НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА

На правах рукопису

Даніловський Сергій Вікторович

УДК 577.112:616

РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ TP53 ТА ЗАЛЕЖНИХ ВІД НЬОГО ПРОТЕЇНІВ У КЛІТИНАХ ГЛІОМИ ЛІНІЇ U87

03.00.04. – біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник
Мінченко Олександр Григорович,
доктор біологічних наук, професор

КИЇВ 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……..….5
ВСТУП.....9
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури……..…15
1.1. Гени, що впливають на ріст злоякісних пухлин, їх біологічне значення в нормі та за пухлинного росту…….……15
1.1.1. Онкогени та гени-супресори пухлинного росту, їх біологічне значення……15
1.1.2. Порушення функції генів-супресорів пухлинного росту у злоякісних пухлинах……...17
1.2. *TP53* як один з найважливіших генів-супресорів пухлинного росту...…….20
1.2.1. Структурна організація і механізми регуляції експресії гена *TP53*……...20
1.2.2. Функціональне значення протеїну TP53...……22
1.3. Гени, залучені до регуляції рівня та функціональної активності TP53……..…25
1.4. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у канцерогенезі та репрограмуванні геному..……...……...……27
1.5. Роль гіпоксії в механізмах регуляції експресії генів та в рості злоякісних пухлин……..….33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ…….37
2.1. Матеріали……37
2.2. Умови проведення експериментів……39
2.3. Методи досліджень……...…….40
2.3.1. Робота з культурами евкаріотичних клітин та умови їх культивування……..40
2.3.2. Дослідження інтенсивності проліферації клітин……..41
2.3.3. Виділення РНК……...……..41
2.3.4. Зворотна транскрипція РНК……...……41

2.3.5. Аналіз експресії генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції……...42
2.3.6. Приготування компетентних бактерій та їх трансформація……...46
2.3.7. Виділення плазмід із бактерій……48
2.3.8. Електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелях……...49
2.3.9. Вестерн-блот аналіз протеїнів……...…….50
2.3.10. Аналіз результатів та їх статистична обробка ...……....51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ……54
3.1. Характеристика клітин гліоми з пригніченою активністю сигнального ензиму ERN1……...……54
3.2. Експресія генів *TP53*, *USP7*, *MDM2* та *PERP* у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1……...…57
3.3. Експресія генів *TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2, ZMAT3, POLO1, RBL1, CSNK2* у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1……...…….……...….67
3.4. Експресія генів *TP53*, *USP7*, *MDM2*, *PERP*, *TOPORS*, *NME6*, *TP53BP1*, *TP53BP2*, *ZMAT3*, *POLO1*, *RBL1* та *CSNK2* у клітинах гліоми за умов гіпоксії в залежності від функції ензиму ERN1…….…..68
3.5. Вплив дефіциту глутаміну на експресію *TP53*, *USP7*, *MDM2*, *PERP*, *TOPORS*, *NME6*, *TP53BP1*, *TP53BP2* та *ZMAT3* у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму ERN1…….…….…….....85
3.6. Експресія генів *TP53*, *USP7*, *MDM2*, *PERP*, *TOPORS*, *NME6*, *TP53BP1*, *TP53BP2* та *ZMAT3* у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму ERN1…….……..…….95
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ…….…….….105
4.1. Роль ERN1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії гена *TP53*……...106
4.2. Роль TP53-залежних протеїнів у регуляції експресії та біологічної активності TP53 у клітинах гліоми за умови пригнічення сигнального ензиму ERN1…….…….109

4.3. Гіпоксична регуляція експресії TP53-залежних генів за умови пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1……116
4.4. Роль дефіциту глутаміну та глюкози в регуляції експресії TP53-залежних генів за умови пригнічення функції сигнального ензиму ERN1...……...118
ЗАКЛЮЧЕННЯ…….122
ВИСНОВКИ……124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ…….……....126

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ACTB – (actin beta), β-актин;

AMPK – (AMP-activated protein kinase), протеїнкіназа, яка активується АМФ;

Apaf-1 – (Apoptotic peptidase activating factor 1), фактор 1, який активує апоптотичну пептидазу;

ARNT – (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), арилгідрокарбоновий рецептор, ядерний транслокатор;

ASK1 – (apoptosis signal-regulating kinase 1), кіназа 1, що регулює сигнал апоптозу;

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

Bcl-2 – (B cell lymphoma-2), В клітина лімфома 2;

BiP – (Binding immunoglobulin protein), протеїн, який зв’язується з імуноглобуліном;

BRCA1 – (breast cancer 1), грудна пухлина 1;

CHK2 – (checkpoint kinase 2), кіназа 2 контрольної точки;

CHOP – (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), протеїн, гомологічний протеїну, що звя’зується з CCAAT/енхансером;

c-Myc – (c-myc protein), фактор транскрипції c-myc;

COSMIC – (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), каталог соматичних мутацій пухлин;

CSNK2 – (casein kinase 2), казеїнкіназа 2;

DDIT3 – (DNA-damage-inducible transcript 3), транскрипт 3, який активується пошкодженням ДНК;

DR5 – (death receptor 5), рецептор смерті 5;

eIF2α – (α-subunit of eukaryotic initiation factor), α-2 субодиниця еукаріотичного фактору ініціації 2;

ERN1 – (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1), сигналювання від ендоплазматичного ретикулуму до ядра-1;

FAS (CD95) – Fas cell surface death receptor (cluster of differentiation 95) поверхневий рецептор смерті Fas (кластер диференціювання 95);

FH – (