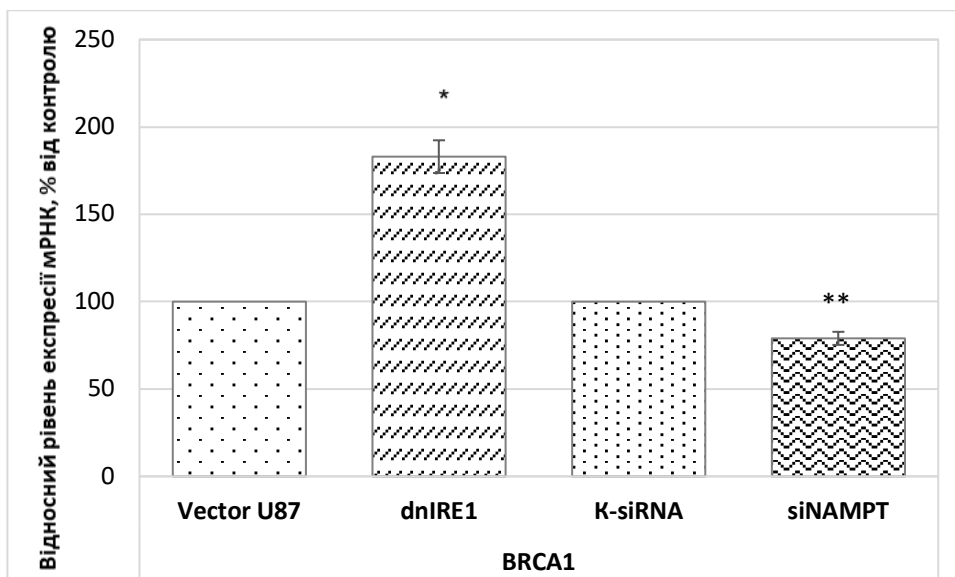


Рис. 3.10. Рівень експресії мРНК *BRCA1* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *BRCA1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Як видно із даних, представлених на Рис. 3.11, експресія мРНК *DEK*, продукт якого індукує процеси проліферації, знижується в клітинах гліоми з повним пригніченням ензиматичних активностей IRE1/ERN1 та після сайленсінгу NAMPT на 18% та 35%, відповідно.

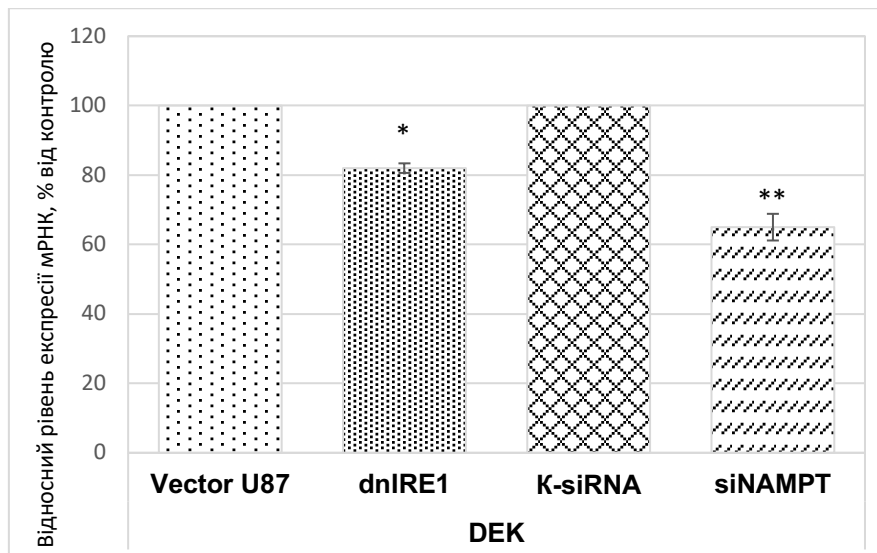


Рис. 3.11. Рівень експресії мРНК *DEK* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *DEK* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.01$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

При дослідженні гена *BIRC5*, що кодує протеїн сурвівін з вираженою про-проліферативною активністю, в клітинах гліоми з повним пригніченням IRE1/ERN1 виявлено зниження рівня експресії даного гена на 40 % (Рис.3.12). У сублініях клітин, трансфікованих siRNA NAMPT спостерігається дерегуляція експресії мРНК даного гена, а саме істотне підвищення експресії *BIRC5* на 358% в порівнянні з контролем (Рис.3.12).

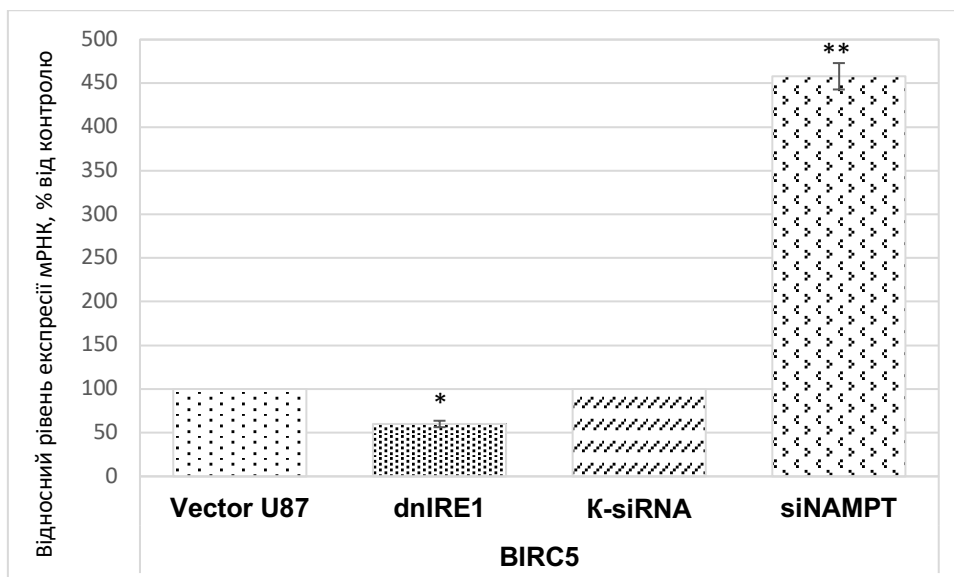


Рис. 3.12. Рівень експресії мРНК *BIRC5* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *BIRC5* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.01$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Дослідження експресії мРНК *GLO1* у сублініях клітин гліоми з повним пригніченням активностей IRE1 (dnIRE1) демонструють стрімке зниження експресії мРНК даного гена на 91% у порівнянні з контролем (Рис. 3.13). Однак, в сублініях клітин, трансфікованих специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT), зміни в експресії мРНК *GLO1* не були виявлені (Рис. 3.13).

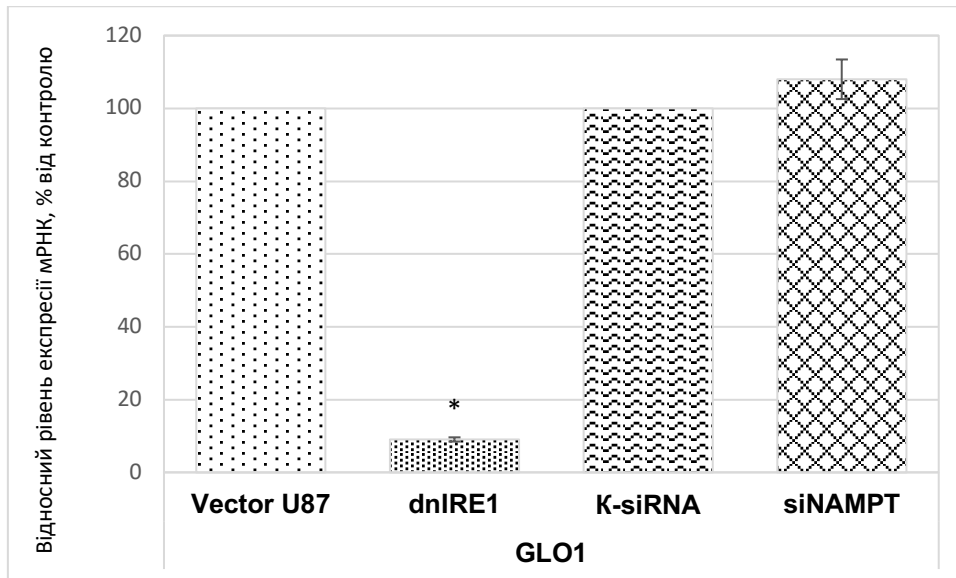


Рис. 3.13. Рівень експресії мРНК *GLO1* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *GLO1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (Vector U87);

Отже, в більшості випадків за умови пригнічення функціональних активностей IRE1/ERN1 спостерігається зниження експресії генів, що узгоджується з літературними даними про IRE1-опосередковане пригнічення проліферації пухлин гліоми [1, 9, 48]. За умов сайленсінгу NAMPT виявлена дерегуляція мРНК більшості досліджених генів, та протилежно спрямовані зміни їх експресії.

Наступним етапом було дослідити рівень експресії генів *COL6A1*, *RAB5C* і *TGM2* продукти яких регулюють процеси інвазії, міграції та ангіогенезу в пухлинних клітинах різного типу.

При дослідженні експресії гена *COL6A1* (collagen, type VI, alpha 1) було показано значне зниження експресії мРНК *COL6A1* на 72% у клітинах гліоми

трансфікованих dnIRE. Із даних, наведених на рис. 3.14 видно, що сайленсінг NAMPT істотно не впливає на рівень експресії мРНК *COL6A1*.

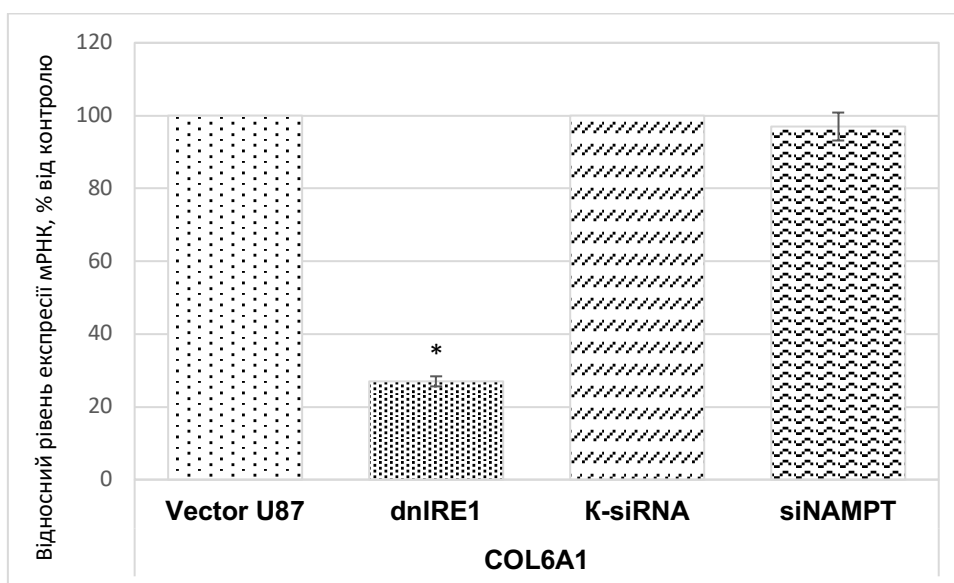


Рис. 3.14. Рівень експресії мРНК *COL6A1* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *COL6A1* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (Vector U87);

Рівень експресії гена *RAB5C* (RAB5a, member RAS oncogene family) за умови пригнічення функції IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 зменшується на 77% у порівнянні з контролем (Рис. 3.15). В сублінії клітин гліоми, трансфікованих siRNA, специфічною до мРНК NAMPT, було виявлено різке підвищення експресії даного гена на 167 % (Рис. 3.15).

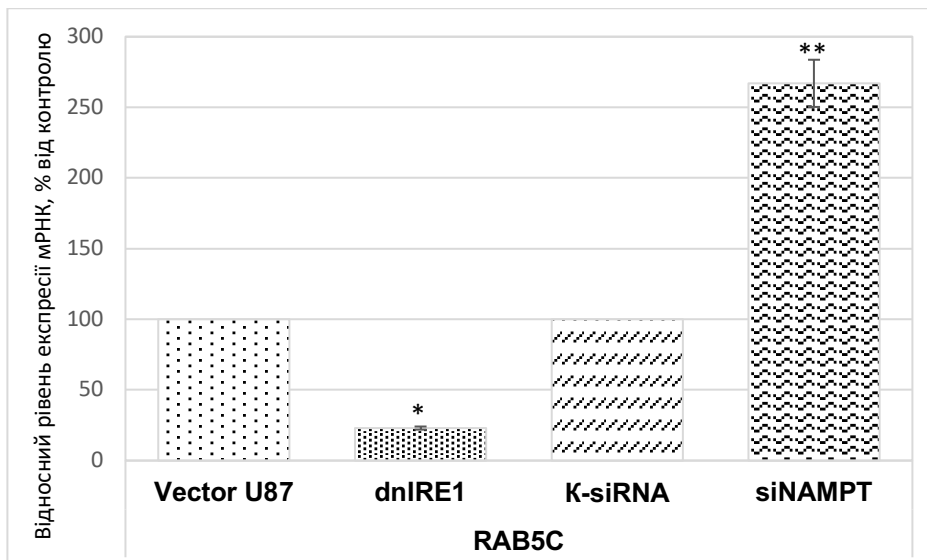


Рис. 3.15. Рівень експресії мРНК *RAB5A* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *RAB5A* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Результати, які наведені на Рис. 3.16 продемонстрували високу чутливість гена *TGM2* до зниження рівня NAMPT, а саме рівень експресії мРНК дослідженого онкогена істотно підвищується на 126 % в порівнянні з контролем. Водночас, в сублінії клітин гліоми лінії U87 з пригніченим IRE1 спостерігається зменшення експресії мРНК *TGM2* на 92 %, у порівнянні з контролем (Рис. 3.16).

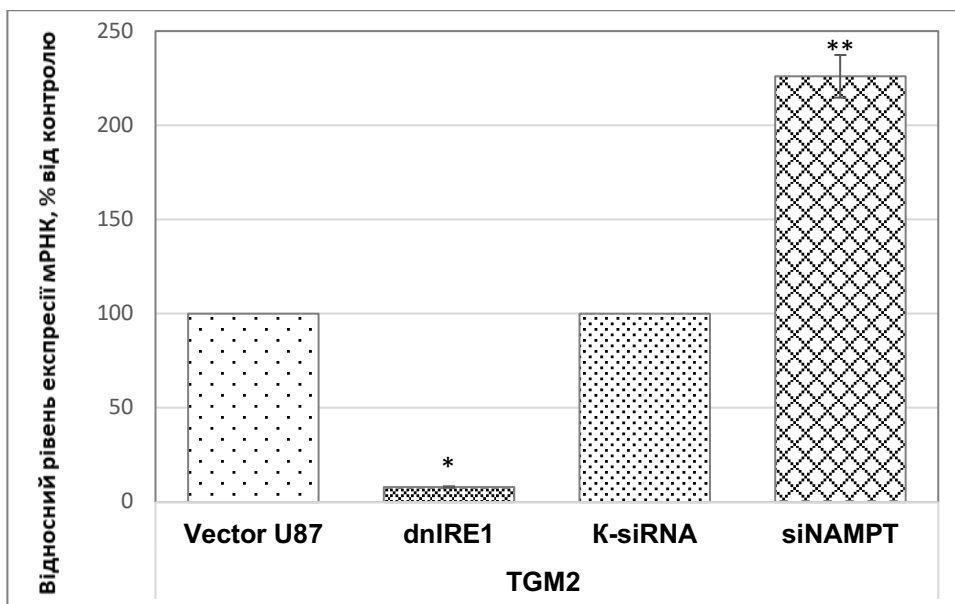


Рис. 3.16. Рівень експресії мРНК *TGM2* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector U87), та в сублініях клітин гліоми з пригніченням як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 (dnIRE1), а також трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *TGM2* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем (Vector U87); ** – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

COL6A1, *RAB5C* та *TGM2* відіграють важливу роль в онкогенезі, а надекспресія даних генів асоціюється із набуттям інвазивних властивостей, міграцією та метастазуванням в пухлинних клітинах [123, 128, 129, 192]. Пригнічення кіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1 в клітинах гліоми веде до зниження рівня експресії мРНК даних генів у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані дані узгоджуються із спостереженнями, що виключення функціональної активності IRE1/ERN1 в клітинах гліоми призводить до зменшення проліферації та уповільнення росту пухлини [1, 9]. Проте було показано, що сайленсінг NAMPT дерегулює та

навпаки посилює експресію мРНК *RAB5C* та *TGM2*, що свідчить про наявність складних міжгенних взаємодій і репрограмування геному за умов порушення його функціональної цілісності.

3.2. Експресія асоційованих із пухлинним ростом генів за умов сайленсінгу мРНК NAMPT

NAMPT є ключовим регулятором метаболізму, проліферації та виживання онкоклетин, проте механізми його функціонування в середині клітини та в позаклітинному середовищі до кінця не з'ясовані [80, 193–196].

Відомо, що інгібування NAMPT специфічними інгібіторами пригнічує інтенсивність проліферації онкоклетин, знижує рівень NAD та експресію 325 протеїнів, включаючи протеїни залучені до процесів репарації ДНК (PCNA та PARP1) та антиоксидантних механізмів (GRX1) [79, 80]. Тому вивчення регуляції експресії генів за умов пригнічення NAMPT є надзвичайно актуальним для розуміння механізмів антипухлинного росту в гліомах.

Отже, в роботі досліджувалась експресія генів з різною функціональною активністю, дерегуляція яких спостерігається при злоякісній трансформації, а їх протеїни координують з процесами проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування. Нами були обрані гени *Ki-67(MKI67)*, *PCNA*, *LIF*, *TPD52*, *CLU*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *IRS1*, *IGFBP3*, *BNIP3*, *PER2*, *HK2* та *GADD45A*, продукти яких асоційовані з процесами метаболізму, проліферації, виживання, біологічного годинника та апоптозу.

Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 зі зниженим рівнем мРНК та протеїну NAMPT в результаті дії специфічної до NAMPT siRNA істотно знижується рівень експресії маркера проліферації *Ki-67* (MKI67) на 25% та гена *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) на 28% відповідно (Рис. 3.17). Таким чином, зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT асоціюється із пригніченням інтенсивності проліферації клітин гліоми за умов сайленсінгу NAMPT.

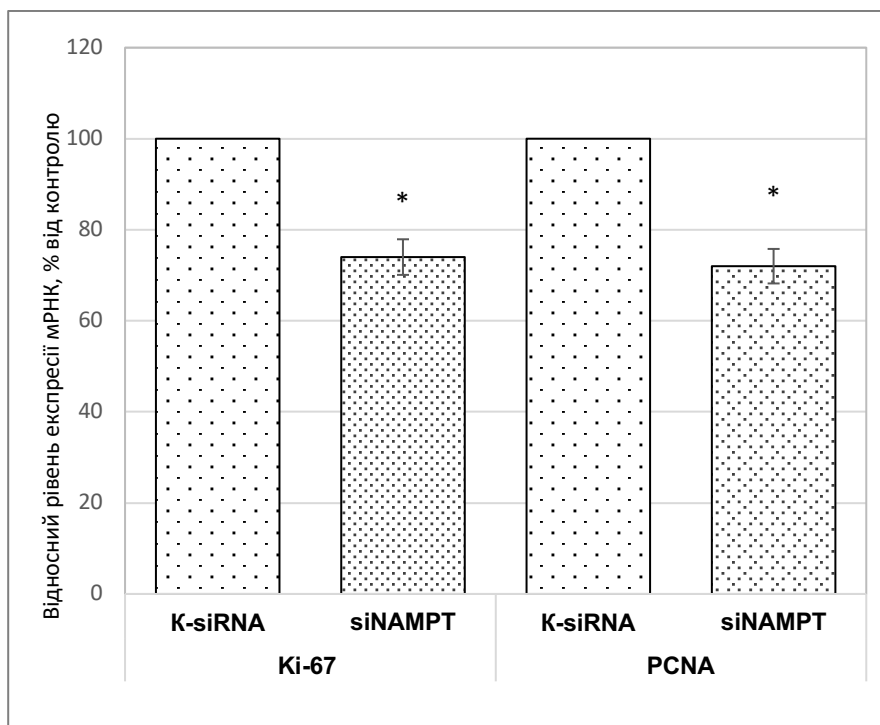


Рис. 3.17 Рівень експресії мРНК маркера проліферації *Ki-67* (*MKI67*) та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *Ki-67* та *PCNA* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем (Vector U87);

LIF являється плейотропним цитокином та гіперекспресується в пухлинах різного типу [106]. Було показано, що рівень мРНК *LIF* в сублінії клітин гліоми трансфікованих siRNA NAMPT знижується на 21% в порівнянні з контролем, водночас, істотних змін рівня експресії мРНК онкогена *TPD52* за умов сайленсінгу NAMPT не було виявлено (Рис. 3.18).

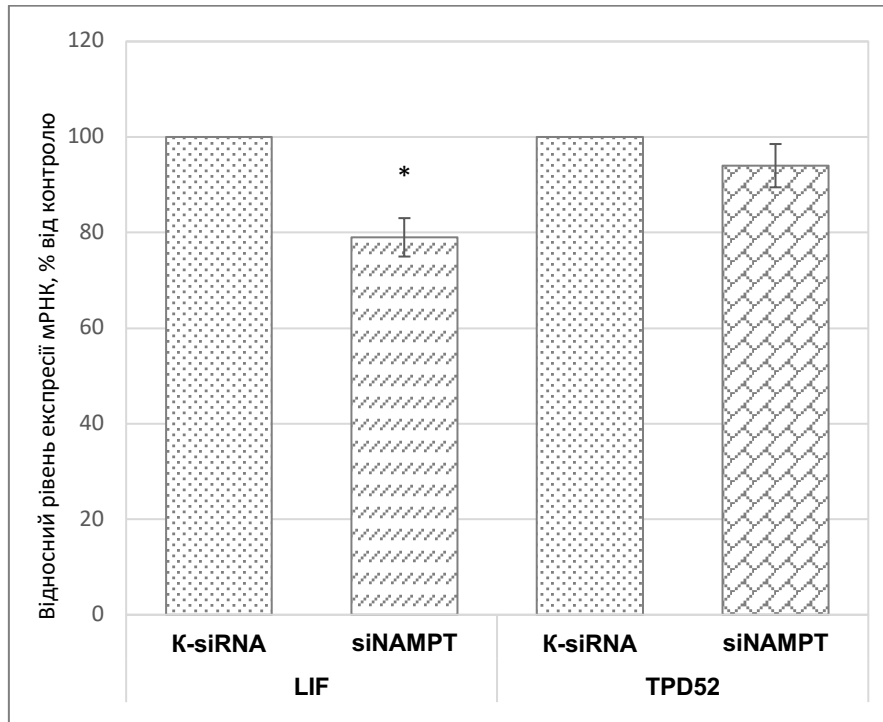


Рис. 3.18. Рівень експресії мРНК транскрипційного фактора *LIF* та *TPD52* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (К-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *LIF* та *TPD52* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.05$ у порівнянні з контролем 2 (К-siRNA).

При дослідженні експресії *CLU*, що кодує регуляторний протеїн апоптичної відповіді було показано істотне зниження рівня мРНК в 25 разів у сублініях клітин гліоми зі siNAMPT, у порівнянні з контрольною siRNA (Рис. 3.19). Таким чином, зміни в експресії *CLU* за сайленсінгу NAMPT узгоджуються з даними про зниження проліферативної активності клітин гліоми за даних умов. При дослідженні онкогена *PSAT1*, підвищена експресія якого асоціюється з прогресуванням та метастазуванням пухлин різного типу, було показано, що рівень експресії його мРНК підвищується на 84% у клітинах гліоми у порівнянні з контролем (Рис. 3.19).

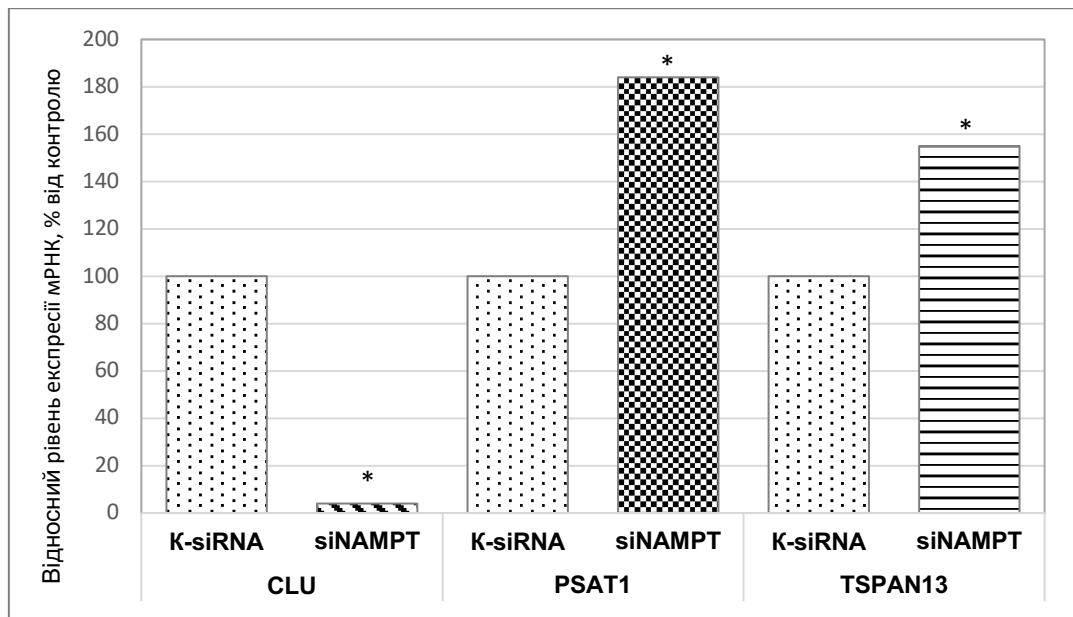


Рис. 3.19. Рівень експресії мРНК *CLU*, *PSAT1* та *TSPAN13* в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії дослідженої мРНК *CLU* нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%. Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * – $P < 0.001$ у порівнянні з контролем 2 (K-siRNA).

Онкопротеїн Тетраспанін 13 (Tetraspanin 13) проявляє про-проліферативну та проінвазивну активність в пухлинах різного типу [129]. Як видно із даних, представлених на Рис. 3.19, рівень експресії мРНК *TSPAN13* підвищується на 55 % у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченим за допомогою siRNA технології рівнем мРНК та протеїну NAMPT (Рис. 3.19).

Ми також дослідили вплив сайленсінгу NAMPT на рівень експресії мРНК *IGFBP3* та *IRS1*. *IRS1* субстрат -1 інсулінового рецептора, взаємодіє з інсуліновим рецептором (IGF1R) та являється центром збирання комплексу протеїнів, опосередковує контроль процесів трансдукції сигналу в клітинах за участю інсуліну та інсуліноподібного фактора росту, зокрема і в клітинах гліоми [80, 197, 198]. *IRS1* негативно регулюється *miR126* на пост-транскрипційному рівні, в результаті пригнічується проліферація пухлинних

клітин гліоми [135]. Нами було показано, що рівень експресії мРНК *IGFBP3* та *IRS1* значно підвищувався відповідно на 542% та 200% в клітинах гліоми за умов сайленсінгу мРНК NAMPT, в порівнянні з контролем (Рис. 3.20). Оскільки *IGFBP3* має виражений антипроліферативний та проапоптичний ефект, підвищення його експресії за нокдауну мРНК та протеїну NAMPT корелює з пригніченням проліферації клітин гліоми.

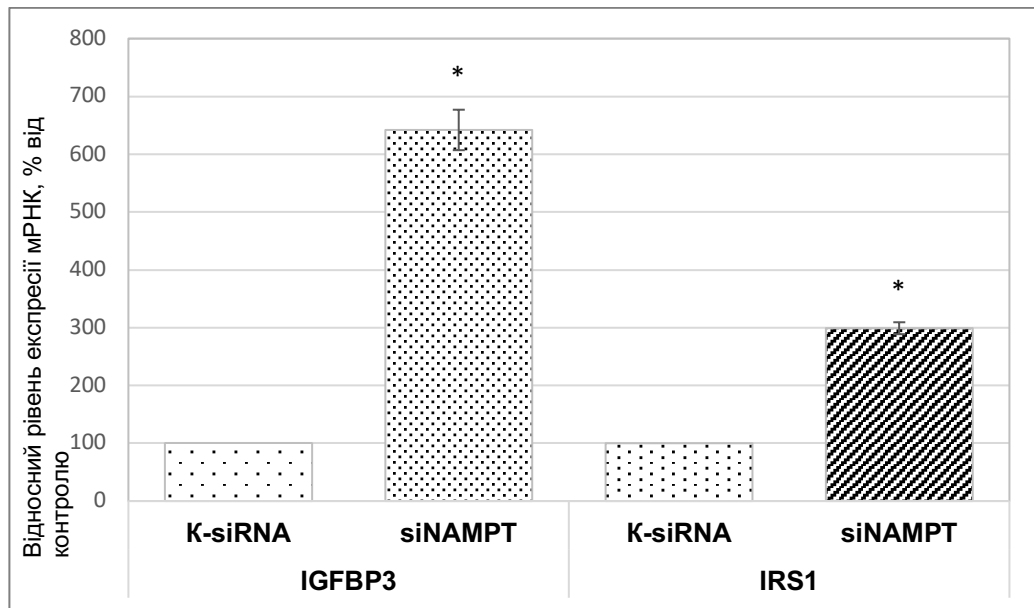


Рис. 3.20. Рівень експресії мРНК *IGFBP3* та *IRS1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії досліджених мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%; Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * - $p < 0,001$ у порівнянні з контролем.

Також було виявлено, що рівень експресії мРНК *BNIP3*, що кодує фактор росту та цитокін з вираженими про-апоптичними активностями знижується на 82% за умов сайленсінгу NAMPT в клітинах гліоми в порівнянні з контролем (Рис 3.21). Аналогічний, проте слабший ефект сайленсінгу NAMPT спостерігався при дослідженні *PER2* (circadian period regulator 2), а саме рівень

експресії мРНК знижувався на 42% у порівнянні з субліцією клітин, трансфікованих контрольною siRNA NAMPT (Рис 3.21). Отже, отримані результати експресії *PER2* та *BNIP3* корелюють з даними про пригніченням проліферації пухлин за умов інгібування NAMPT.

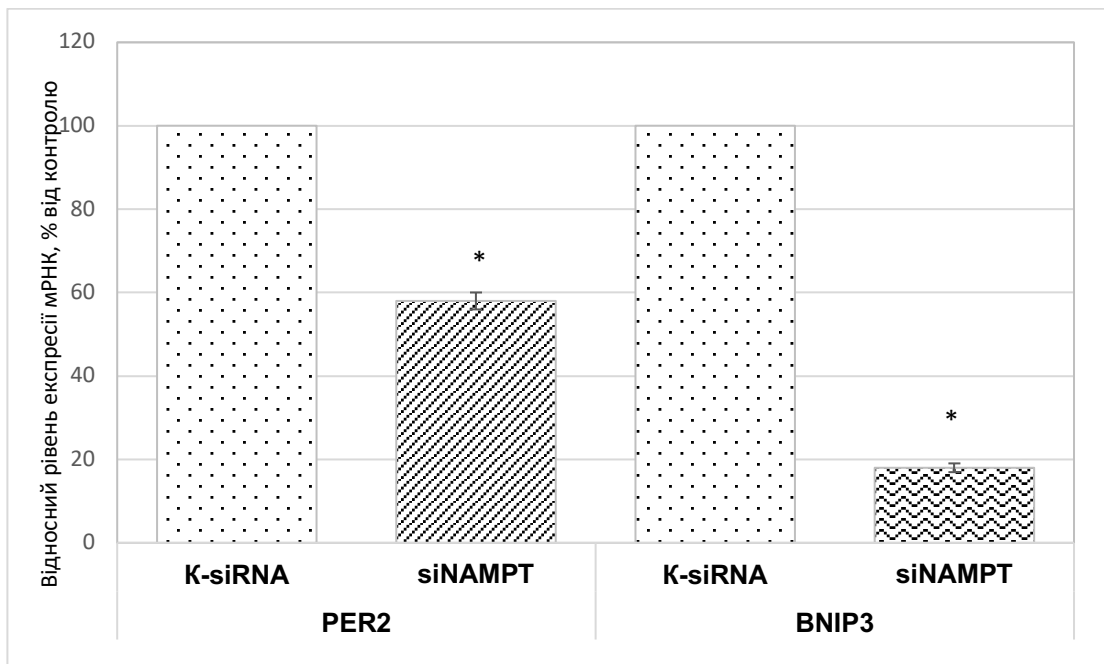


Рис. 3.21. Рівень експресії мРНК *BNIP3* та *PER2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії досліджених мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%; Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$); * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем.

При дослідженні генів, *GADD45A* (DNA-damage-inducible alpha protein) та *HK2* (hexokinase 2) істотних змін рівня експресії їх мРНК за умов сайленсінгу NAMPT не було виявлено (Рис.3.22).

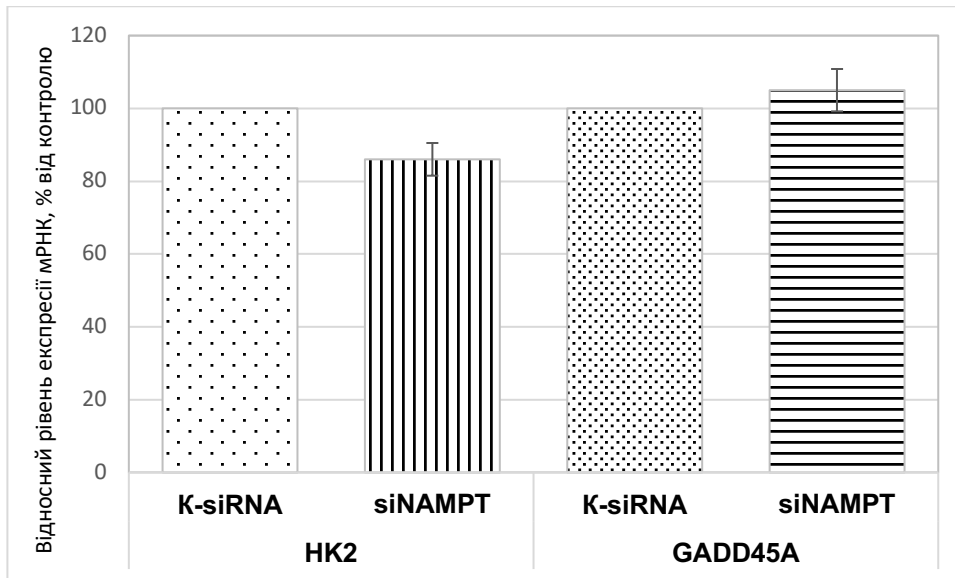


Рис. 3.22. Рівень експресії мРНК *GADD45A* та *HK2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих контрольною siRNA (K-siRNA) та специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT). Інтенсивність експресії досліджених мРНК нормалізували по рівню експресії мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю, прийнятий за 100%; Дані виражали як $M \pm m$ ($n = 4$);

3.3. Вплив гіпоксії на експресію генів, задіяних у контролі проліферативних процесів, у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від функціональної активності IRE1

Ми дослідили вплив гіпоксії на експресію генів *ATF6*, *PERK (EIF2AK)*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1*, *BCL2L1*, *HOMER3* і *GNPDA1*, регуляторів виживання та апоптозу, а також генів *ADGRE5*, *TGM2*, *COL6A1*, продукти яких асоційовані з інвазією, міграцією та ангіогенезом. В якості контролю були взяті клітини гліоми лінії U87, трансфіковані пустим вектором, а також генетично модифікований варіант цієї лінії клітин з повним пригніченням функціональної активності ензиму IRE1 (dnIRE1).

Було показано, пригнічення функціональної активності IRE1 модифікує гіпоксичну регуляцію експресії гена *ATF6*. Так, рівень експресії мРНК *ATF6* в нормальних клітинах гліоми знижується на 37%, проте в IRE1-дефіцитних клітинах зростає на 55% (Рис 3.23).

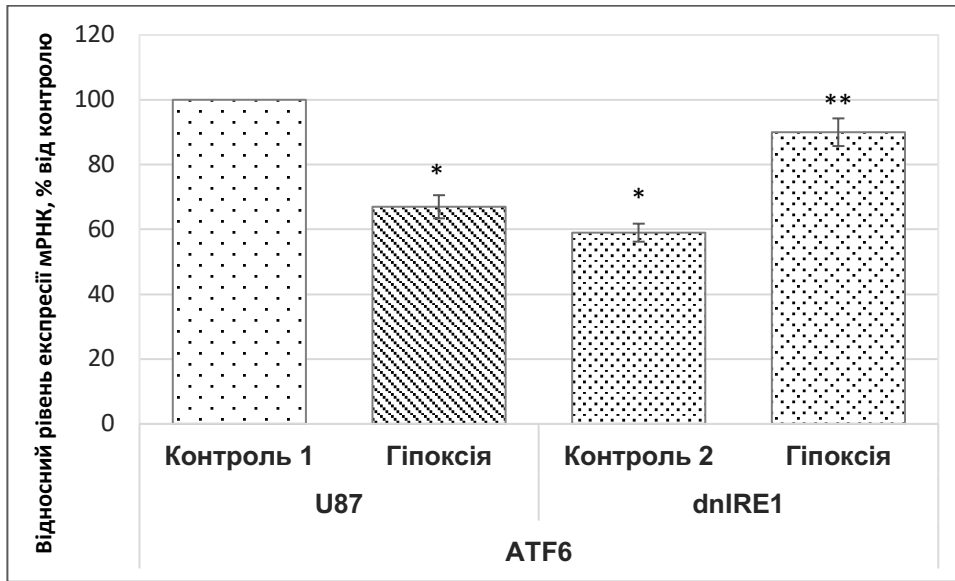


Рис. 3.23. Експресія мРНК *ATF6* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β-актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,01$ порівняно з контролем 1; ** – $P < 0,01$ порівняно з контролем 2.

На Рис. 3.24 і 3.25 представлені дані стосовно впливу гіпоксії на рівень експресії протеїнів ATF6 та HIF-1 α в контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих пустим вектором, і в сублініях цих клітин з повним пригніченням функції сигнального протеїну IRE1. Отримані результати рівня протеїну ATF6 узгоджуються з результатами по рівнях мРНК за даних експериментальних умов. Разом з тим, за гіпоксичних умов спостерігається підвищення рівня протеїну HIF-1 α як у контрольних клітинах гліоми, так і в клітинах з повним пригніченням функціональної активності IRE1 (Рис. 3.25). Отримані результати свідчать про те, що механізми регуляції рівня протеїну ATF6 не опосередковані транскрипційним фактором HIF-1 α , а мають більш складний характер та залежать від функціональної активності сигнального протеїну IRE1.



Рис. 3.24. Вплив гіпоксії на експресію протеїну ATF6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector), та сублінії цих клітин з пригніченням кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1/ERN1, стабільно трансфікованої домінант-негативною конструкцією (dnERN1), визначений з допомогою вестерн-блот аналізу. Nx – контроль, Hx – умови гіпоксії. Визначення бета-актину (β -actin) слугувало контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

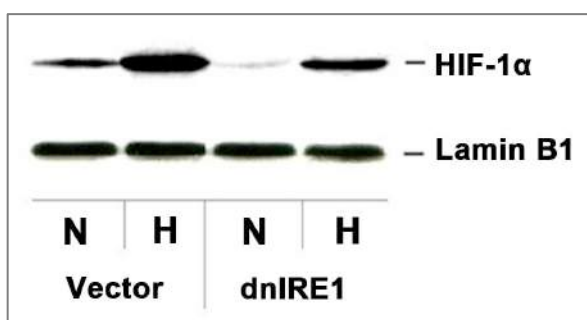


Рис. 3.25. Вплив гіпоксії на експресію протеїну HIF-1 α у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором pcDNA3.1 (Vector), та сублінії цих клітин з пригніченням протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1/ERN1, стабільно трансфікованої домінант-негативною конструкцією (dnERN1), визначений з допомогою вестерн-блот аналізу. N – контроль, H – умови гіпоксії. Визначення ламіну B1 (Lamin B1) слугувало контролем кількості протеїнів, взятих для аналізу.

У нормальних клітинах гліоми за умов гіпоксії спостерігається зростання відносної кількості мРНК *EIF2AK3* (*PERK*) на 41% відповідно до

контролю. В клітинах з пригніченням функціональної активності ензиму IRE1 ефект гіпоксії менш виражений, відносний рівень експресії мРНК *PERK* підвищується лише на 15% (Рис. 3.26).

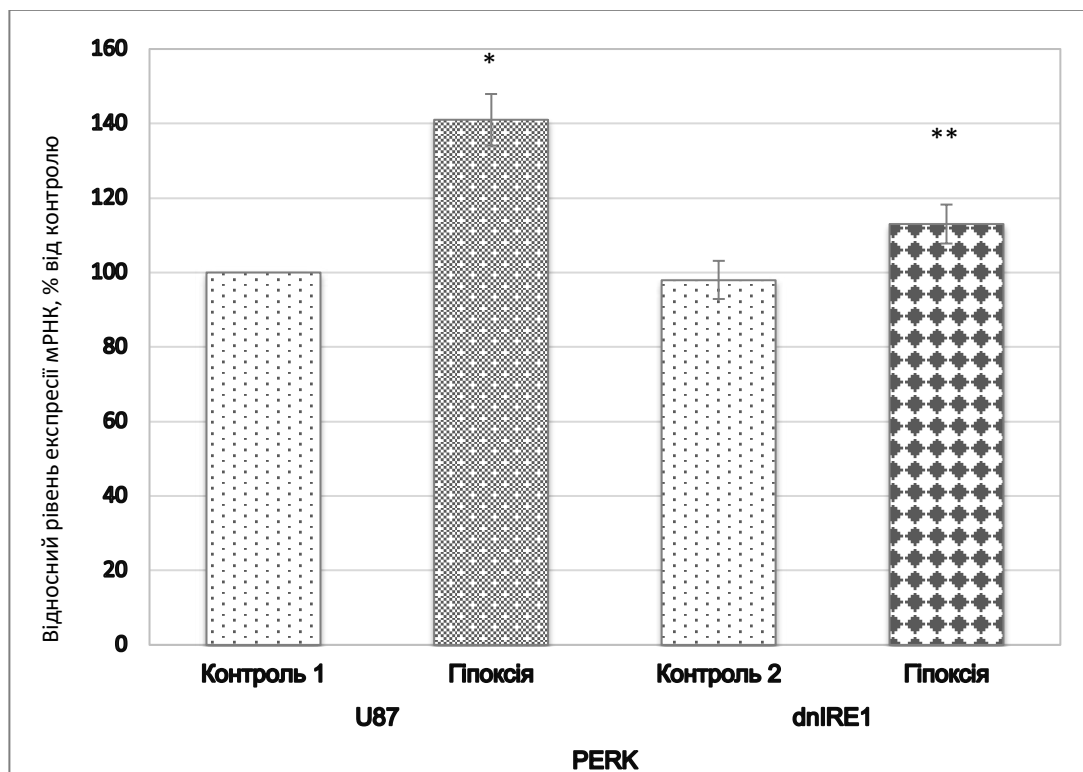


Рис. 3.26. Експресія мРНК *PERK* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,01$ порівняно з контролем 1; ** – $P < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Як показано на Рис. 3.27, в клітинах гліоми із нативним IRE1/ERN1 за умов гіпоксії спостерігається зниження відносного рівня експресії мРНК *DEK* на -28%, проте виключення активністю IRE1/ERN1 за даних умов усуває гіпоксичну регуляцію мРНК даного гена.

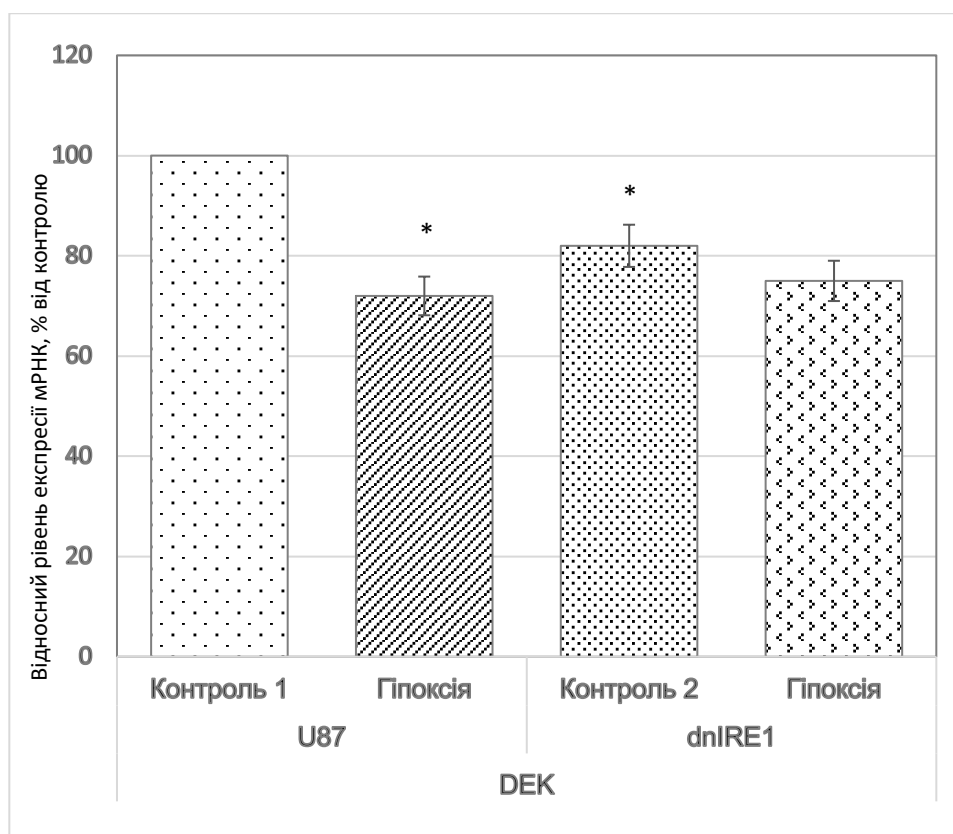


Рис. 3.27. Експресія мРНК *DEK* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем 1.

За умов гіпоксії також спостерігається незначне зниження відносного рівня експресії мРНК *GLO1* на 14%, а блокування активності IRE1 зводить нанівець гіпоксичну регуляцію гена гліоксилази 1 (3.28).

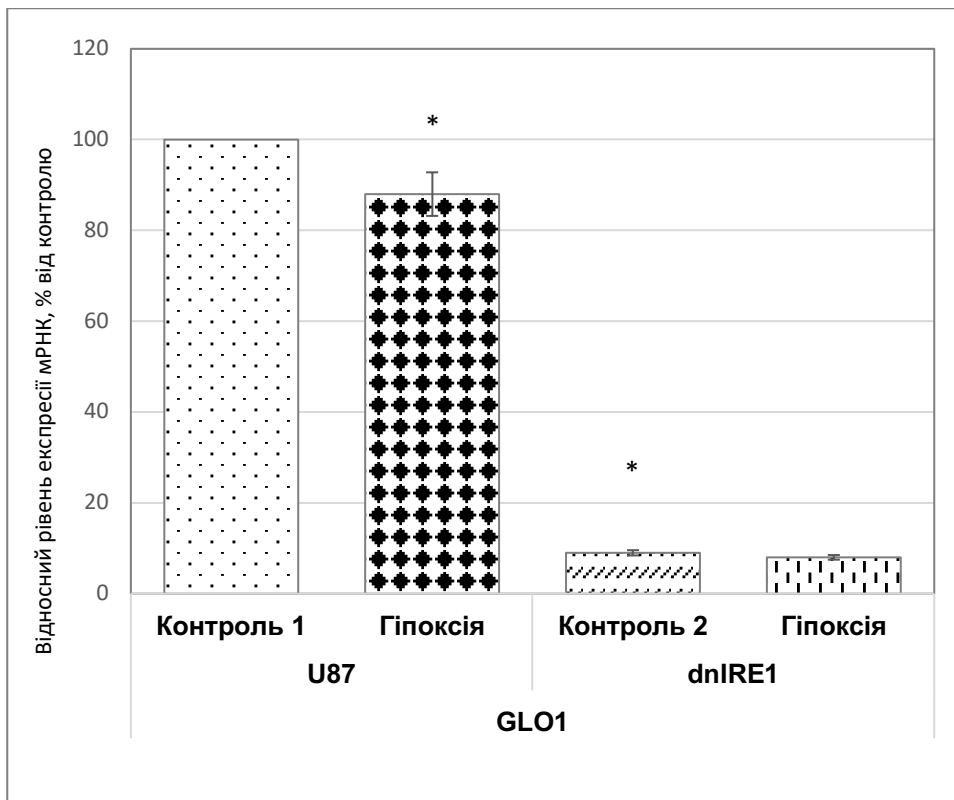


Рис. 3.28. Експресія мРНК гена *GLO1* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем 1.

Було також виявлено, що рівень експресії генів *BCL2L1* та *HOMER3* в клітинах гліоми змінюється у відповідь на гіпоксію лише за умов повного пригнічення протеїну IRE1/ERN1. Так, рівень експресії мРНК *BCL2L1* зростає за умов гіпоксії на 40% у клітинах гліоми з пригніченою активністю IRE1/ERN1 у порівнянні з контролем 2 (Рис. 3.29). У випадку з геном *HOMER3* показано, що рівень експресії мРНК знижується на 24% в умовах гіпоксії лише в сублінії з повним пригніченням функції IRE1/ERN1, порівняно з контролем 2 (Рис.3.30).

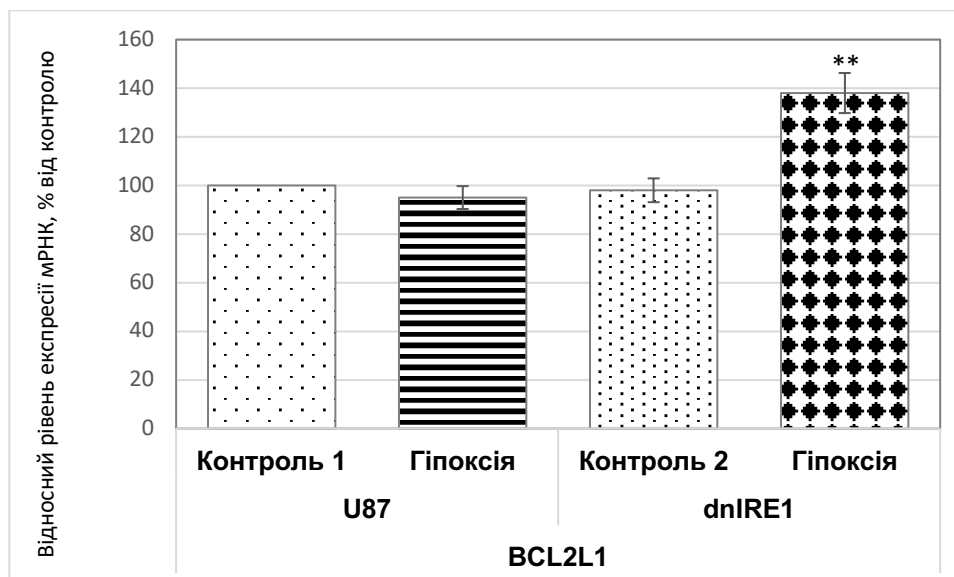


Рис. 3.29. Експресія мРНК гена *BCL2L1* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; ** – $P < 0,01$ порівняно з контролем 2.

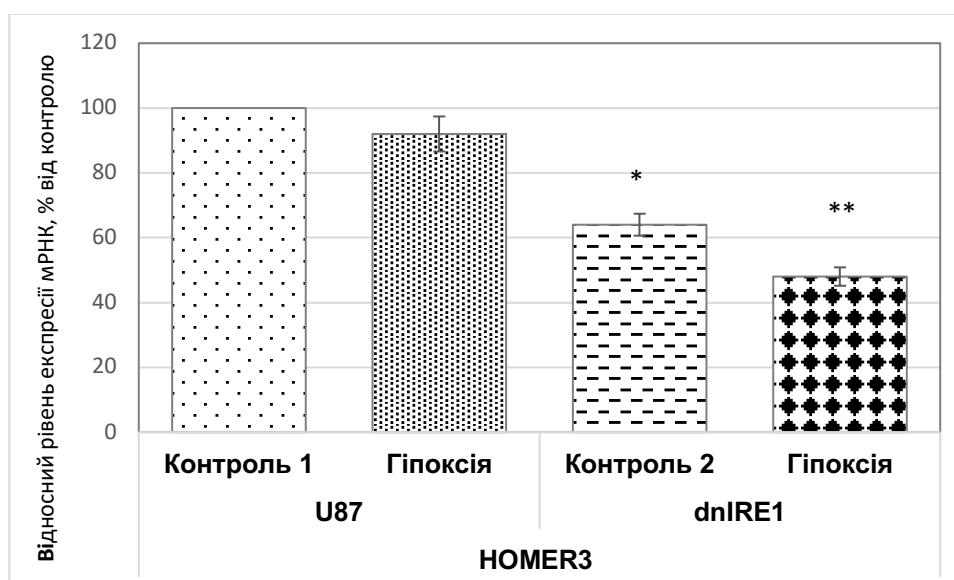


Рис. 3.30. Експресія мРНК гена *HOMER3* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -

актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем 1; ** – $P < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Експресія мРНК *GNPDA1* істотно знижується за умов гіпоксії у клітинах гліоми із нативним IRE1/ERN1 на 44%. У той же час, пригнічення ензиматичних активностей IRE1/ERN1 усуває гіпоксичну регуляцію гена *GNPDA1* (Рис. 3.31).

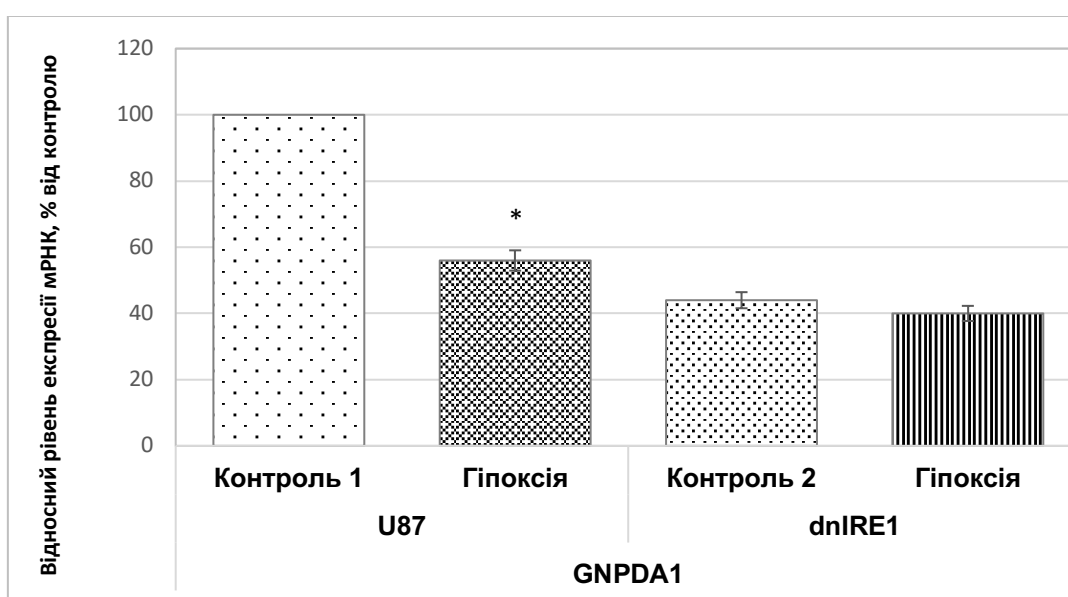


Рис. 3.31. Експресія мРНК гена *GNPDA1* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,01$ порівняно з контролем 1;

У ході проведених досліджень експресії гена *ADGRE5* було показано, що у контрольних клітинах гліоми гіпоксія не змінює відносний рівень експресії *ADGRE5* (Рис. 3.32). Проте в генетично модифікованих клітинах сублінії IRE1 (dnIRE1), що експресують функціонально неактивний протеїном IRE1, за умов

гіпоксії спостерігається значне підвищення відносного рівня експресії мРНК *ADGRE5* на 120% (Рис. 3.32).

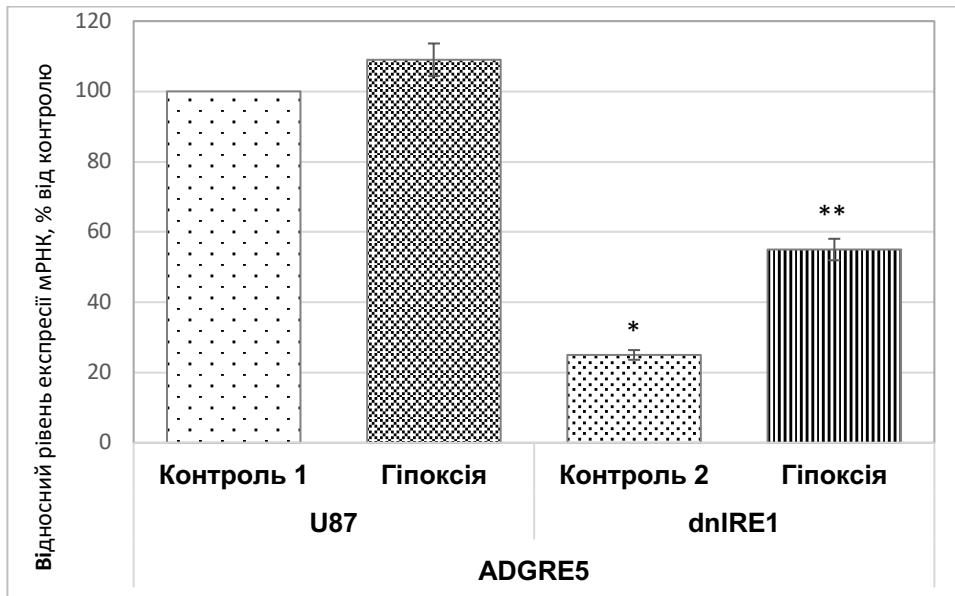


Рис. 3.32. Експресія мРНК гена *ADGRE5* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; ** – $P < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Було також досліджено вплив гіпоксії на відносний рівень експресії гена *TGM2*, що кодує поліфункціональний онкопротеїн. Показано, що відносний рівень експресії *TGM2* на рівні мРНК у нормальних клітинах гліоми зростає на 52 % за гіпоксичних умов (Рис. 3.33). Проте зміна функціональної активності IRE1 усуває гіпоксичну регуляцію даного гена (Рис. 3.33). Отримані дані свідчать про важливу роль сигнального шляху IRE1 в гіпоксичній регуляції експресії гена *TGM2*, що може бути вагомим внеском у репрограмування геному за пухлинного росту.

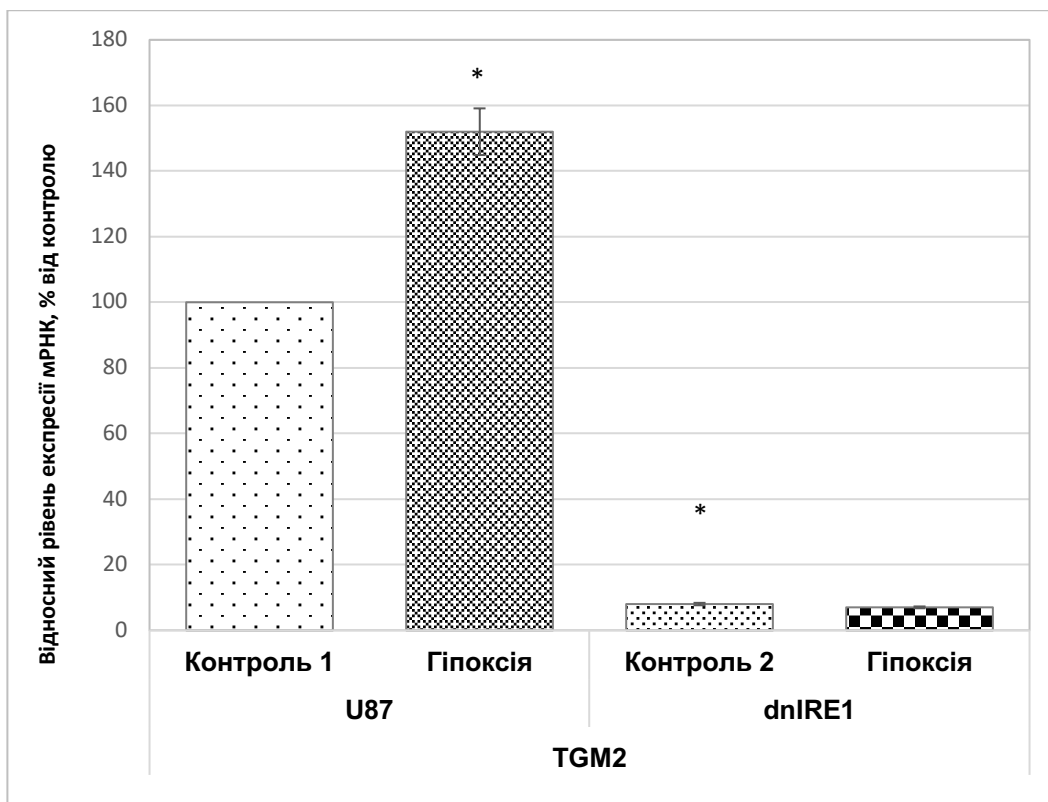


Рис. 3.33. Експресія мРНК гена *TGM2* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,01$ порівняно з контролем 1.

Рівень експресії *COL6A1* істотно зростає в онкоклітинах, та корелює зі ступенем важкості захворювання. Даний ген кодує протеїн позаклітинного матриксу, що задіяний у процесах міграції. [123]. Експресія мРНК *COL6A1* у клітинах гліоми із нативним IRE1/ERN1 зростає на 60% порівняно з контролем за гіпоксичних умов (Рис. 3.34). У той же час, ефект гіпоксії на експресію *COL6A1* є меншим (+18%) у клітинах гліоми із виключенням ензиматичних активностей IRE1/ERN1 (Рис. 3.34).

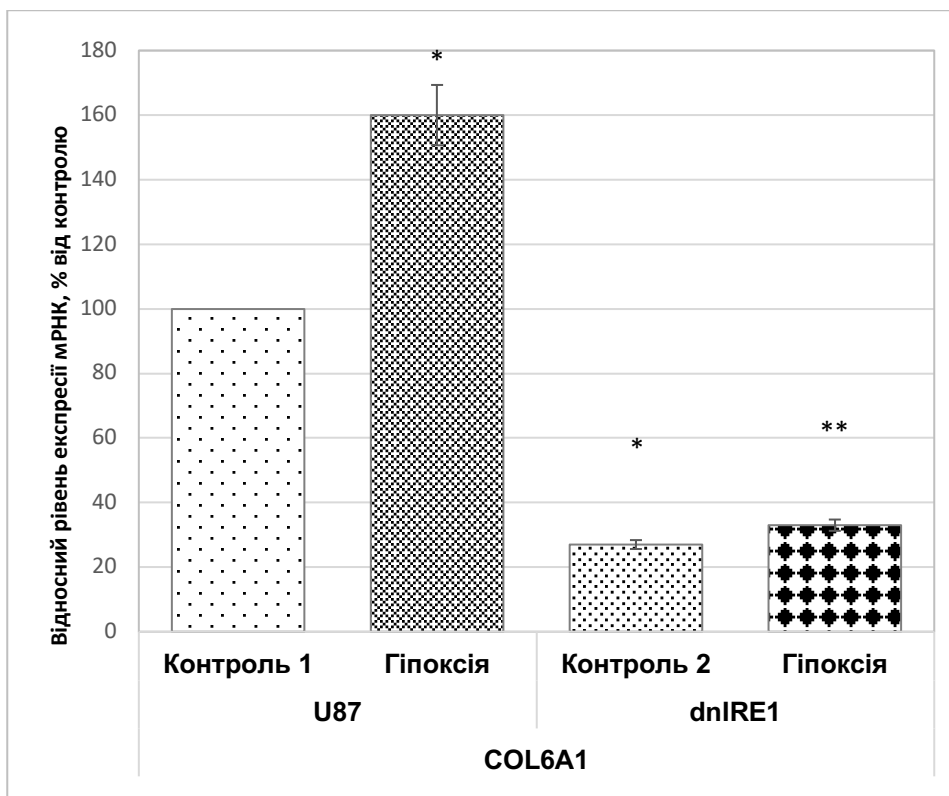


Рис. 3.34. Експресія мРНК гена *COL6A1* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,01$ порівняно з контролем 1; ** – $P < 0,05$ порівняно з контролем 2.

За умов гіпоксії також спостерігається зниження відносного рівня експресії мРНК гена *BRCAl* на рівні мРНК як у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (на 49%), так і в клітинах гліоми сублінії dnIRE1 (на 54%), що наведено на Рис. 3.35. Як видно з отриманих нами даних, блокада ензиму IRE1 істотно не вплинула на гіпоксичну регуляцію мРНК *BRCAl*.

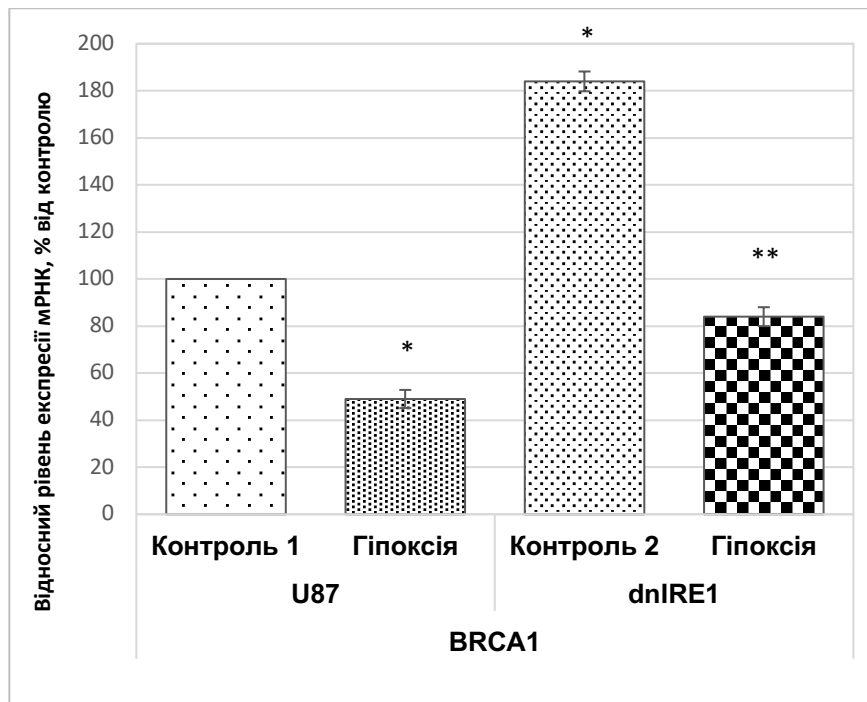


Рис. 3.35. Експресія мРНК гена *BRCA1* (за даними кількісної ПЛР) у нормальних клітинах гліоми (U87) та клітинах гліоми з пригніченою функцією ензиму IRE1 (dnIRE1). Експресію мРНК нормалізували по кількості мРНК β-актину (контроль кількості РНК) і виражали у відсотках від контролю (100%); $n = 4$; * – $P < 0,05$ порівняно з контролем 1; ** – $P < 0,01$ порівняно з контролем 2.

Таким чином було показано, що гіпоксія змінювала експресію більшості досліджених генів залежно від функціональної активності IRE1. Виявлено, що за умов гіпоксії зростає рівень експресії мРНК *PERK*, *TGM2* і *COL6A1*, знижується – *ATF6*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1* та *GNPDA1* у контрольних клітинах гліоми. Пригнічення IRE1 модифікувало ефект гіпоксії на експресію більшості генів: усуває гіпоксичну регуляцію експресії генів *DEK*, *TGM2*, *GNPDA1* і *GLO1* індукує чутливість експресії генів *HOMER3*, *BCL2L* і *ADGRE5* до умов нестачі кисню, послаблює на експресію генів – *COL6A1*, *PERK* (*EIF2AK*) та модифікує гіпоксичний ефект на експресію гена *ATF6*.

3.4. Експресія функціонально різних генів, що причетні до росту пухлин, за умови дефіциту глутаміну у клітинах гліоми в залежності від активності сигнального протеїну IRE1

Глутаміноліз являється облігатним фактором пухлинного росту та відіграє важливу роль у регуляції клітинного циклу. Обмін глутаміну забезпечує пухлинні клітини будівельними блоками в умовах підвищених енергетичних та біосинтетичних потреб [171]. В пухлинних клітинах глутамін є активатором проліферативного сигналіngu [180].

Відомо, що глутамін стимулює споживання глюкози пухлинними клітинами, а блокада метаболізму глутаміну обмежує поглинання глюкози, та врешті-решт виснажує клітину. Блокування глутамінолізу є потенційними напрямками досліджень канцерогенезу [183].

Ми дослідили вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії генів *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *GLO1*, *BIRC5*, *ADGRE5*, *COL6A1*, *RAB5C*, *BRCA1* та *GNPDA1* у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності сенсорно-сигнального ензиму IRE1/ERN1.

Було виявлено, що дефіцит глутаміну в контрольних клітинах гліоми, трансфікованих вектором pсDNA3.1 модифікує експресію майже усіх досліджених генів (Рис. 3.36, 3.37).

Зокрема, ми зафіксували зниження експресії мРНК в клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну генів *PERK* (-13%), *ATF6* (-14%), *COL6A1* (-39%), *DEK* (-24%), *BRCA1* (-48%), *GLO1* (-36%), *BIRC5* (-24%) та *RAB5C* (-24%) (Рис.3.36). Відповідно, зростання експресії спостерігалось лише у випадку мРНК *ADGRE5* (+18%). Дефіцит глутаміну суттєво не вплинув на рівень експресії мРНК гена *GNPDA1* за даних умов (Рис.3.36).

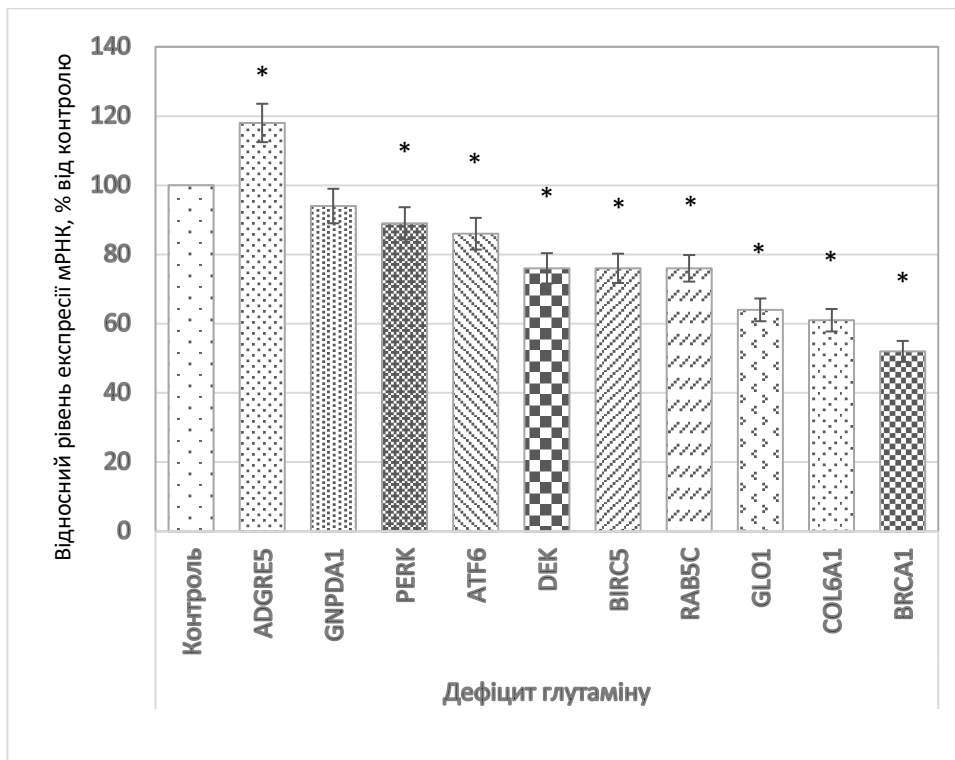


Рис.3.36. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *ADGRE5*, *GNPDA1*, *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BIRC5*, *RAB5C*, *GLO1*, *COL6A1* та *BRCA1* в клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих вектором рсDNA3.1, визначений з допомогою кількісної ПЛР. Значення експресії нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю (Контроль, 100%). Дані виражали як $M \pm m$, ($n = 4$). * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними клітинами.

Виключення функціональних активностей протеїну IRE1/ERN1 в клітинах гліоми модифікує чутливість експресії більшості досліджених генів до дефіциту глутаміну в середовищі. Так, в клітинах гліоми з пригніченням функціональних активностей IRE1/ERN1 за умов дефіциту глутаміну знижувалась експресія мРНК *PERK* (-56%), *COL6A1* (-15%), *DEK* (-33%), *BRCA1* (-57%), *GLO1* (-31%), *BIRC5* (-52%) та істотно підвищується експресія генів *ADGRE5* (+76%) та *ATF6* (+181%) відносно контролю (Рис. 3.37).

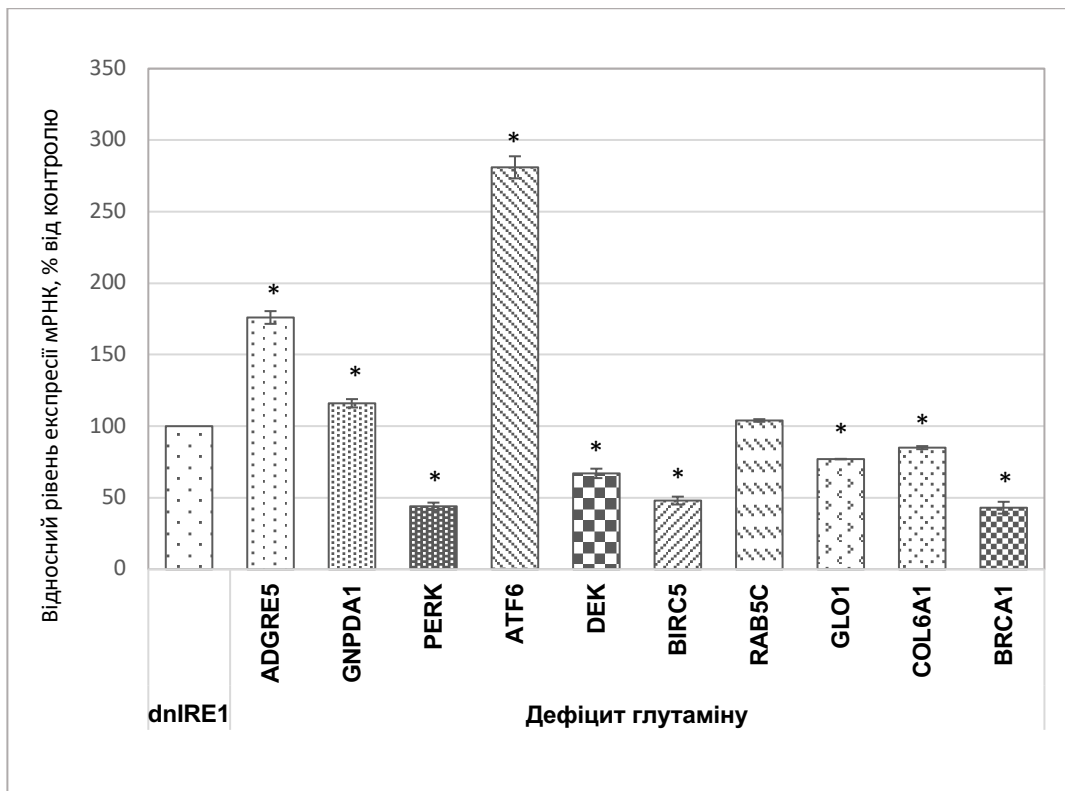


Рис.3.37. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *ADGRE5*, *GNPDA1*, *PERK*, *ATF6*, *DEK*, *BIRC5*, *RAB5C*, *GLO1*, *COL6A1* та *BRCA1* в клітинах гліоми з пригніченою функцією протеїну IRE1 (dnIRE1). Значення експресії нормалізували по мРНК бета-актину і виражали як відсоток від контролю (Контроль, 100%). Дані виражали як $M \pm m$, ($n = 4$). * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольними клітинами.

Було показано, рівень експресії мРНК еукаріотичного фактору ініціації трансляції *PERK* за умов відсутності глутаміну знижується на 13% в порівнянні з контролем 1 (Рис. 3.37). У клітинах гліоми з блокадою протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1 спостерігається більш виражений ефект дефіциту глутаміну на експресію ефект дефіциту глутаміну на експресію ефект дефіциту глутаміну на експресію, а саме рівень експресії мРНК *PERK*, а саме рівень експресії його мРНК знижується на 56% в порівнянні з контролем 2 (Рис. 3.38).

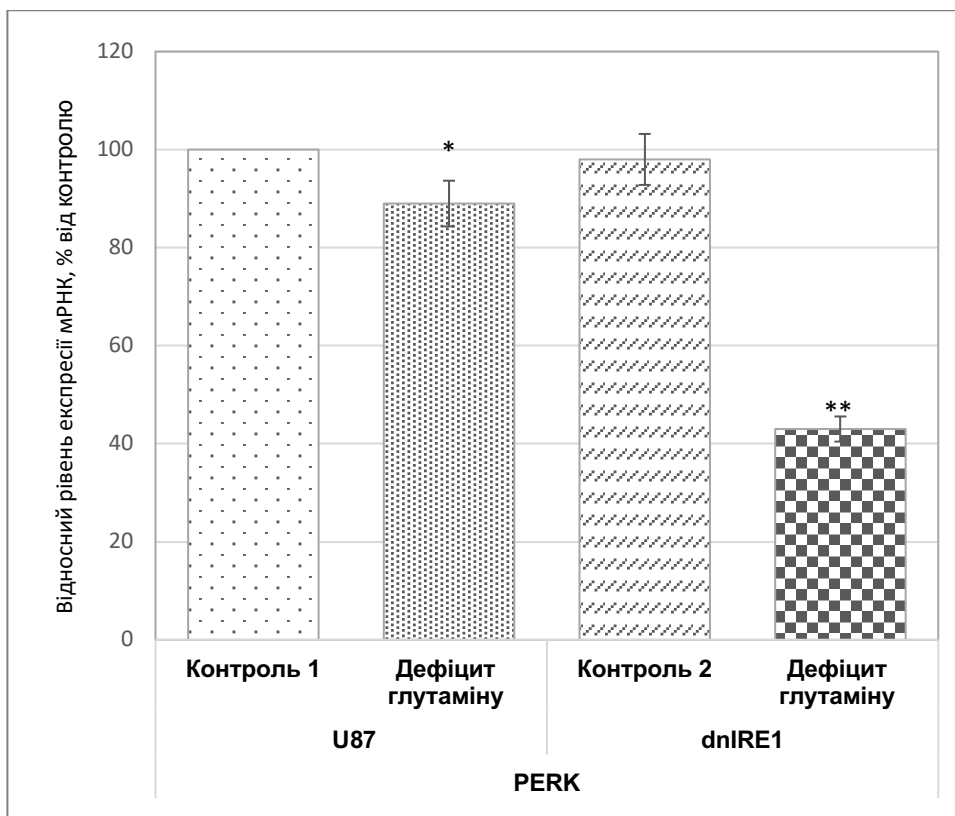


Рис. 3.38. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *PERK/EIF2AK3* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

Наступним етапом було дослідити експресії мРНК транскрипційного фактору ATF6 за умов дефіциту глутаміну у клітинах гліоми в залежності від функціональної активності протеїну IRE1. В клітинах з глутаміном в середовищі, інгібування IRE1 призводить до зниження експресії мРНК *ATF6* на 42% в порівнянні з контролем 1. Встановлено, що рівень мРНК *ATF6* в умовах депривації глутаміну статистично вірогідно знижується на 14% у порівнянні з контролем 1, але інгібування IRE1/ERN1 модифікує ефект

дефіциту глутаміну, оскільки рівень експресії даного гена істотно підвищується +181% у порівнянні з Контролем 2 (Рис. 3.39).

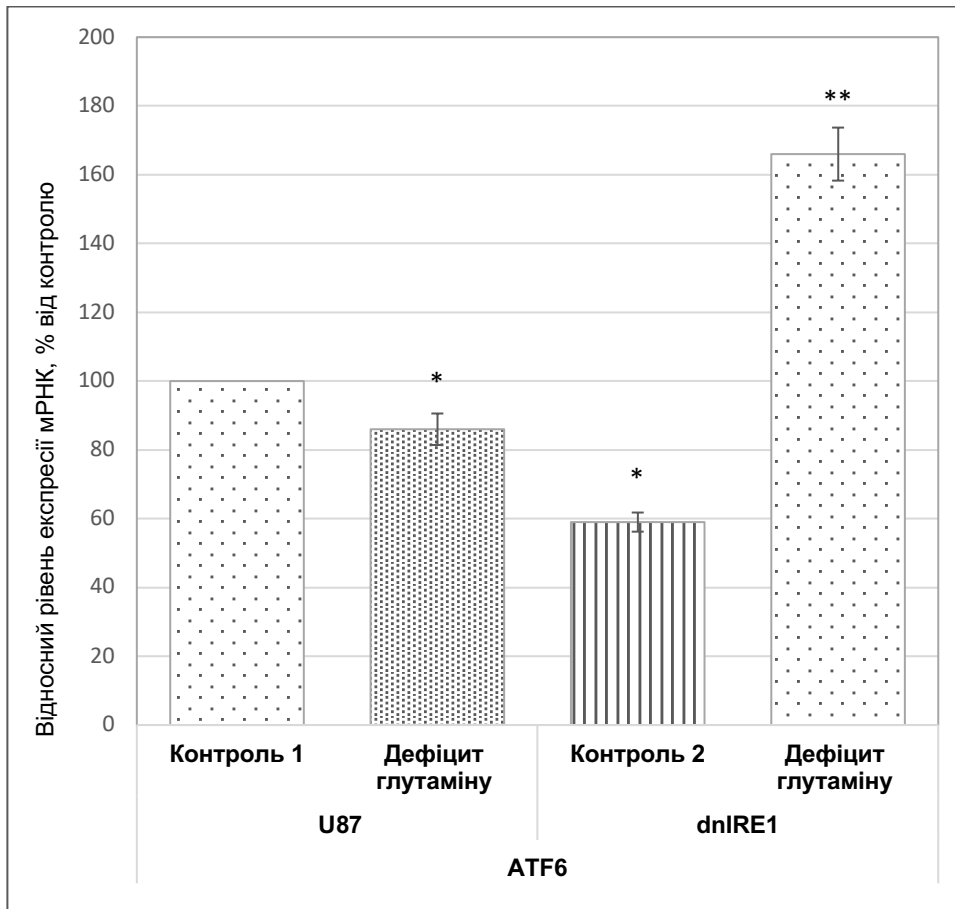


Рис. 3.39. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *ATF6* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnERN1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,001$ у порівнянні з контролем 2.

Нами також було виявлено, що дефіцит глутаміну значно знижує експресію мРНК генів *COL6A1* та *DEK* на (-39% та -24% відповідно) в клітинах гліоми, трансфікованих пустим вектором. При інгібуванні активностей

IRE1/ERN1 в сублініях клітин з глутаміном спостерігається зниження експресії мРНК обох генів *COL6A1* та *DEK* (-72% та -18%, відповідно). Нокдаун активності сигнального протеїну IRE1/ERN1 модифікує ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК даних генів в клітинах гліоми: послаблює ефект депривації глутаміну на експресію гену *COL6A1* (-15%), та посилює ефект дефіциту глутаміну на експресією гена *DEK* (-33%), (Рис.3.40, Рис.3.41).

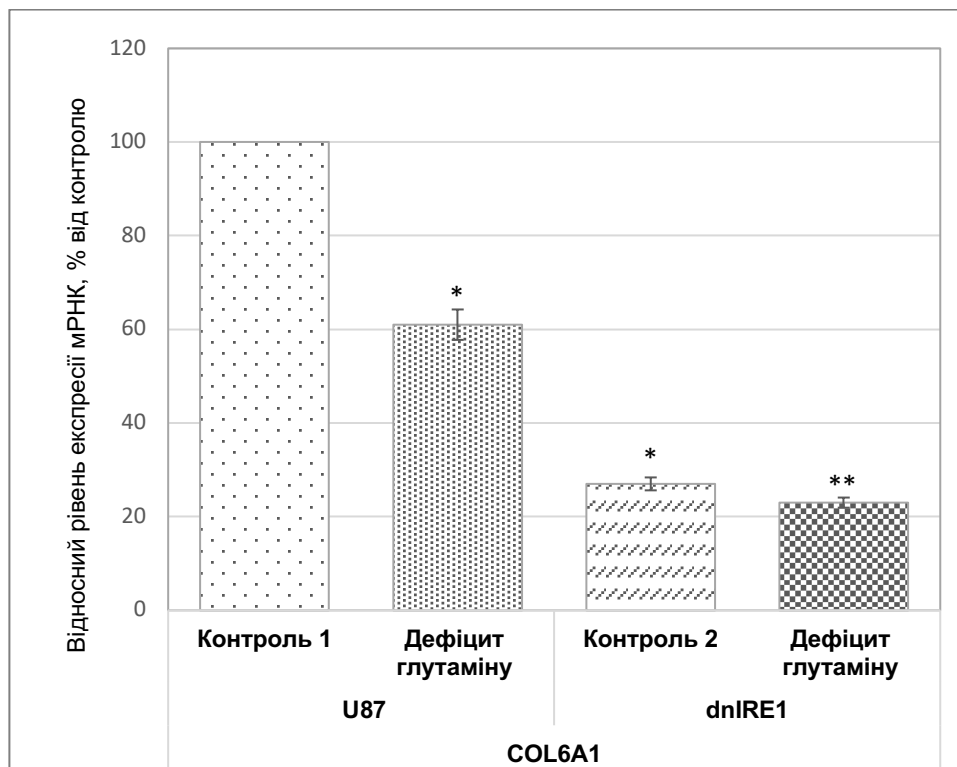


Рис. 3.40. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *COL6A1* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором рсDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnERN1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β-актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

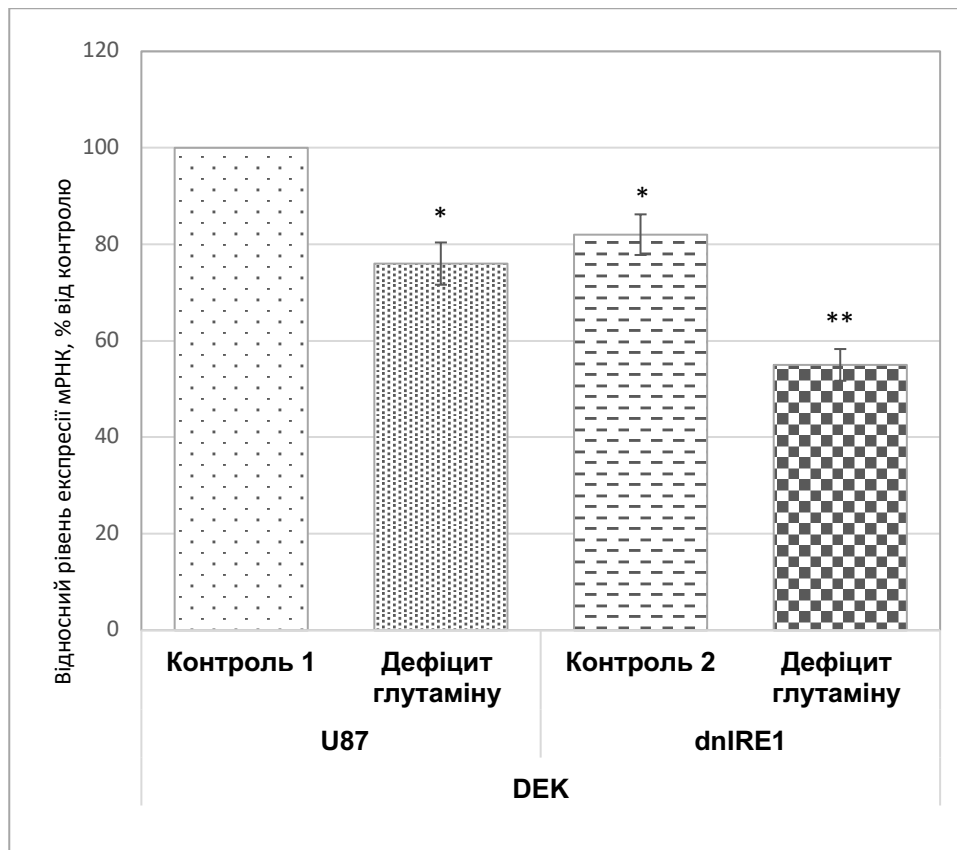


Рис. 3.41. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *DEK* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Також було показано зростання експресії мРНК *ADGRE5* за умов дефіциту глутаміну як в контрольних клітинах гліоми (+18%). Варто відмітити, що інгібування функціональної активності IRE1/ER1 істотно посилює чутливість експресії цього гена до дефіциту глутаміну, рівень експресію мРНК *ADGRE5* при цьому зростає на 76% відносно контролю 2 (Рис 3.42).

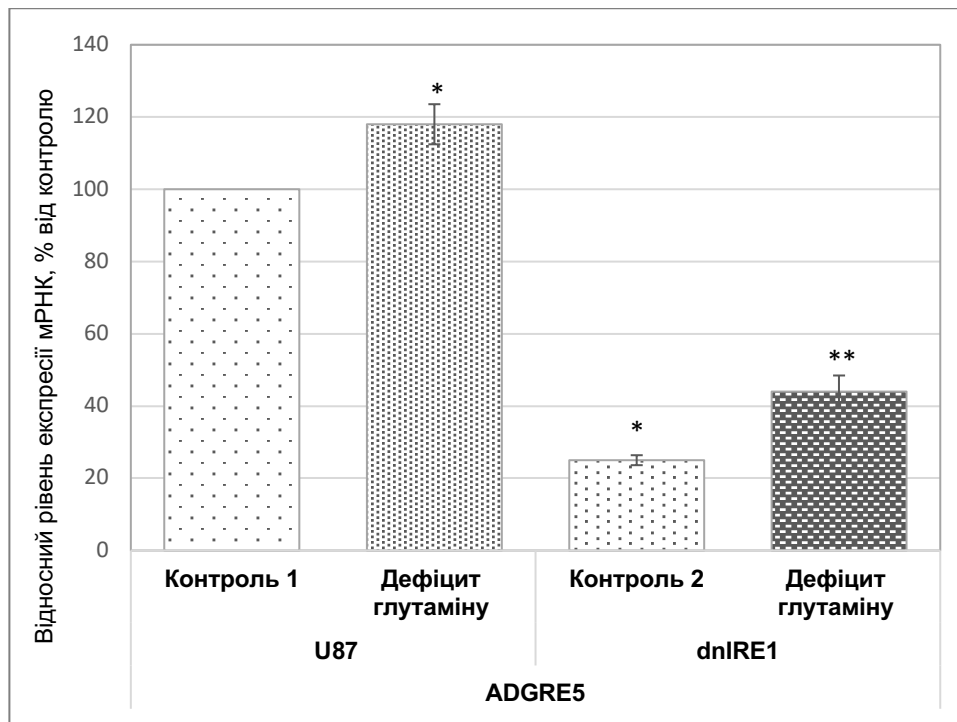


Рис. 3.42. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *ADGRE5* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,001$ у порівнянні з контролем 2.

У випадку з геном *BRC1* ми зафіксували посилення ефекту депривації глутаміну за умов блокади IRE1/ERN1. Так, рівень експресії мРНК даного гена за умов відсутності глутаміну знижується (-48%) в порівнянні з контролем 1. У клітинах гліоми з блокадою протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей IRE1 рівень експресії мРНК *BRC1* також знижується (-57%) в порівнянні з контролем 2 і в даному випадку проявляється незначна залежність змін в експресії гена *BRC1* до дефіциту глутаміну за умов пригнічення сигнального протеїну IRE1 (Рис. 3.43).

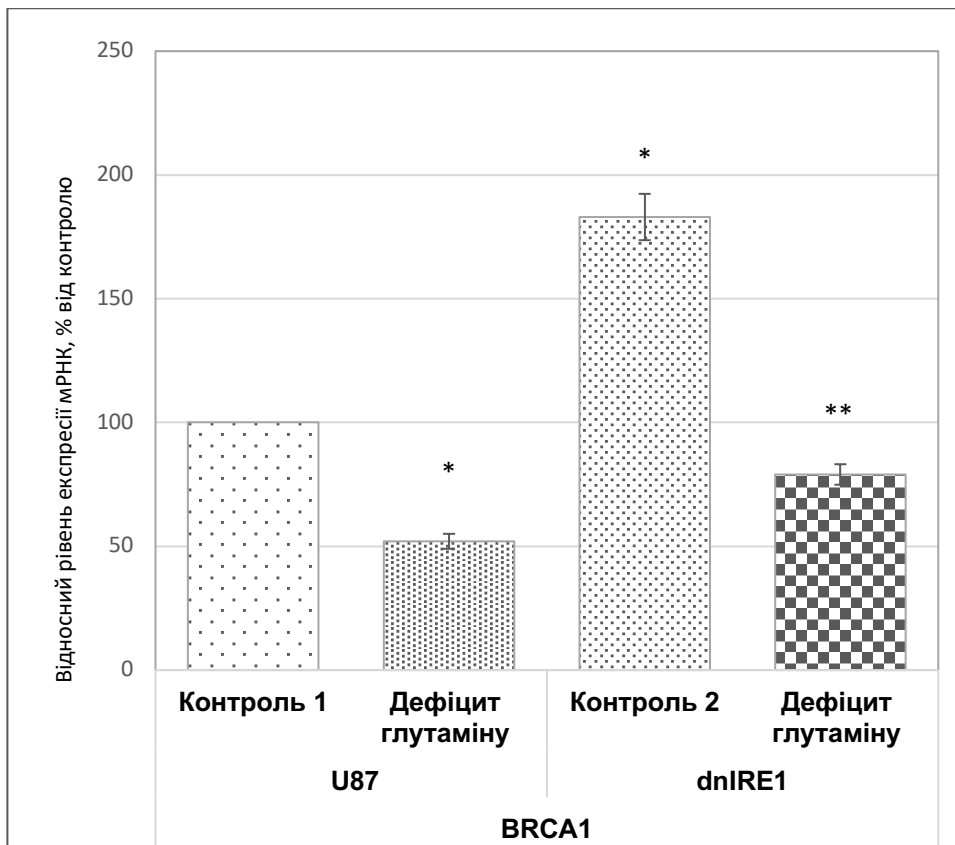


Рис. 3.43. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *BRCA1* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

Ми також спостерігали незначний ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *GLO1*. Як у контрольних клітинах гліоми, так і в сублінії клітин з блокадою IRE1/ERN1 у середовищі з глутаміну знижується експресія даного гена (-36% та -31%, відповідно), що вказує на відсутність суттєвих змін в чутливості експресії цього гена за умов дефіциту глутаміну в залежності від пригнічення протеїну IRE1 (Рис 3.44).

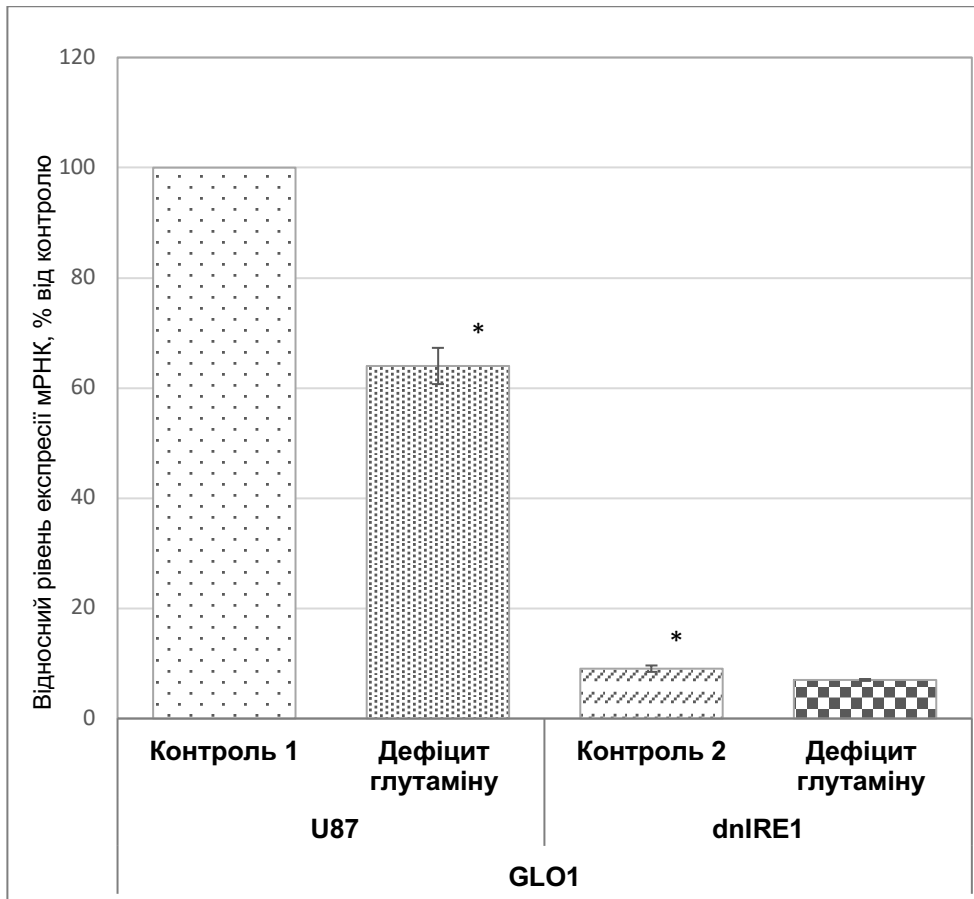


Рис. 3.44. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *GLO1* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnERN1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1;

Як показано на Рис.3.45, Рис.3.46 депривація глутаміну у контрольних клітинах гліоми знижує експресію мРНК *BIRC5* та *RAB5C* (на 24% в обох випадках). Проте інгібування активності IRE1/ERN1 зводить нанівець ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *RAB5C* та підвищує чутливість гена *BIRC5* до дефіциту глутаміну. Так, рівень експресії мРНК *BIRC5* за даних умов знижується на 52% (Рис 3.46).

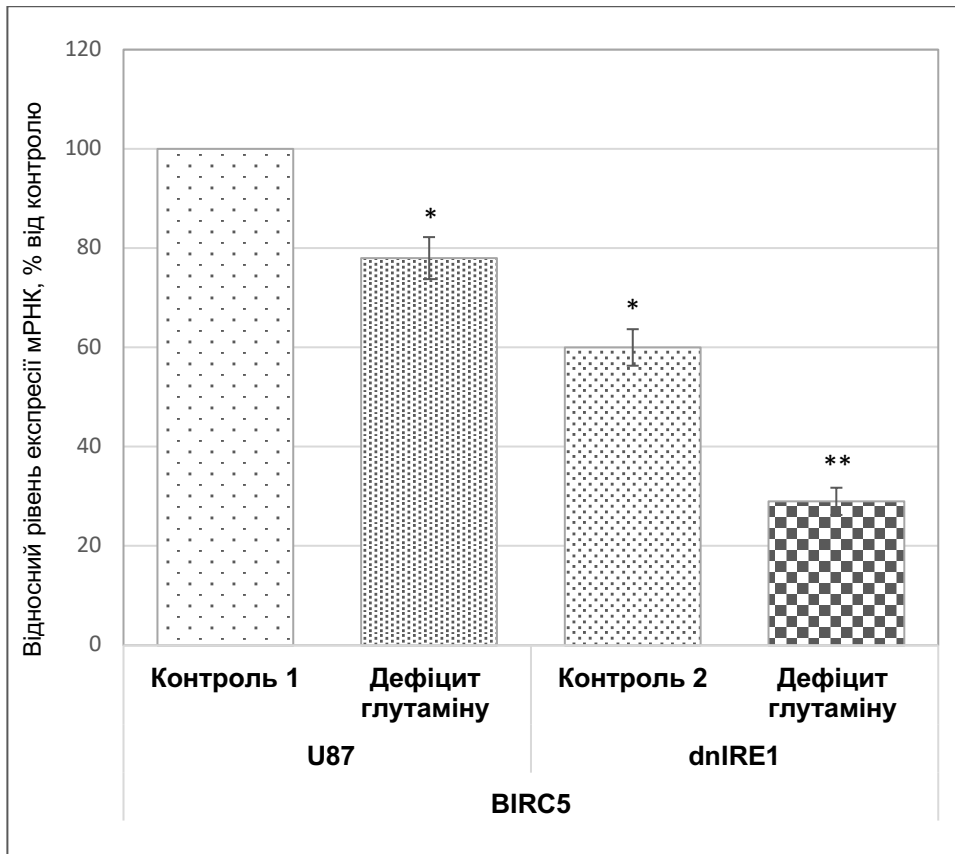


Рис. 3.45. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *BIRC5* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

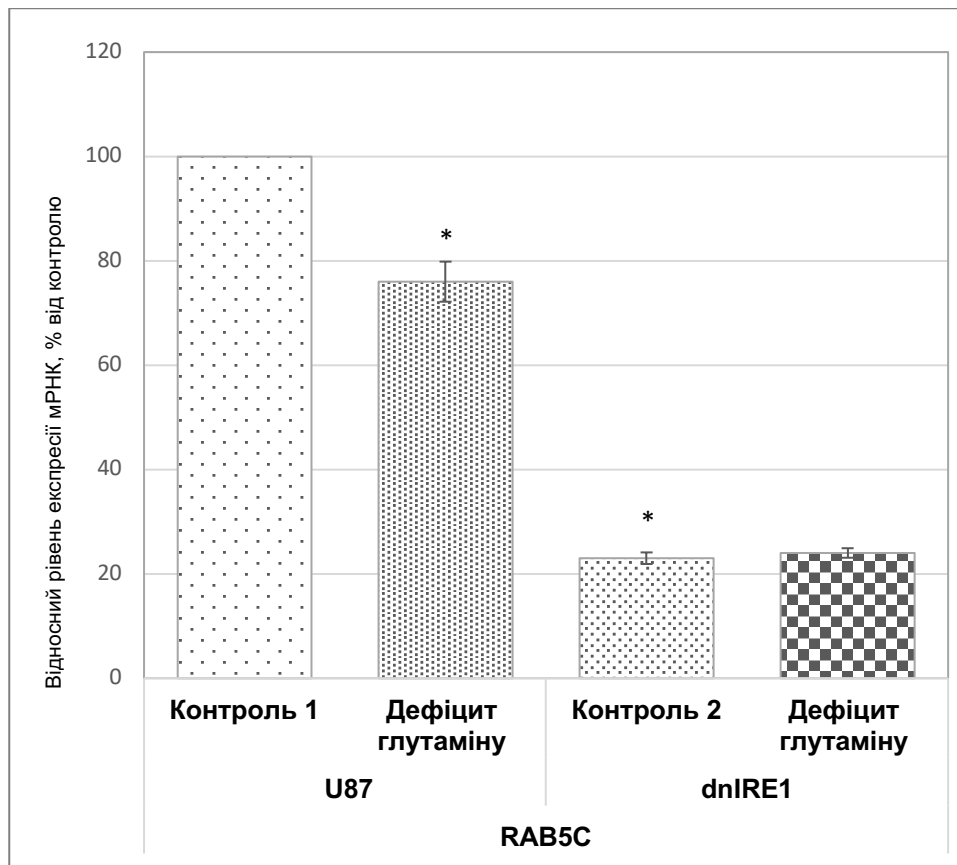


Рис. 3.46. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *RAB5C* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Було також виявлено, що депривація глутаміну суттєво не змінює рівень експресії мРНК *GNPDA1* у контрольних клітинах гліоми лінії U87. Нокдаун функціональної активності IRE1/ERN1 значно знижує рівень експресії мРНК *GNPDA1* (-56%) у порівнянні з контролем 1. За відсутності глутаміну у середовищі в клітинах з блокадою кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1/ERN1 рівень експресії гена *GNPDA1* зростає (+18%) (Рис 3.47).

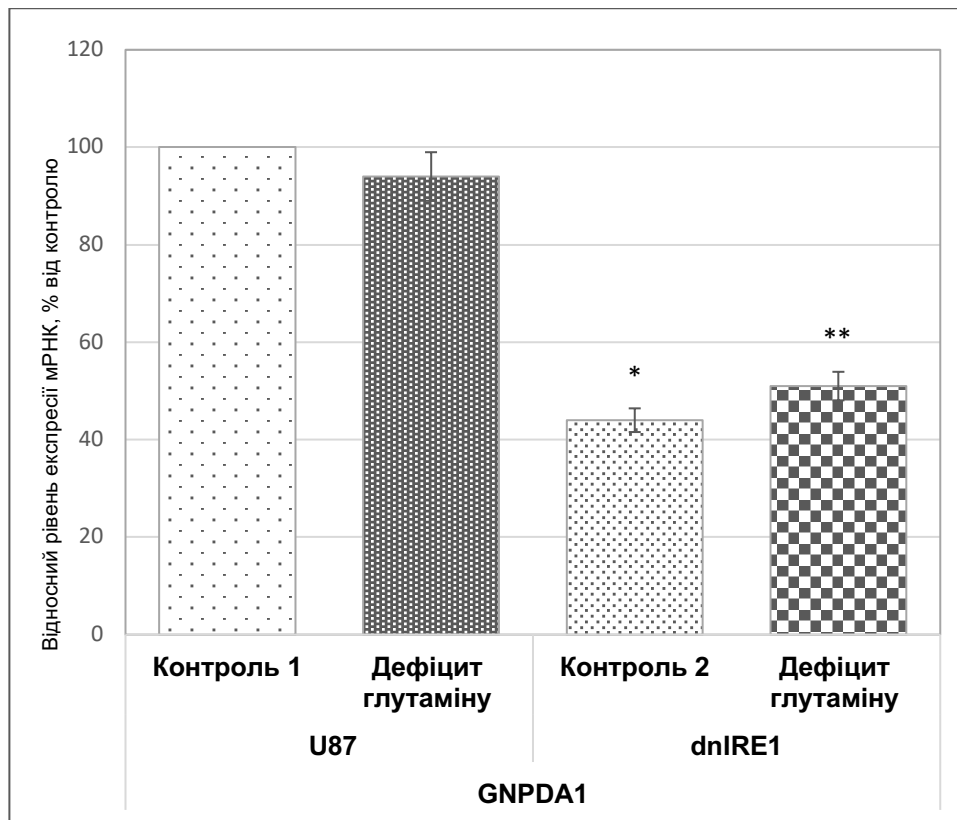


Рис. 3.47. Ефект дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК *GNPDA1* (за даними кількісної ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих «пустим» вектором pcDNA3.1 (U87) і сублінії клітин гліоми з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 (dnER1).

Примітки: значення рівня експресії мРНК нормалізували по кількості мРНК β -актину і порівнювали з контролем, який був прийнятий за 100%; $n = 4$; * – $P < 0,01$ у порівнянні з контролем 1; ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Таким чином, ми виявили, що виключення сенсорно-сигнального протеїну IRE1/ERN1 модифікує чутливість експресії генів *PERK*, *ATF6*, *ADGER5*, *BRCA1*, *DEK*, *COL6A1*, *RAB5C*, *BIRC5* та *GNPDA1* до умов дефіциту глутаміну в клітинах гліоми. Отримані дані демонструють IRE1-опосередковану регуляцію метаболізму в пухлинних клітинах за рахунок модифікації впливу дефіциту глутаміну на експресію більшості досліджених генів.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В процесі злоякісної трансформації такі стресові чинники, як гіпоксія, оксидативний стрес, дефіцит поживних речовин активують мережу внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, що веде до індукції ангіогенезу з наступним посиленням проліферативних процесів [199, 200].

Стрес ендоплазматичного ретикулума є важливим компонентом багатьох патофізіологічних процесів, у тому числі формування і росту злоякісних пухлин. Активація сигнальних мереж стресу ER веде до тотального репрограмування геному в пухлинних клітинах, з метою адаптації до несприятливого мікрооточення, підтримки процесів виживання та проліферації [201]. IRE1 є ключовим сигнальним протеїном стресу ER та модулятором злоякісної трансформації, бере участь у контролі проліферації, енергетичних та біосинтетичних процесів, інвазії, метастазування, а також резистентності клітин до терапії [1, 9, 45, 46]. IRE1-опосередковане репрограмування геному у відповідь на стрес ER являється складним механізмом, що визначає долю клітини. Основний шлях реалізації даного сигналювання полягає в активації IRE1 з наступним розщепленням пре-мРНК XBP1 у цитозолі та утворення сплайсованої форми мРНК XBP1s, з подальшою трансляцією в цитозолі. Далі функціонально активний транскрипційний фактор XBP1s транслокується до ядра де взаємодіє з промоторними ділянками сотень генів, причетних до регуляції фолдингу, біосинтезу, пост-трансляційних модифікацій та транспорту протеїнів, ER-асоційованої деградації протеїнів, реплікації ДНК, процесингу РНК, підтримки хромосомної архітектури та інших [202].

Вибіркове розщеплення ендорибонуклеазою IRE1 низки субстратів (здебільшого ER-асоційованих РНК, мікроРНК, та мРНК, що кодують продукти з ядерною локалізацією) становить ще один рівень IRE1-опосередкованого репрограмування геному [203]. Слід зазначити, що мікроРНК є потужними регуляторами експресії сотень генів як в нормі, так і

за патологій, та модулюють проліферацію, виживання, ангіогенез, інвазію і метастазування в пухлинних клітинах різного типу [204].

Наступним рівнем IRE1-залежного репрограмування геному є активація IRE1 α - TRAF2 шляху, індукція кінази ASK1/JNK та посилення проапоптичного сигналювання [42].

На противагу таргетній терапії, де основна увага приділялась вивченню окремих онкопротеїнів-мішеней (p53, Мус, VEGF, PTEN, Rb) сучасні підходи базуються на розкритті комплексної взаємодії внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, перебудови їх енергетичного метаболізму та взаємодії з мікрооточенням [93]. Оскільки ріст злоякісних пухлин значною мірою обумовлений порушенням регуляторних факторів контролю процесів проліферації й виживання, для нас актуальним було дослідити експресію низки пухлиноасоційованих генів, та їх залежність від функції сигнального протеїну IRE1 та експресії NAMPT.

NAMPT являється одним із перспективних таргетних протеїнів, рівень якого підвищується у різних злоякісних пухлинах, а фармакологічне інгібування специфічними інгібіторами (FK866, CHS-828, GMX -1777) змінює експресію понад 300 генів та знижує інтенсивність процесів проліферації [64, 77, 80, 196]. Дослідження механізмів NAMPT – опосередкованого пригнічення росту пухлин важливі для оцінки і прогнозування побічних ефектів від таргетної терапії, а також ідентифікації потенційних мішеней для лікування та створення нових підходів боротьби з гліомами.

В даній роботі представлені результати дослідження експресії пухлино-залежних генів, що кодують протеїни пов'язані з процесами проліферації, апоптозу, інвазії та метастазування та дерегуляція яких спостерігається в пухлинах багатьох типів. Вивчення експресії даних генів за умов пригнічення IRE1, а також за сайленсінгу NAMPT є надзвичайно актуальним для відкриття механізмів пухлинного росту гліом.

У результаті проведених досліджень ми встановили, що у клітинах з пригніченою активністю протеїнкінази та/або лише ендорибонуклеази IRE1 у порівнянні з контрольними клітинами різко знижується рівень експресії про-проліферативного гена *NAMPT*. Водночас, виявлення сайтів зв'язувань на мРНК *NAMPT* мікро-РНК *miR-182* дало підстави вважати, що зниження експресії мРНК *NAMPT* може бути зумовлене підвищенням рівня *miR-182* в клітинах гліоми внаслідок блокади активності IRE1.

Нікотинамід фосфорибозилтрансфераза (*NAMPT*) лімітує швидкість розщеплення *NAD*, тим самим контролює тотальний енергетичний обмін в клітині. *NAD* є важливим метаболітом та коферментом багатьох окислювально-відновних реакцій, являється субстратом для ензимів (*Sirt1-T7*), *CD38*, *PARP*, відіграє важливу роль у підтримці метаболічного гомеостазу та стабільності геному [10, 86, 205]. Активність ензиму *NAMPT* та рівні *NAD* відіграють критичну роль у прогресуванні пухлини. *NAD* необхідний для перебігу процесів клітинного циклу та апоптозу, бере участь в регуляції транскрипції, репарації, циркадних ритмів, перебудови хроматину, активності теломераз і мобілізації внутрішньоклітинного кальцію [16].

Враховуючи різке зниження рівня експресії цього гена за умов пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1, що корелює із значним зниженням проліферації клітин гліоми, наступним етапом було дослідити та порівняти зміни експресії низки пухлинозалежних генів за умов сайленсінгу мРНК *NAMPT*, а також за умови блокади сигнального протеїну IRE1.

4.1. Роль IRE1 та NAMPT в регуляції експресії генів, що контролюють процеси проліферації, виживання та міграції пухлинних клітин

Ми виявили, що виключення кіназної та ендорибонуклеазної активності IRE1/ERN1 знижує експресію більшості досліджених нами генів у клітинах гліоми лінії U87, а за умов сайленсінгу мРНК *NAMPT* спостерігаються зміни

експресії протилежного напрямку. З огляду на складність механізмів IRE1-опосередкованого транскрипційного репрограмування не завжди можливо визначити молекулярні механізми регуляції досліджуваних генів. Теж саме можна сказати відносно дерегуляції експресії пухлинозалежних генів за умов сайленсінгу NAMPT, що є результатом транскрипційного репрограмування геному та активацією компенсаторних механізмів в умовах порушення функціональної цілісності пухлинних клітин.

Слід зазначити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула IRE1/ERN1 не є ізольованим, а тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6) [206]. Відомо, що активація PERK-залежної гілки стресу ендоплазматичного ретикулула сприяє адаптації клітин до умов пролонгованої гіпоксії, розвитку резистентності до терапії та протидіє апоптозу [207]. Блокада ензиматичних активностей IRE1/ERN1 не впливає на рівень експресії *PERK*, проте в клітинах гліоми з пригніченим NAMPT виявлено зниження експресії даного гена (Табл. 4.1), що можливо є одним з механізмів пригнічення проліферації пухлинних клітин за умов блокади NAMPT.

Транскрипційний фактор ATF6 є позитивними регуляторами проліферації. Відомо, що активація ATF6-сигнального шляху стресу ER сприяє підвищенню виживаності клітин гліобластоми [208]. Активна форма транскрипційного фактора ATF6 утворюється у відповідь на стрес та бере участь в регуляції транскрипції низки стресозалежних генів, причому може функціонувати як окремо, так і синергічно з іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу ER. Ми показали, що пригнічення активності IRE1/ERN1 у клітинах гліоми призводить до істотного зниження експресії *ATF6* (Табл. 4.1), тоді як, сайленсінг NAMPT не впливає на рівень експресії мРНК ATF6. Очевидно, що експресія даного транскрипційного фактору у клітинах гліоми тісно пов'язана з IRE1-сигнальним шляхом і не залежить від NAMPT.

Табл. 4.1

Зміни рівня експресії генів за умов зниження рівня мРНК та протеїну NAMPT та пригнічення активності протеїну IRE1 у клітинах гліоми

| Ген | dn-ERN1, % від контролю | siNAMPT, % від контролю |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>PERK</i> | – | ↓ на 36% |
| <i>ATF6</i> | ↓ на 41 % | – |
| <i>ATF3</i> | ↓ на 86 % | ↓ на 38% |
| <i>BRCA1</i> | ↑ на 83 % | ↓ на 21% |
| <i>DEK</i> | ↓ на 18% | ↓ на 35% |
| <i>BIRC5</i> | ↓ на 40% | ↑ на 358 % |
| <i>GLO1</i> | ↓ на 91 % | – |
| <i>RAB5C</i> | ↓ на 77% | ↑ на 167 % |
| <i>COL6A1</i> | ↓ на 72 % | – |
| <i>TGM2</i> | ↓ на 92 % | ↑ на 126 % |

Примітки: dn-ERN1 – клітини гліоми із виключенням протеїнкінази та ендорибонуклеази IRE1; siRNA – клітини гліоми, трансфіковані специфічною до мРНК NAMPT siRNA (siNAMPT); контроль – клітини гліоми, трансфіковані порожнім вектором; ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; $p < 0,05$ для всіх значень.

Та ж сама динаміка експресії спостерігалась при дослідженні гена *GLO1* [119, 209]. За умов пригнічення активності IRE1 рівень експресії гена проліферативного ензиму гліоксилази 1 різко знижувався (Табл. 4.1), що повністю узгоджується з даними про пригнічення проліферації клітин гліоми за даних умов [45, 210]. Істотних змін в експресії цього гена в клітинах гліоми, трансфікованих специфічною до мРНК NAMPT siRNA не було виявлено.

Отже, зниження експресії *GLO1*, можливо, являється складовою IRE1-опосередкованих анти-проліферативних механізмів в клітинах гліоми.

Було показано, що пригнічення функціональної активності протеїну IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 призводило до значного зниження експресії мРНК транскрипційного фактора ATF3. Ми спостерігали однонаправлені зміни експресії мРНК *ATF3* при сайленсінгу мРНК *NAMPT* та за умов пригнічення функціональної активності IRE1. Показано, що у клітинах гліоми з блокадою IRE1 рівень експресії *ATF3* значно знижується. Менш виражені зміни в експресії дослідженого гена ми спостерігали при нокдауні *NAMPT*. Раніше вченими було встановлено, що пригнічення активності ATF3 за допомогою РНК-інтерференції в клітинах гліобластоми лінії U373MG призводить до зниження проліферативного потенціалу, індукції апоптозу та пригнічення міграції у клітинах *in vitro* [191]. Дані, отримані нами узгоджуються з наведеними вище й дозволяють припустити, що ATF3 бере участь у контролі проліферації клітин гліоми у спосіб, залежний від активності IRE1 та NAMPT.

Поліфункціональний протеїн BRCA1 являє собою регуляторну субодиницю p53 протеїнофосфатази, проявляє Е3 убіквітинлігазну активність, та функціонує в якості онкосупресора в пухлинних клітинах молочної залози та яєчників [107]. Роль BRCA1 у контролі клітинного циклу включає здатність взаємодіяти з різними циклінами та циклін-залежними кіназами. Відомо, що BRCA1 сприяє резистентності гліоми до хіміотерапії, оскільки бере участь у репарації пошкодженої ДНК [211]. Сайленсінг мРНК *NAMPT* призводить до зниження рівня експресії гена *BRCA1*, а за умов блокади IRE1/ERN1 у клітинах гліоми ми спостерігали зворотні зміни, що можливо, являється адаптацією пухлинних клітин до IRE1-опосередкованого пригнічення росту пухлин за рахунок активації альтернативних шляхів.

Ми спостерігали також однонаправлені зміни в експресії онкогена *DEK*, який гіперекспресується в клітинах гліоми і є регулятором проліферації та апоптозу [103]. В сублініях клітин гліоми лінії U87 з пригніченим протеїном

IRE1/ERN1 та за сайленсінгу мРНК *NAMPT* було виявлено зниження експресії мРНК *DEK*. Відомо, що сайленсінг мРНК *DEK* призводить до супресії проліферації та зупинки клітинного циклу на фазі G1/G0 в клітинах гліобластоми U251. При цьому спостерігається активація процесів апоптозу, посилення експресії онкосупресорів P53 і P21 та зниження експресії онкогенів Bcl-2 і C-myc, а також підвищення активації каспази-3 у клітинах гліобластоми U251 [104]. Дані, отримані нами, узгоджуються з цими результатами і дозволяють стверджувати, що *DEK* бере участь у контролі проліферації клітин гліоми у спосіб, залежний від активності *NAMPT* та IRE сенсорно-сигнального шляху.

BIRC5 (сурвівін) проявляє пропроліферативну активність, надекспресується в усіх типах пухлин та асоціюється з поганими клінічними прогнозами [215]. Відомо, що сурвівін належить до представників сімейства протеїнів інгібіторів апоптозу (IAP), пригнічує активність каспаз та блокує загибель клітин [216]. Ми показали, що в клітинах гліоми з пригніченим IRE1, рівень експресії гена *BIRC5* знижується. Таким чином, у випадку пригнічення IRE1 зменшення рівня експресії гена *BIRC5* узгоджується зі зниженням інтенсивності проліферації клітин гліоми. Водночас, сайленсінг мРНК *NAMPT* дерегулює експресію даного онкогена та підвищує рівень експресії мРНК *BIRC5*. Ми припускаємо, що такі зміни експресії даного гена можливо є наслідком компенсаторних механізмів в клітинах гліоми, спричинені дерегуляцією геному при порушенні функціональної цілісності клітини.

Інвазія клітин гліоми головного мозку здійснюється шляхом їх проникнення в периваскулярний простір кровоносних судин та вздовж аксонів [218]. Раніше було показано, що пригнічення IRE1/ERN1-залежного сигнального каскаду призводить до зниження проліферації клітин гліоми, проте посилює їх міграційний потенціал [189]. Слід зауважити, що процеси міграції та проліферації в пухлинах проходять за принципом взаємного виключення, а гіпоксія та депривація поживних речовин активує ангіогенез та

запускає процеси міграції з метою знайти більш сприятливе середовище для підтримки проліферативних процесів [219].

Важливою передумовою для міграції пухлинних клітин є репрограмування енергетичного метаболізму, що індукується за гіпоксичних умов. В мігруючих клітинах спостерігається вибіркова експресія іонних каналів, нейротрансмітерів, протеаз, хемокінів та цитокінів. При цьому відбувається ремоделювання цитоскелету та позаклітинного матриксу, зменшення міжклітинної адгезії та розмірів самих онкоклітин. Ці процес перебувають під контролем низки проінвазивних та проміграційних факторів (VEGF, NF- κ B, TGF- β , TNF- α , EGF), а також численних міРНК, що відіграють роль своєрідного “перемикача” між проліферацією та міграцією в злоякісних клітинах [220]. Разом з тим, набуття клітинами інвазивних властивостей асоційоване з явищем епітелійно-мезенхімного переходу та характеризується порушенням контактів між самими клітинами та з позаклітинним матриксом, втратою полярності клітини, пригніченням експресії компонентів цитоскелету та епітеліальних маркерів, таких як E-кадгерини, окклюдини, клаудини, цитокератини [122].

COL6A1, RAB5C та TGM2 відіграють важливу роль в пухлинному рості, та гіперекспресія яких асоціюється із набуттям інвазивних властивостей, міграцією та метастазуванням в пухлинах різного типу [123, 128, 129, 192].

Трансглутаміназа 2 (TGM2) є мультфункціональним стресзалежним протеїном, що на транскрипційному рівні регулюється HIF-1 α , координує епітелійно-мезенхімні переходи, впливає на адгезію та мікрооточення в пухлин клітинах, являється одним з ключових регуляторів ангиогенезу та метастазування. Відомо, що підвищена експресія TGM2 призводить до конститутивної активації NF- κ B [192]. TGM2 також регулює виживання, диференціацію, проліферацію та апоптоз. Ми спостерігали зниження експресії мРНК *TGM2* за умов пригнічення функціональної активності IRE1/ERN1, що узгоджується з літературними даними про IRE1-опосередковане зниження

проліферації клітин гліоми. Однак у сублініях клітин гліоми, трансфікованих siRNA NAMPT, зміни в експресії мРНК *TGM2* мають протилежний напрямок.

Аналогічні зміни, проте більш вираженого характеру ми спостерігали при дослідженні експресії онкогена *RAB5C*, що кодує протеїн активатор циклінів та позитивний регулятор міграції онкоклетин [221].

Отже за умов пригнічення функціональної активності IRE1, експресія більшості досліджених генів, причетних до процесів проліферації, виживання та міграції знижується, що свідчить про IRE1-опосередковане пригнічення росту клітин гліоми. Проте за сайленсінгу мРНК NAMPT спостерігається підвищення експресії онкогенів *BRCA1*, *BIRC5*, *RAB5C* та *TGM2*, що відображає комплексну дерегуляцію геному у відповідь на пригнічення рівня мРНК та протеїну NAMPT.

4.2. Зміни рівня експресії пухлинозалежних генів за умови сайленсінгу мРНК *NAMPT*

Було показано, що сайленсінг мРНК NAMPT модифікує експресію генів *IRS1*, *IGFBP3*, *CLU*, *BNIP3*, *PCNA* та *MKI67* в клітинах гліоми, підвищує рівень експресії мРНК *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* та *IRS1* і знижує рівень мРНК генів *MKI67*, *PCNA*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3*, *PER2*.

В ході досліджень було виявлено чутливість експресії маркера проліферації *Ki-67* (*MKI67*) та *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen) до РНК-інтерференції NAMPT. Зниження рівня експресії даних генів свідчить про послаблення проліферативного потенціалу клітин гліоми за умов сайленсінгу мРНК NAMPT.

Відомо, що гіперекспресія онкогена *PSAT1* індукує IDH1 (ізоцитратдегідрогеназа 1) та сприяє росту гліоми [217]. За умов сайленсінгу NAMPT ми спостерігали підвищення експресії мРНК *PSAT1* що, можливо, є адаптацією пухлинної клітини за рахунок активації альтернативних сигнальних шляхів.

Аналогічні зміни ми спостерігали при дослідженні експресії мРНК *TSPAN13*, який кодує онкопротеїн тетраспанін 13 та відіграє важливу роль в інвазії та метастазуванні онкоклетин [131]. Після сайленсінгу NAMPT рівень експресії мРНК *TSPAN13* підвищується у клітинах гліоми U87, що вказує на дерегуляцію геному за даних умов.

Відомо, що плеiotропний цитокін LIF сприяє розвитку злоякісних пухлин [212]. У клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих специфічною до мРНК NAMPT siRNA, ми спостерігали відносне зниження експресії *LIF*, що узгоджується з даними про NAMPT-опосередковане зниження проліферації клітин гліоми [213].

За умов сайленсінгу NAMPT було показано підвищення рівня мРНК *IGFBP3* та *IRS1*. *IRS1* (субтрат 1 до ісулінового рецептору) є цитозольним адапторним протеїном, що бере участь в сигналінгу рецептора інсуліна (IR) та рецептора I інсуліноподібного фактора росту (IGF-IR). Відомо, що в пухлинах різного типу *IRS1* виступає в якості онкогена, підвищує ріст та проліферацію через PI3K/Akt сигнальний шлях [222]. В клітинах гліоми *IRS1* являється мішенню для miR-126, гіперекспресія якої негативно регулює *IRS1*, інгібує активацію PI3K і АКТ та сприяє пригніченню росту пухлини гліоми [135]. Підвищення експресії *IRS1* не узгоджуються з даними про супресію пухлинних клітин за умов пригнічення NAMPT, та можливо є наслідком активації компенсаторних механізмів за участю інших сигнальних мереж в клітинах гліоми в результаті репрограмування геному. *IGFBP3* є плеiotропним протеїном та відіграє важливу роль в метаболізмі клітини, бере участь в регуляції інсуліноподібного фактору росту IGFs [132]. Відомо, що *IGFBP3* може проявляти антипроліферативні та проапоптичні властивості [133]. Істотне підвищення експресії *IGFBP3* за умови сайленсінгу NAMPT узгоджується зі зменшенням проліферації клітин гліоми, та, ймовірно, є одним з механізмів NAMPT-опосередкованого пригнічення проліферації пухлинних клітин.

BNIP3 є плейотропним протеїном, виступає в якості цитокіну та фактора росту, відіграє важливу роль в процесах апоптозу та проліферації. Відомо, що miR-145 індукує апоптоз в клітинах гліоми шляхом інгібування BNIP3 та призводить до супресії Notch сигнального шляху та, відповідно, пригнічення ангиогенезу [140]. Нами було показано зниження рівня мРНК *BNIP3* при сайленсінгу NAMPT, що узгоджується з літературними даними про зниження проліферації клітин гліоми за даних умов.

PER2 являється одним з ключових протеїнів циркадного годинника та діє як онкоген в пухлинному середовищі, підвищує проліферацію та метастазування. Відомо, що виключення активності даного гена на ранніх стадіях призводить до пригнічення метастатичного прогресування [142]. Існує пряма кореляція між NAMPT/NAD та SIRT1/CLOCK:BMAL1, при цьому інгібування NAMPT веде до активації CLOCK:BMAL1 за рахунок супресії деацетилази SIRT1 [143]. Тому зниження експресії *PER2* внаслідок РНК-інтерференції NAMPT в клітинах гліоми є, можливо, одним з механізмів пригнічення росту пухлин за даних умов.

Протеїни, що кодуються генами *HK2* та *GADD45A* асоційовані з процесами канцерогенезу та дерегульовані в пухлинах різного типу. Відомо, що в клітинах гліоми лінії U87 та U251 регуляція ензиму гліколітичного шляху HK2 відбувається за участю miR-218, а сайленсінг даного ензиму значно зменшує проліферацію, міграцію, інвазію [148]. Ми не виявили істотних змін в експресії генів *HK2* та *GADD45A* в сублінії клітин зі сайленсінгом мРНК NAMPT, що свідчить про наявність інших шляхів регуляції даних генів, які не залежать від активності NAMPT.

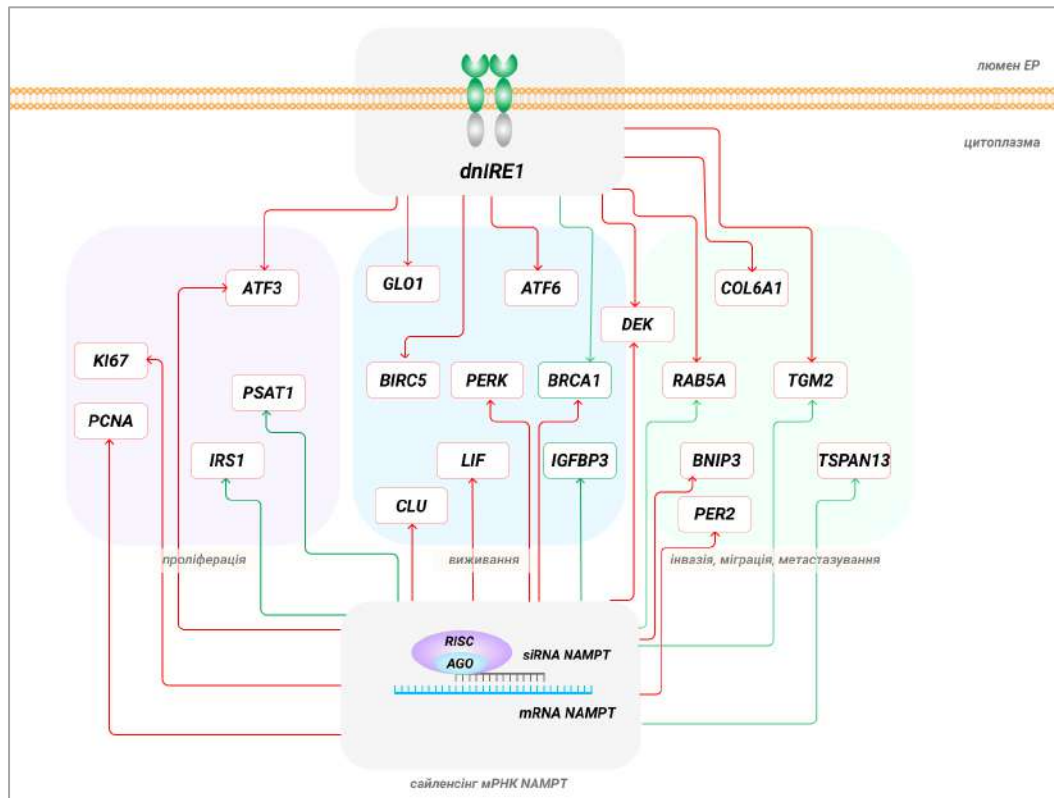


Рис. 4.1. Зміни в експресії генів, що відображають репрограмування функціонального стану клітини за умов сайленсінгу *mPHK NAMPT*, а також повного (як кінази, так і ендорибонуклеази) пригнічення IRE1 (dnIRE1); зеленим кольором показано зростання, а червоним – зниження рівня експресії мРНК досліджених генів.

NAMPT є важливим фактором стабільності геному, експресія якого відіграє критичну роль у процесах метаболізму та проліферації. Дерегуляція більшості досліджуваних генів після сайленсінгу *NAMPT* є результатом комплексного репрограмування в умовах порушення балансу в клітинах гліоми. Отримані результати описують багатогранність міжгенних взаємодій та демонструють непередбачувані зміни в експресії генів за умови пригнічення таргетного гена *NAMPT* в пухлинних клітинах.

4.3. IRE1-залежні механізми регуляції експресії генів за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну

Адаптація пухлинних клітин до умов гіпоксії є важливим фактором канцерогенезу. Відомо, що гіпоксія сприяє злякисній трансформації, підвищує резистентність до радіо- та хіміотерапії [223]. Оксигенація пухлини є критичним фактором, а надекспресія субодиниці HIF- α асоціюється з агресивністю захворювання та корелює з низьким рівнем виживаності [224].

Ендоплазматичний ретикулум забезпечує адаптацію клітин до низького рівня кисню та відіграє ключову роль у відповіді клітини на гіпоксичні сигнали [159]. Слід підкреслити, що зв'язок гіпоксії зі стресом ендоплазматичного ретикулума є HIF-опосередкованим процесом [160]. Активація кінази PERK сенсорно-сигнального шляху стресу ER активує фосфорилування фактора ініціації трансляції eIF2 α , що приводить до сповільнення синтезу протеїнів з метою зменшення енерговитрат та акумуляції АТФ [225]. За гіпоксичних умов відбувається PERK-залежна активація ATF4, внаслідок чого підвищується виживання пухлинних клітин та їх адаптація до умов стресу [207]. IRE1 сенсорно-сигнальний шлях надзвичайно важливий для пухлинних клітин, так як за рахунок активації XBP1 в умовах гіпоксії посилюються антиапоптичні сигнали [226].

Ми дослідили вплив пригнічення ензиматичних активностей сенсорно-сигнального протеїну IRE1/ERN1 на гіпоксичну регуляцію експресії пухлиноасоційованих генів *ATF6*, *PERK (EIF2AK)*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1*, *BCL2L1*, *HOMER3* та *GNPDA1*, а також генів, що регулюють процеси інвазії, міграції та ангіогенезу *ADGRE5*, *TGM2* та *COL6A1* (Табл. 4.2).

Було показано, що у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії зростає експресія мРНК *COL6A1*, *TGM2* і *PERK*. Експресія мРНК *ATF6*, *DEK*, *GLO1* та *GNPDA1*, а також *BRCA1*, навпаки, знижується за даних умов (Табл. 4.2).

Табл. 4.2

Гіпоксична регуляція експресії генів *ATF6*, *PERK (EIF2AK)*, *BRCA1*, *DEK*, *GLO1*, *BCL2L1*, *HOMER3*, *GNPDA1*, *ADGRE5*, *TGM2* та *COL6A1* за умов пригнічення IRE1

| Ген | Вектор* | dn-ERN1** |
|----------------------|------------|------------|
| <i>ADGRE5</i> | Змін немає | ↑ (120%) |
| <i>COL6A1</i> | ↑ (60%) | ↑ (18%) |
| <i>TGM2</i> | ↑ (52%) | змін немає |
| <i>PERK (EIF2AK)</i> | ↑ (41%) | ↑ (15%) |
| <i>ATF6</i> | ↓ (37%) | ↑ (55%) |
| <i>DEK</i> | ↓ (28%) | змін немає |
| <i>BCL2L1</i> | змін немає | ↑(40%) |
| <i>GLO1</i> | ↓ (14%) | змін немає |
| <i>HOMER3</i> | змін немає | ↓ (24%) |
| <i>GNPDA1</i> | ↓ (44%) | змін немає |
| <i>BRCA1</i> | ↓ (49%) | ↓ (54%) |

Примітки: ↓ - рівень експресії знижується; ↑ - рівень експресії підвищується; * - у порівнянні з клітинами гліоми, трансфікованими вектором, які не піддавались впливу гіпоксії; ** - у порівнянні з клітинами гліоми із пригніченням IRE1, які не піддавались впливу гіпоксії; $p < 0,05$ для всіх значень.

Разом з тим, гіпоксія не чинила впливу на експресію генів *ADGRE5*, *BCL2L1* та *HOMER3*, а пригнічення ензиматичних активностей IRE1/ERN1 вводить гіпоксичну регуляцію їх експресії. При цьому, найбільш істотні зміни спостерігаються у випадку *ADGRE5*, де ми зафіксували зростання експресії даного гена. Аналогічні зміни, проте менш виражені, спостерігаються у випадку з антиапоптичним геном *BCL2L1*. Отже, за умов гіпоксії у клітинах із

пригніченням IRE1 ми спостерігали зростання експресії генів *ADGRE5*, *ATF6*, *BCL2L1* (Табл. 4.2).

Пригнічення IRE1/ERN1 у клітинах гліоми усуває гіпоксичну регуляцію експресії генів *TGM2*, *DEK*, *GNPDA1* та *HOMER3*, що свідчить про опосередкованість гіпоксичної регуляції експресії даних генів функціональною активністю ензиму IRE1/ERN1. У той же час виключення обох ензиматичних активностей IRE1/ERN1 у клітинах гліоми не модифікувало вплив гіпоксії на експресію *GLO1*, що свідчить про незалежний від IRE1 спосіб впливу гіпоксії на експресію даного гена. Разом з цим, пригнічення IRE1 послаблює ефект гіпоксії на експресію генів *COL6A1* і *PERK*, та модифікувало чутливість гена *ATF6* до гіпоксичних умов (Табл. 4.2).

Таким чином, нами було показано, що гіпоксія, як проонкогенний фактор, впливає на експресію майже усіх досліджених генів, а інгібування активностей IRE1/ERN1 може як підсилювати, пригнічувати та модифікувати вплив гіпоксії на рівень експресії даних генів тим самим сприяє уповільненню росту гліоми.

Швидкі темпи метаболізму, що характерні для онкогенних клітин, необхідні для підтримки проліферації та адаптації до несприятливого мікрооточення в умовах гіпоксії та дефіциту поживних речовин. Глюкоза та глютамін є основними енергетичними субстратами як в нормі так і за патологій. Необхідну кількість енергії пухлини отримують внаслідок підвищення інтенсивності процесів гліколізу, глютамінолізу та біосинтезу жирних кислот [89].

Глутамін задіяний в ключових внутрішньоклітинних процесах, таких як проліферація, виживання та антиоксидантний захист. Проміжні компоненти глютамінолізу використовуються для синтезу антиоксидантів (глутатіон), амінокислот, пуринів, піримідинів та жирних кислот, необхідних для реплікації та активації клітинної сигналізації. Порушення регуляції метаболітів глютамінолізу в певних типах пухлин являються потенційними терапевтичними мішенями та прогностичними біомаркерами, а пригнічення

обміну глутаміну на разі є перспективними напрямками дослідження для розробки протипухлинних препаратів [227].

Моделювання дефіцитних станів є важливим методом вивчення механізмів злоякісної трансформації. В даній роботі ми дослідили вплив пригнічення ензиматичних активностей сенсорно-сигнального протеїну IRE1/ERN1 на чутливість експресії пухлиноасоційованих генів до дефіциту глутаміну в клітинах гліоми лінії U87. Отримані дані свідчать про те, що за умов нестачі глутаміну у клітинах гліоми з нативним IRE1/ERN1 спостерігається зниження експресії більшості досліджених генів. При цьому виявили, що пригнічення ензиматичних активностей IRE1/ERN1 посилює вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *PERK*, *BIRC5*, *COL6A*, *ADGRE5* та *BRCA1*. З літературних даних відомо, що *PERK*, *BIRC5* та *DEK* сприяють адаптації та виживання пухлинних клітин та протидіють апоптозу. Оскільки відомо, що *ADGRE5* сприяє інвазії, міграції пухлинних клітин, зростання експресії мРНК *ADGRE5*, може вносити вклад у підвищення міграційного потенціалу пухлинних клітин гліоми при інгібуванні функціональної активності IRE1/ERN1 [1,124].

Нами було виявлено, що відсутність глутаміну знижувала експресію більшості досліджених генів: *ATF6*, *EIF2AK3/PERK*, *DEK*, *BRCA1*, *COL6A1*, *BIRC5*, *RAB5A* та *GLO1* у контрольних (трансфікованих пустим вектором) клітинах гліоми, збільшувала експресію *ADGRE5* та істотно не змінювала експресію *GNPDA1*. Пригнічення функції сигнального ензиму IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 змінювало ефект дефіциту глутаміну на експресію генів *BRCA1*, *BIRC5*, *DEK*, *ADGRE5* та *COL6A1*: індукувало ефект дефіциту глутаміну на *GNPDA1*, зменшувало — на *COL6A1* і посилювало — на *ADGRE5*, *ATF6*, *DEK*, *BIRC5* і *BRCA1*. При цьому варто відмітити, що пригнічення IRE1 посилювало чутливість експресії генів *PERK* та *BIRC5* до дефіциту глутаміну, та істотно модифікувало чутливість експресії експресії *ATF6* (Табл. 4.3).

Табл.4.3

Вплив дефіциту глутаміну на відносний рівень експресії досліджених генів за умов пригнічення протеїни IRE1 в клітинах гліоми

| Гени | U87 | | dnIRE1 | |
|---------------|------------|---|----------------------------------|---|
| | Контроль 1 | Дефіцит глутаміну (відносно Контролю 1) | Контроль 2 (відносно Контролю 1) | Дефіцит глутаміну (відносно Контролю 2) |
| <i>PERK</i> | 100% | ↓ (13%) | — | ↓ (56%) |
| <i>ATF6</i> | 100% | ↓(14%) | ↓(41%) | ↑ (184%) |
| <i>DEK</i> | 100% | ↓ (24%) | ↓ (18%) | ↓ (33%) |
| <i>BRCA1</i> | 100% | ↓ (48%) | ↑ (62%) | ↓ (52%) |
| <i>COL6A1</i> | 100% | ↓ (39%) | ↓ (72%) | ↓ (15%) |
| <i>BIRC5</i> | 100% | ↓ (24%) | ↓ (40%) | ↓ (57%) |
| <i>RAB5A</i> | 100% | ↓ (24%) | ↓ (77%) | — |
| <i>GLO1</i> | 100% | ↓ (36%) | ↓ (91%) | ↓ (31%) |
| <i>ADGRE5</i> | 100% | ↑ (18%) | ↓ (75%) | ↑ (77%) |
| <i>GNPDA1</i> | 100% | — | ↓ (56%) | ↑ (18%) |

Таким чином, дефіцит глутаміну змінював рівень експресії більшості досліджених генів у клітинах гліоми лінії U87 залежно від функціональної активності сигнального ензиму IRE1, який відповідає за контроль проліферації клітин та росту гліом, а такі зміни демонструють механізми IRE1 - опосередкованого пригнічення процесів проліферації в гліомах.

4.4. Взаємодія NAMPT із сигнальним протеїном IRE1 у процесах регуляції експресії генів

Сенсорно-сигнальний шлях IRE1 являється потужним молекулярним перемикачем, виступає регулятором проліферації клітин як в нормі, так і за патологій [202]. IRE1 - залежна активація сигнальних каскадів з одного боку веде до адаптації та виживаності пухлинних клітин, а з іншого до порушення

регуляції та запрограмованої загибелі [29]. На разі ведеться пошук потенційних генів мішеней, які б відігравали критичну роль в IRE1-залежній регуляції проліферації пухлинних клітин, та в комплексі посилювали б антипухлинну дію.

В межах даного дослідження ми обрали таргетний ген *NAMPT*, що є ключовим регулятором енергетичного балансу в клітині та відіграє важливу роль при злоякісній трансформації, зокрема й в гліомах [64]. Численні дослідження демонструють, що рівень експресії *NAMPT* підвищується у різних злоякісних пухлинах, а його пригнічення знижує інтенсивність процесів проліферації [79]. Відомо, що *NAMPT* асоційований з проліферацією та резистентністю до апоптозу [59]. Враховуючи різке зниження рівня експресії цього гена за умов пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1, ми показали, що *NAMPT* відіграє важливу роль в IRE1-опосередкованому пригніченні проліферації. При цьому нами було виявлено, що пригнічення IRE1 підвищує експресію *miR-182*, сайти зв'язування з якою були виявлені на 3'-кінцевій нетранслюючій послідовності мРНК *NAMPT*. Таким чином, нами продемонстровано, що IRE1-залежна регуляція експресії мРНК *NAMPT* може здійснюватись на пост-транскрипційному рівні за рахунок підвищення активності мікроРНК *miR-182*.

Відомо, що *NAMPT* бере участь в епітелійно-мезенхімних переходах шляхом активації сигнальних шляхів внаслідок чого пухлинні клітини набувають ознак стовбуровості, що підвищує резистентність пухлин до терапії [228]. Оскільки отримані результати свідчать, що *NAMPT* є залежним від стресу протеїном, а його рівень знижується при інгібуванні функціональної активності IRE1. З огляду на це, ми очікували побачити однонаправленні зміни в регуляції експресії досліджених пухлинозалежних генів як при вимкненні активності IRE1, так і при сайленсінгу *NAMPT*. У випадку блокади функції IRE1 відбувається зниження експресії більшості досліджених пухлинозалежних генів, що узгоджується з даними про зниження проліферації пухлинних клітин за даних умов [1,9]. Продемонстровано зниження експресії

ATF3 та *DEK* за умов пригнічення мРНК *NAMPT* та блокади функціональної активності IRE1, що свідчить про можливу причетність їх до активації антипроліферативних механізмів в клітинах гліоми. У той же час, підвищення експресії онкогенів *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2*, *PSAT1*, *TSPAN13*, *IGFBP3* і *IRS1* в сублінії клітин з сайленсінгом *NAMPT*, відображають механізми дерегуляції геному в умовах порушення його цілісності, та демонструють побічні ефекти від таргетного втручання. Ми вважаємо, що посилення експресії досліджених генів з вираженими онкогенними властивостями є наслідком адаптаційного репрограмування геному, за рахунок активації інших компенсаторно-регуляторних механізмів, та пов'язані з появою резистентності гліом до терапії.

IRE1 сигнальний шлях, в тісній взаємодії з іншими двома сигнальними шляхами стресу ER (PERK та ATF6), є потужним регулятором на системному рівні, активація якого в умовах стресу веде до тотального репрограмування функціонального стану клітини з метою адаптації та відновлення гомеостазу. Підвищення експресії онкогенів, яке ми спостерігали за сайленсінгу *NAMPT*, можливо, є наслідком активації IRE1 та інших сигнальних шляхів стресу ER за стресових умов, спрямоване на посилення процесів виживання.

Отримані нами результати описують побічні ефекти від таргетного втручання та показують важливість підтримки цілісності системи. Розуміння механізмів регулювання на генному рівні та репрограмування в пухлинних клітинах за умов зміни рівня експресії чи активності IRE1 і *NAMPT*, необхідне для оцінки та прогнозування наслідків таргетного втручання, що важливе для розробки нових стратегій боротьби з гліомами.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлений теоретичний аналіз і експериментальне рішення актуальної наукової задачі щодо міжгенних взаємодій в клітинах гліоми за умов сайленсінгу мРНК NAMPT та пригнічення сигнального протеїну IRE1, у репрограмуванні геному за умов порушення його функціональної цілісності. Отримані результати розкривають молекулярні механізми, що лежать в основі IRE1 та NAMPT залежного контролю проліферації пухлинних клітин і є важливими для оцінки та прогнозування наслідків таргетної терапії, дозволяють по новому оцінити використання потенційних мішеней у боротьбі з канцерогенезом.

1. Показано, що за умов повного та часткового пригнічення функціональної активності сигнального протеїну IRE1 у клітинах гліоми лінії U87 спостерігається різке зниження рівня експресії мРНК про-проліферативного гена *NAMPT*, що вказує на його причетність до IRE1-опосередкованого пригнічення проліферації клітин гліоми.

2. Встановлено, що у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1 знижується рівень експресії генів *ATF6*, *ATF3*, *DEK*, *BIRC5*, *RAB5C*, *GLO1*, *COL6A1* і *TGM2*, тоді як сайленсінг NAMPT змінює рівень експресії генів *BIRC5*, *RAB5C*, *TGM2* у протилежному напрямку.

3. Показано, що за умов сайленсінгу мРНК NAMPT пригнічується рівень експресії генів *ATF3*, *DEK*, *LIF*, *CLU*, *BNIP3* і *PER2*, а також маркерів проліферації *MKI67* та *PCNA* та підвищується рівень експресії генів *IGFBP3*, *IRS1*, *PSAT1*, *TSPAN13*.

4. Встановлено, що гіпоксія по-різному змінює рівень експресії досліджених генів, а пригнічення функціональної активності IRE1 модифікує вплив гіпоксії на експресію більшості з них, а це вказує на наявність складних механізмів гіпоксичної регуляції експресії генів і причетність до них IRE1-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула.

5. Показано, що пригнічення сигнального протеїну IRE1 модифікує ефект дефіциту глутаміну на експресію більшості досліджених генів і це вказує на опосередковану стресом регуляцію метаболізму за умов пригнічення IRE1.

6. Різноманітний характер змін експресії багатьох досліджених генів у клітинах гліоми за умов пригнічення IRE1, а також сайленсінгу NAMPT вказує на наявність складних міжгенних взаємодій і репрограмування геному в умовах порушення його функціональної цілісності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Auf G, Jabouille A, Guérit S, et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cnanecr*. 2013. Vol. 13, P. 597.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol*. 2016. Vol. 18.
3. Schiera G, Di Liegro CM, Di Liegro I. Molecular determinants of malignant brain cancers: From intracellular alterations to invasion mediated by extracellular vesicles. *Int J Mol Sci*. 2017. Vol. 18, N 12. P. 2774.
4. Khasraw M, Lassman AB. Advances in the treatment of malignant Gliomas. *Curr Oncol Rep*. 2010. Vol. 12, N 1. P. 26-33.
5. Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology*. 2019. Vol. 39, N 1. P. 3-13.
6. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016. Vol. 23, N 1. P. 27-47.
7. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013. Vol. 12, N 9. P. 703-19.
8. Lin L, Cai J, Jiang C. Recent Advances in Targeted Therapy for Glioma. *Curr Med Chem*. 2017. Vol. 24, N 13. P. 1365-81.
9. Dejeans N, Pluquet O, Lhomond S, et al. Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1 α -mediated cleavage of SPARC mRNA. *J Cell Sci*. 2012. Vol. 125, N 18. P. 4278-87.
10. Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Malignancy: A Review. *Genes and Cancer*. 2013. Vol. 4, N 11-12. P. 447-56.
11. Tateishi K, Higuchi F, Miller JJ, et al. The alkylating chemotherapeutic temozolomide induces metabolic stress in IDH1-mutant cancers and potentiates

NAD⁺ depletion-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 2017. Vol. 77, N 15. P. 4102-15.

12. Van Horssen R, Willemsse M, Haeger A, et al. Intracellular NAD(H) levels control motility and invasion of glioma cells. *Cell Mol Life Sci.* 2013. Vol. 70, N 12. P. 2175-90.

13. Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY. NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene.* 2011. Vol. 30, N 8. P. 907-21.

14. Guo Q, Han N, Shi L, Yang , Zhang X, Zhou Y. NAMPT: A potential prognostic and therapeutic biomarker in patients with glioblastoma. *J Cancer.* 2019. Vol.23, N 3. P. 963-72.

15. Grolla AA, Miggiano R, Marino D Di, et al. A nicotinamide phosphoribosyltransferase–GAPDH interaction sustains the stress-induced NMN/NAD⁺ salvage pathway in the nucleus. *J Biol Chem.* 2020. Vol. 295, N 11. P. 3635-51.

16. Svoboda P, Krizova E, Sestakova S, et al. Nuclear transport of nicotinamide phosphoribosyltransferase is cell cycle– dependent in mammalian cells, and its inhibition slows cell growth. *J Biol Chem.* 2019. Vol. 294, N 22. P. 8676–89.

17. Neubauer K, Bednarz-Misa I, Walecka-Zacharska E, et al. Oversecretion and overexpression of nicotinamide phosphoribosyltransferase/pre-B colony-enhancing factor/visfatin in inflammatory bowel disease reflects the disease activity, severity of inflammatory response and hypoxia. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, N 1. P. 166.

18. Yadav RK, Chae S-W, Kim H-R, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *J Cancer Prev.* 2014. Vol. 19, N. 2. P. 425-43.

19. Stolz A, Wolf DH. Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010. Vol. 1803, N 6. P. 12727-47.

20. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian

unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng*. 2011. Vol. 108, N 12. P. 409.

21. Minchenko OH, Kharkova AP, Bakalets T V., Kryvdiuk I V. Endoplasmic reticulum stress, its sensor and signalling systems and the role in regulation of gene expression at malignant tumor growth and hypoxia. *Ukr Biokhimichni Zhurnal*. 2013. Vol. 85, N 5. P. 5-16.

22. Manié SN, Lebeau J, Chevet E. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: An update. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2014. Vol. 307, N 10. P. 901-7.

23. Wang Z, Sun J, Zhao Y, Guo W, Lv K, Zhang Q. Lentivirus-mediated knockdown of tumor protein D52-like 2 inhibits glioma cell proliferation. *Cell Mol Biol*. 2014. Vol.60, N 1. P. 39-44.

24. Blais JD, Filipenko V, Bi M, et al. Activating Transcription Factor 4 Is Translationally Regulated by Hypoxic Stress. *Mol Cell Biol*. 2004. Vol. 24, N 17. P. 7469-82.

25. Ye J, Koumenis C. ATF4, an ER Stress and Hypoxia-Inducible Transcription Factor and its Potential Role in Hypoxia Tolerance and Tumorigenesis. *Curr Mol Med*. 2009. Vol. 9, N 4. P. 411-6.

26. Saito A, Ochiai K, Kondo S, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem*. 2011. Vol. 286, N 6. P. 4809-18.

27. Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2 α /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol Ther*. 2006. Vol. 5, N 7. P. 723-8.

28. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011. Vol. 13, N 3. P. 184-90.

29. Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov*. 2015. Vol. 5, N 6. P. 586-97.

30. Jäger R, Bertrand MJM, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during

endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell*. 2012. Vol. 104, N 5. P. 259-70.

31. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 2006. Vol. 86, N 4. P. 1133-49.

32. Cao J, Dai DL, Yao L, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2012. Vol. 364, N 1-2. P. 115-29.

33. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*. 2012. Vol.197, N 7. P. 857-67.

34. Chen Y, Brandizzi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol*. 2013. Vol. 23, N 11. P. 547-55.

35. Jiang D, Niwa M, Koong AC. Targeting the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. *Semin Cancer Biol*. 2015. Vol. 33. P. 48-56.

36. Sun S, Shi G, Sha H, et al. IRE1 α is an endogenous substrate of endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Nat Cell Biol*. 2015. Vol. 17, N 12. P. 1546-55.

37. Casas C. GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Front Neurosci*. 2017. Vol. 11, N 177.

38. Poothong J, Tirasophon W, Kaufman RJ. Functional analysis of the mammalian RNA ligase for IRE1 in the unfolded protein response. *Biosci Rep*. 2017. Vol. 37, N 2.

39. Tam AB, Koong AC, Niwa M. Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Rep*. 2014. Vol. 9, N 3. P 850-8.

40. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2009. Vol.186, N 3. P. 323-31.

41. Prischi F, Nowak PR, Carrara M, Ali MMU. Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity. *Nat Commun*. 2014. Vol. 5 .P. 3554.

42. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, et al. ASK1 is essential for

endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* 2002. Vol. 6, N 11. P. 1345-55.

43. Ventura JJ, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell.* 2006. Vol. 21, N 5. P. 701-10.

44. Dong D, Stapleton C, Luo B, et al. A critical role for GRP78/BiP in the tumor microenvironment for neovascularization during tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2011. Vol. 71, N 8. P. 2848-57.

45. Tsymbal DO, Minchenko DO, Kryvdiuk I V., et al. Expression of proliferation related transcription factor genes in U87 glioma cells with IRE1 knockdown: upon glucose and glutamine deprivation. *Fiziol Zh.* 2016. Vol. 62, N 1. P. 3-15.

46. C. H, L.H. G. Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1alpha Interactome. *Mol Cell.* 2009. Vol. 35, N 5. P. 551-61.

47. Woehlbier U, Hetz C. Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends Biochem Sci.* 2011. Vol. 36, N 6. P. 329-37.

48. Minchenko DO, Kubaichuk KI, Ratushna OO, Komisarenko S V., Minchenko OH. The vascular endothelial growth factor genes expression in glioma U87 cells is dependent from ERN1 signaling enzyme function. *Adv Biol Chem.* 2012. Vol. 2, N 2.

49. Pereira ER, Liao N, Neale GA, Hendershot LM. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response. *PLoS One.* 2010. Vol. 5, N. 9.

50. Friebe D, Neef M, Kratzsch J, et al. Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia.* 2011. Vol. 54, N 5. P. 1200-11.

51. Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: Signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci.* 2004. Vol. 29, N 3. P. 111-8.

52. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways. *FEBS Lett.* 2008. Vol. 582, N 1. P. 46-53.
53. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol.* 1994. Vol. 14, N 2. P. 1431-7.
54. Tabassum S, Li Y, Chi L, Li C, Zhang Z. Efficient nitrification treatment of comprehensive industrial wastewater by using Novel Mass Bio System. *J Clean Prod.* 2018. Vol.172. P. 368-384.
55. Zhang Z, Zhang Y, Chen Y. Recent advances in partial denitrification in biological nitrogen removal: From enrichment to application. *Bioresour Technol.* 2020. Vol. 298. P. 1224-44.
56. Flehmig G, Scholz M, Klötting N, et al. Identification of adipokine clusters related to parameters of fat mass, insulin sensitivity and inflammation. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, N 6.
57. Huang Z, Tian G, Cheng S, et al. Polydatin attenuates atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice through PBEF mediated reduction of cholesterol deposition. *Am J Chin Med.* 2018. Vol.46, N 8. P. 1841-1859.
58. Koch A, Weiskirchen R, Krusch A, et al. Visfatin Serum Levels Predict Mortality in Critically Ill Patients. *Dis Markers.* 2018. Vol. 2, N 1.
59. Carbone F, Liberale L, Bonaventura A, et al. Regulation and function of extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin. *Compr Physiol.* 2017. Vol. 7, N 2. P. 603-621.
60. Martin PR, Shea RJ, Mulks MH. Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *J Bacteriol.* 2001. Vol. 183, N 4. P. 1168-74.
61. Revollo JR, Grimm AA, Imai SI. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, N 49. P. 50754-63.
62. Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent

modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 2004. Vol. 119, N 6. P. 803-14.

63. Olesen UH, Hastrup N, Sehested M. Expression patterns of nicotinamide phosphoribosyltransferase and nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human malignant lymphomas. *APMIS*. 2011. Vol. 119, N 4-5. P. 296-303.

64. Reddy PS, Umesh S, Thota B, et al. PBEF1/NAmPRTase/Visfatin: A potential malignant astrocytoma/glioblastoma serum marker with prognostic value. *Cancer Biol Ther*. 2008. Vol. 7, N 5. P. 663-8.

65. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. 2010. Vol. 2, N 31.

66. Ho C, van der Veer E, Akawi O, Pickering JG. SIRT1 markedly extends replicative lifespan if the NAD⁺ salvage pathway is enhanced. *FEBS Lett*. 2009. Vol. 583, N 18. P. 3081-5.

67. Heske CM. Beyond Energy Metabolism: Exploiting the Additional Roles of NAMPT for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2020; Vol. 9. P. 1514.

68. Tan Y, Yamada-Mabuchi M, Arya R, et al. Coordinated expression of cell death genes regulates neuroblast apoptosis. *Development*. 2011. Vol. 138, N 11. P. 2197-206.

69. Thakur BK, Dittrich T, Chandra P, et al. Involvement of p53 in the cytotoxic activity of the NAMPT inhibitor FK866 in myeloid leukemic cells. *Int J Cancer*. 2012. Vol. 132, N 11. P. 766-74.

70. Audrito V, Messana VG, Deaglio S. NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. *Front Oncol*. 2020; Vol. 10. P. 358.

71. Lydia B, Yina Z, Nina K, et al. Targeting c-MYC through Interference with NAMPT and SIRT1 and Their Association to Oncogenic Drivers in Murine Serrated Intestinal Tumorigenesis. *Neoplasia (United States)*. 2019. Vol. 21, N 10. P. 974-988.

72. Menssen A, Hydbring P, Kapelle K, et al. The c-MYC oncoprotein, the

NAMPT enzyme, the SIRT1-inhibitor DBC1, and the SIRT1 deacetylase form a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Vol. 109, N 4. P. 187-96.

73. Li HJ, Che XM, Zhao W, et al. Diet-induced obesity promotes murine gastric cancer growth through a nampt/sirt1/c-myc positive feedback loop. *Oncol Rep*. 2013. Vol. 39, N 5. P. 2153-60.

74. Gholinejad Z, kheiripour N, Nourbakhsh M, et al. Extracellular NAMPT/Visfatin induces proliferation through ERK1/2 and AKT and inhibits apoptosis in breast cancer cells. *Peptides*. 2017. Vol. 92. P. 9-15.

75. Ognjanovic S, Bao S, Yamamoto SY, Garibay-Tupas J, Samal B, Bryant-Greenwood GD. Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*. 2001. Vol. 26, N 2. P. 107-17.

76. Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest*. 2004. Vol. 113, N 9. P. 1318-27.

77. Aboud OA, Chen CH, Senapedis W, Baloglu E, Argueta C, Weiss RH. Dual and specific inhibition of NAMPT and PAK4 by KPT-9274 decreases kidney cancer growth. *Mol Cancer Ther*. 2016. Vol. 15, N 9. P. 2119-29.

78. Feng J, Yan PF, Zhao HY, Zhang FC, Zhao WH, Feng M. Inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase sensitizes glioblastoma cells to temozolomide via activating ROS/JNK signaling pathway. *Biomed Res Int*. 2016. Vol. 5. P. 1-11.

79. Alaei M, Khaghani S, Behroozfar K, Hesari Z, Ghorbanhosseini SS, Nourbakhsh M. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase induces apoptosis in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *J Breast Cancer*. 2017. Vol. 20, N 1. P. 20-26.

80. Xu R, Yuan Z, Lijuan Y, Li L, Li D, Lv C. Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress. *Oncol Rep*. 2017. Vol. 28, N 3. P. 1767-1773.

81. Tabassum A, Zaidi SNF, Yasmeen K, Mahboob T. Potential role of

peroxisome proliferator activated receptor gamma activation on serum visfatin and trace elements in high fat diet induced type 2 diabetes mellitus. *Life Sci.* 2018. Vol. 205. P. 164-175.

82. Hasmann M, Schemainda I. FK866, a Highly Specific Noncompetitive Inhibitor of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Represents a Novel Mechanism for Induction of Tumor Cell Apoptosis. *Cancer Res.* 2003. Vol. 63, N 21. P. 7436-42.

83. Tarrant JM, Dhawan P, Singh J, et al. Preclinical models of nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitor-mediated hematotoxicity and mitigation by co-treatment with nicotinic acid. *Toxicol Mech Methods.* 2015. Vol. 25, N 3. P. 201-11.

84. Bong IPN, Ng CC, Fakiruddin SK, Lim MN, Zakaria Z. Small interfering RNA-mediated silencing of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and lysosomal trafficking regulator (LYST) induce growth inhibition and apoptosis in human multiple myeloma cells: A preliminary study. *Bosn J basic Med Sci.* 2016. Vol. 16, N 4. P. 268-275.

85. Lucena-Cacace A, Otero-Albiol D, Jiménez-García MP, Peinado-Serrano J, Carnero A. NAMPT overexpression induces cancer stemness and defines a novel tumor signature for glioma prognosis. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, N 59. P. 99514-99530.

86. Zhao H, Tang W, Chen X, et al. The NAMPT/E2F2/SIRT1 axis promotes proliferation and inhibits p53-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. Vol. 493, N 1. P. 77-84.

87. Hesari Z, Nourbakhsh M, Hosseinkhani S, et al. Down-regulation of NAMPT expression by mir-206 reduces cell survival of breast cancer cells. *Gene.* 2018. Vol. 673. P.

88. Yu L, Chen X, Wang L, Chen S. The sweet trap in tumors: Aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, N 25. P. 38908-26.

89. Dang C V. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012.

Vol. 26, N 9. P. 877-90.

90. Yaku K, Okabe K, Hikosaka K, Nakagawa T. NAD metabolism in cancer therapeutics. *Front Oncol.* 2018. Vol. 12, N 8. P. 622.

91. Murphy JP, Giacomantonio MA, Paulo JA, et al. The NAD + Salvage Pathway Supports PHGDH-Driven Serine Biosynthesis. *Cell Rep.* Published online 2018. Vol. 24, N 9. P. 2381-91.

92. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. Vol. 11, N 3. P. 220-8.

93. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* Published online 2011. Vol. 144, N 5. P. 646-74.

94. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet.* 2005. Vol. 37, N 7. P. 766-70.

95. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005. Vol. 37, N 5. P. 495-500.

96. Luo G, Luo W, Sun X, et al. MicroRNA-21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and β -catenin signaling. *Mol Med Rep.* 2017. Vol. 15, N 1. P. 187-193.

97. Chen LP, Zhang NN, Ren XQ, He J, Li Y. miR-103/miR-195/miR-15b regulate SALL4 and inhibit proliferation and migration in glioma. *Molecules.* 2018. Vol. 23, N 11.

98. Annibali D, Whitfield JR, Favuzzi E, et al. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nat Commun.* 2014. Vol. 18, N 5. P. 4632.

99. Ko JY, Oh S, Yoo KH. Functional enhancers as master regulators of Tissue-Specific gene regulation and cancer development. *Mol Cells.* 2017. Vol. 40, N 3. P. 169-177.

100. Xie JJ, Xie YM, Chen B, et al. ATF3 functions as a novel tumor suppressor with prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014. Vol. 5, N 18. P. 8569-82.

101. Hai T, Wolford CC, Chang YS. ATF3, a hub of the cellular adaptive-response network, in the pathogenesis of diseases: Is modulation of inflammation a unifying component? *Gene Expr.* 2010. Vol. 15, N 1. P.1-11.
102. Sandén C, Gullberg U. The DEK oncoprotein and its emerging roles in gene regulation. *Leukemia.* 2015. Vol. 29, N 8. P. 1632-6.
103. Riveiro-Falkenbach E, Soengas MS. Control of tumorigenesis and chemoresistance by the DEK oncogene. *Clin Cancer Res.* 2010;. Vol. 16, N 11. P. 2932-8.
104. Feng T, Liu Y, Li C, Li Z, Cai H. DEK proto-oncogene is highly expressed in astrocytic tumors and regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Tumor Biol.* 2017. Vol. 39, N 7.
105. Edwards LA, Li A, Berel D, et al. ZEB1 regulates glioma stemness through LIF repression. *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, N .1 P. 69.
106. Li X, Yang Q, Yu H, et al. LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget.* 2014. Vol.5 , N 3. P. 788-801.
107. Deng CX. BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34, N 5. P. 73-112.
108. Lee A, Moon BI, Kim TH. BRCA1/BRCA2 pathogenic variant breast cancer: Treatment and prevention strategies. *Ann Lab Med.* 2020. Vol. 40, N 2. P. 114-121.
109. Zhao Z, Liu H, Hou J, et al. Tumor protein D52 (TPD52) inhibits growth and metastasis in renal cell carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Res.* 2017. Vol. 25, N 5. P. 773-779.
110. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009. Vol. 124, N 3. P. 511-5.
111. Michel D, Chatelain G, North S, Brun G. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J.* 1997. Vol. 328, N 1. P. 45-50.
112. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG. Modulation

of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene*. 2004. Vol. 23, N 13. P. 2298-304.

113. Koltai T. Clusterin: A key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Onco Targets Ther*. 2014. Vol. 20, N 7. P. 447-56.

114. Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003. Vol. 2, N 4. P. 372-8.

115. Cheung CHA, Chang YC, Lin TY, Cheng SM, Leung E. Anti-apoptotic proteins in the autophagic world: An update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE. *J Biomed Sci*. 2020. Vol.27, N 1. P. 31.

116. Gao S, Ge A, Xu S, et al. PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3 β / β -catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017. Vol. 36, N 1. P.179.

117. Teo CF, Wollaston-Hayden EE, Wells L. Hexosamine flux, the O-GlcNAc modification, and the development of insulin resistance in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2010. Vol. 318, N 2. P. 44-53.

118. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: A review. *Diabetologia*. 2001. Vol. 44, N 2. P. 129-46.

119. Rabbani N, Xue M, Weickert MO, Thornalley PJ. Multiple roles of glyoxalase 1-mediated suppression of methylglyoxal glycation in cancer biology—Involvement in tumour suppression, tumour growth, multidrug resistance and target for chemotherapy. *Semin Cancer Biol*. 2018. Vol. 49. P. 83-93.

120. Li Z, Qiu HY, Jiao Y, et al. Growth and differentiation effects of homer3 on a leukemia cell line. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013. Vol. 14, N 4. P. 2525-8.

121. Shen TY, Mei LL, Qiu YT, Shi ZZ. Identification of candidate target genes of genomic aberrations in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016. Vol. 12, N 4. P. 2956-2961.

122. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J Cell*

Biol. 2006. Vol. 172, N 7. P. 973-981.

123. Turtoi A, Blomme A, Bianchi E, et al. Accessibilome of human glioblastoma: Collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome. *J Proteome Res.* 2014. Vol. 13, N 12. P. 5660-9.

124. Aust G, Zhu D, Van Meir EG, Xu L. Adhesion GPCRs in tumorigenesis. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2016. Vol. 234. 5660-9.

125. Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GVW. Tissue transglutaminase: A possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol.* 2000 Vol. 61, N 5. P. 439-63.

126. Singer CF, Hudelist G, Walter I, et al. Tissue array-based expression of transglutaminase-2 in human breast and ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2006. Vol. 23, N 1. P. 33-9.

127. Mann AP, Verma A, Sethi G, et al. Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factor- κ B in cancer cells: Delineation of a novel pathway. *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, N 17. P. 8788-95.

128. Zhang D, Lu C, Ai H. Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. *Mol Med Rep.* 2017. Vol. 16, N 4. P. 4569-4576.

129. Zhou Z, Cai Z, Wang J, Cai Z, Wu J. TSPAN13 is overexpressed in ER-positive breast cancers and contributes to tumor progression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016. Vol. 9, N 6. P. 5980-5988.

130. Veenbergen S, van Spriël AB. Tetraspanins in the immune response against cancer. *Immunol Lett.* 2011. Vol. 138, N 2. P. 129-36.

131. Li P, Dong M, Wang Z. Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). *Bosn J basic Med Sci.* 2019. Vol. 19, N 2. P. 146-154.

132. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev.* 2002. Vol. 23, N 6. P. 192-202.

133. Ingermann AR, Yang YF, Han J, et al. Identification of a novel cell

death receptor mediating IGFBP-3-induced anti-tumor effects in breast and prostate cancer. *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285, N 39. P. 30233-46.

134. Piper AJ, Clark JL, Mercado-Matos J, et al. Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) and IRS-2 expression levels are associated with prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *PLoS One*. 2019. Vol. 14, N 8.

135. Luan Y, Zuo L, Zhang S, Wang G, Peng T. MicroRNA-126 acts as a tumor suppressor in glioma cells by targeting insulin receptor substrate 1 (IRS-1). *Int J Clin Exp Pathol*. 2015. Vol. 8, N 9. P. 10345-54.

136. Burton TR, Henson ES, Baijal P, Eisenstat D, Gibson SB. The pro-cell death Bcl-2 family member, BNIP3, is localized to the nucleus of human glial cells: Implications for glioblastoma multiforme tumor cell survival under hypoxia. *Int J Cancer*. 2006. Vol. 118, N 7. P. 1660-9.

137. Jiang Y, Li L, Ma J, et al. Auricular vagus nerve stimulation promotes functional recovery and enhances the post-ischemic angiogenic response in an ischemia/reperfusion rat model. *Neurochem Int*. 2016. Vol. 97. P. 73-82.

138. Bacon AL, Harris AL. Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Ann Med*. 2004. Vol. 36, N 7. P. 530-9.

139. Burton TR, Eisenstat DD, Gibson SB. BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) Acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. *J Neurosci*. 2009. Vol. 29, N 13. P. 4189-99.

140. Du Y, Li J, Xu T, Zhou DD, Zhang L, Wang X. MicroRNA-145 induces apoptosis of glioma cells by targeting BNIP3 and Notch signaling. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, N 37. P. 61510-61527.

141. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. Vol. 111, N 45. P. 16219-24.

142. Savvidis C, Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Mol Med*. 2012. Vol. 18, N 9. P. 324-31.

143. Shaashua L, Mayer S, Lior C, Lavon H, Novoselsky A, Scherz-Shouval

R. Stromal Expression of the Core Clock Gene Period 2 Is Essential for Tumor Initiation and Metastatic Colonization. *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8. P. 1-12.

144. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. Vol. 96, N 7. P. 3706-11.

145. Wang HH, Chang TY, Lin WC, Wei KC, Shin JW. GADD45A plays a protective role against temozolomide treatment in glioblastoma cells. *Sci Rep.* 2017. Vol. 7, N 1. P. 8814.

146. Nawaz MH, Ferreira JC, Nedyalkova L, et al. The catalytic inactivation of the N-half of human hexokinase 2 and structural and biochemical characterization of its mitochondrial conformation. *Biosci Rep.* 2018. Vol. 38, N 1.

147. Zhuo B, Li Y, Li Z, et al. PI3K/Akt signaling mediated Hexokinase-2 expression inhibits cell apoptosis and promotes tumor growth in pediatric osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015. Vol. 464, N 2. P. 401-6.

148. Liu H, Liu N, Cheng Y, et al. Hexokinase 2 (HK2), the tumor promoter in glioma, is downregulated by miR-218/Bmi1 pathway. *PLoS One.* 2017. Vol. 12, N 12.

149. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003. Vol. 3, N 10. P. 721-32.

150. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007. Vol. 26, N 2. P. 225-39.

151. Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TAM, Mathiesen B, Galappathi K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int J Cancer.* 2010. Vol. 127, N 7. P. 1535-46.

152. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015. Vol. 11, N 3. P. 83-92.

153. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and phosphorylation: Impact on stability, localization, and transactivity. *Front Cell Dev Biol.* 2016. Vol. 23, N 4. P. 11.

154. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2002. Vol. 277, N 6. P. 23111-5.
155. Lenihan CR, Taylor CT. The impact of hypoxia on cell death pathways. In: *Biochemical Society Transactions.* ; 2013. Vol. 41, N 2. P. 657-63.
156. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 2008. Vol. 7, N 1. P. 11-20.
157. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2010. Vol. 86, N 2. P. 236-42.
158. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.* 2013. Vol. 123, N 9. P. 3664-71.
159. Feldman DE, Chauhan V, Koong AC. The unfolded protein response: A novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res.* Published online 2005. Vol. 3, N 11. P. 597-605.
160. Moenner M, Pluquet O, Bouche-careilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, N 22. P. 10631-4.
161. Chen J, Zhang C, Mi Y, Chen F, Du D. CREB1 regulates glucose transport of glioma cell line U87 by targeting GLUT1. *Mol Cell Biochem.* 2017; Vol. 436, N 1. P. 79-86.
162. Allen AE, Locasale JW. Glucose Metabolism in Cancer: The Saga of Pyruvate Kinase Continues. *Cancer Cell.* 2018. Vol. 33, N 3. P. 337-339.
163. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009. Vol. 234. P. 1029-33.
164. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015. Vol. 356. P. 156-64.

165. Boroughs LK, Deberardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol.* 2015. Vol. 17, N 4. P. 351-9.
166. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2016. Vol. 73, N 2. P. 377-92.
167. Heiden Vander MG, Lunt SY, Dayton TL, et al. Metabolic pathway alterations that support: Cell Proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011. Vol. 76. P. 325-34.
168. Tan B, Young DA, Lu ZH, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an enzyme essential for NAD⁺ biosynthesis, in human cancer cells: Metabolic basis and potential clinical implications. *J Biol Chem.* 2013. Vol. 288, N 5. P. 3500-11.
169. Hallows WC, Yu W, Denu JM. Regulation of glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase-1 by Sirt1 protein-mediated deacetylation. *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, N 6. P. 3850-8.
170. Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014. Vol. 46, N 3. P. 214-9.
171. Sun L, Suo C, Li S ting, Zhang H, Gao P. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2018. Vol.1870, N 1. P. 51-66.
172. Mates JM, Segura JA, Martin-Rufian M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Marquez J. Glutaminase Isoenzymes as Key Regulators in Metabolic and Oxidative Stress Against Cancer. *Curr Mol Med.* 2013. Vol. 13, N 4. P. 514-34.
173. Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, Locasale JW. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends in Cancer.* 2017. Vol. 3, N 3. P. 169-180.
174. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 2012. Vol. 481, N 7381. P. 380-4.
175. Cetinbas NM, Sudderth J, Harris RC, et al. Glucose-dependent anaplerosis in cancer cells is required for cellular redox balance in the absence of

glutamine. *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. P. 32606.

176. Katt WP, Cerione RA. Glutaminase regulation in cancer cells: A druggable chain of events. *Drug Discov Today*. 2014. Vol. 19, N 4. P. 450-7.

177. Reynolds MR, Lane AN, Robertson B, et al. Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene*. 2014. Vol. 33, N 5. P. 556-66.

178. Wise DR, Deberardinis RJ, Mancuso A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, N 48. P. 18782-7.

179. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017. Vol. 19. P. 163-194.

180. Choi YK, Park KG. Targeting glutamine metabolism for cancer treatment. *Biomol Ther*. 2018. Vol. 26, N 1. P. 19-28.

181. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell*. Published online 2009. Vol. 136, N 3. P. 521-34.

182. Zhang LF, Jiang S, Liu MF. MicroRNA regulation and analytical methods in cancer cell metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2017. Vol. 74, N 16. P. 2929-2941.

183. Kaadige MR, Looper RE, Kamalanaadhan S, Ayer DE. Glutamine-dependent anapleurosis dictates glucose uptake and cell growth by regulating MondoA transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Vol. 106, N 35. P. 14878-83.

184. Auf G, Jabouille A, Delugin M, et al. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer*. 2013. Vol. 13. P. 597.

185. Sasai K, Akagi T, Aoyanagi E, Tabu K, Kaneko S, Tanaka S. O6-methylguanine-DNA methyltransferase is downregulated in transformed astrocyte cells: Implications for anti-glioma therapies. *Mol Cancer*. Published online 2007. Vol. 6. P. 36.

186. Ota A, Wang Y. Cdc37/Hsp90 protein-mediated regulation of IRE1 α

protein activity in endoplasmic reticulum stress response and insulin synthesis in INS-1 cells. *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, N 9. P. 6266-74.

187. Armstead VE, Minchenko AG, Campbell B, Lefer AM. P-selectin is up-regulated in vital organs during murine traumatic shock. *FASEB J.* 1997. Vol. 11, N 14. P. 1271-9.

188. Гланц С. Медико-Биологическая Статистика. Москва 1999. 459 с.

189. Drogat B, Auguste P, Nguyen DT, et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, N 14. P. 6700-7.

190. Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY. NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene.* 2011. Vol. 30, N 8. P. 907-21.

191. Ma S, Pang C, Song L, Guo F, Sun H. Activating transcription factor 3 is overexpressed in human glioma and its knockdown in glioblastoma cells causes growth inhibition both in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2015. Vol. 35, N 6. P. 1561-73.

192. Yin J, Oh YT, Kim JY, et al. Transglutaminase 2 inhibition reverses mesenchymal transdifferentiation of glioma stem cells by regulating C/EBP β signaling. *Cancer Res.* 2017. Vol. 77, N 18. P. 4973-4984.

193. Cheleschi S, Giordano N, Volpi N, et al. A complex relationship between visfatin and resistin and microrna: An in vitro study on human chondrocyte cultures. *Int J Mol Sci.* 2018. Vol. 19, N 12. P. 3909.

194. Liang N, Chen Y, Yang L, He S, Liu T. Visfatin increases miR-21 to promote migration in HCC. *Cell Mol Biol.* 2018. Vol. 64, N 6. P. 48-52.

195. Nielsen KN, Peics J, Ma T, et al. NAMPT-mediated NAD + biosynthesis is indispensable for adipose tissue plasticity and development of obesity. *Mol Metab.* 2018. Vol. 11. P. 178-188.

196. Shi C, Wu H, Du D, et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor APO866 Prevents IL-1 β -Induced Human Nucleus Pulposus Cell

Degeneration via Autophagy. *Cell Physiol Biochem*. 2018. Vol. 49, N 6. P. 2463-2482.

197. Sun Y, Zhou J, Shi L, Li J, Chen J. MicroRNA-466 inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by directly targeting insulin receptor substrate 1. *Mol Med Rep*. 2019. Vol. 19, N 4. P. 3345-3352.

198. Wu L, Li Y, Li J, Ma D. MicroRNA-664 targets insulin receptor substrate 1 to suppress cell proliferation and invasion in breast cancer. *Oncol Res*. 2019. Vol. 27, N 4. P. 459-467.

199. Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol*. 2011. Vol. 28, N 1. P. 13-24.

200. Jain RK, Di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007. Vol. 2. P. 27-47.

201. Chevet E, Hetz C, Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discov*. 2015. Vol. 5, N 6. P. 586-597.

202. Pluquet O, Dejeans N, Bouchecareilh M, et al. Posttranscriptional regulation of per1 underlies the oncogenic function of IRE α . *Cancer Res*. 2013. Vol. 73, N 15. P. 4732-43.

203. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci*. 2014. Vol. 39, N 5. P. 245-54.

204. Nicoloso MS, Calin GA. MicroRNA involvement in brain tumors: From bench to bedside. In: *Brain Pathology*. ; 2008. Vol. 18, N 1. P. 122-9.

205. Bi TQ, Che XM. Nampt/PBEF/visfatin and cancer. *Cancer Biol Ther*. 2010. Vol. 10, N 2. P. 119-25.

206. Minchenko OH, Kharkova AP, Bakalets T V., Kryvdiuk I V. Endoplasmic reticulum stress, its sensor and signalling systems and the role in regulation of gene expression at malignant tumor growth and hypoxia. *Ukr Biokhimichnyi Zhurnal*. 2013. Vol. 85, N 5. P. 5-16.

207. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J*. 2005. Vol. 24, N 19. P. 3470-81.

208. Dadey DYA, Kapoor V, Khudanyan A, et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, N 2. P. 2080-92.

209. Geng X, Ma J, Zhang F, Xu C. Glyoxalase i in tumor cell proliferation and survival and as a potential target for anticancer therapy. *Oncol Res Treat*. 2014. Vol. 37, N 10. P. 570-4.

210. Minchenko DO, Danilovskyi S V., Kryvdiuk I V., et al. Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis*. 2014. Vol. 1. P. 8-26.

211. Ding J, Wu S, Zhang C, et al. BRCA1 identified as a modulator of temozolomide resistance in P53 wild-type GBM using a high-throughput shRNA-based synthetic lethality screening. *Am J Cancer Res*. 2019. Vol. 9, N 11. P. 2428-2441.

212. Wang J, Xie C, Pan S, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 inhibits human cholangiocarcinoma progression and is regulated by leukemia inhibitory factor/MicroRNA-181c negative feedback pathway. *Hepatology*. 2016. Vol. 64, N 5. P. 1606-1622.

213. Liu J, Yu H, Hu W. LIF is a new p53 negative regulator. *J Nat Sci*. 2015. Vol. 1, N 7.

214. Criswell T, Klokov D, Beman M, Lavik JP, Boothman DA. Repression of IR-inducible clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*. 2003. Vol. 2, N 4. P. 372-80.

215. Li F, Aljahdali I, Ling X. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: What can we do after over two decades of study? *J Exp Clin Cancer Res*. 2019. Vol. 38, N 1. P. 68.

216. de Graaff MA, Malu S, Guardiola I, et al. High-Throughput Screening of Myxoid Liposarcoma Cell Lines: Survivin Is Essential for Tumor Growth. *Transl Oncol*. 2017. Vol. 10, N 4. P. 546-554.

217. Huang SP, Chan YC, Huang SY, Lin YF. Overexpression of PSAT1 gene is a favorable prognostic marker in lower-grade gliomas and predicts a

favorable outcome in patients with IDH1 mutations and chromosome 1p19q codeletion. *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N 1. P.13.

218. Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*. 2004. Vol. 70, N 2. P. 217-28.

219. Giese A, Loo MA, Tran N, Haskett D, Coons SW, Berens ME. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer*. 1996. Vol. 67, N 2. P. 275-82.

220. Tan X, Wang S, Yang B, et al. The CREB-miR-9 Negative Feedback Minicircuitry Coordinates the Migration and Proliferation of Glioma Cells. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 11.

221. Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, et al. Rab5c promotes AMAP1-PRKD2 complex formation to enhance β 1 integrin recycling in EGF-induced cancer invasion. *J Cell Biol*. 2012. Vol. 197, N 7. P. 983-96.

222. Zhang J, Du Y ying, Lin Y feng, et al. The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;. Vol. 377, N 1. P.136-40.

223. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*. 2001. Vol. 93, N 4. P. 266-76.

224. Muz B, De La Puente P, Azab F, Luderer M, Azab AK. The role of hypoxia and exploitation of the hypoxic environment in hematologic malignancies. *Mol Cancer Res*. 2014. Vol. 12, N 10. P. 1347-54.

225. Bobrovnikova-Marjon E, Grigoriadou C, Pytel D, et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*. 2010. Vol. 29, N 27. P. 3881-95.

226. Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res*. 2004. Vol. 64, N 17. P. 5943-7.

227. Ortiz-Pedraza Y, Muñoz-Bello JO, Olmedo-Nieva L, et al. Non-coding RNAs as key regulators of glutaminolysis in cancer. *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21 , N 8. P. 2872.

228. Soncini D, Caffa I, Zoppoli G, et al. Nicotinamide

phosphoribosyltransferase promotes epithelial-to-mesenchymal transition as a soluble factor independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem.* 2014. Vol. 289, N 49. P. 34189-204.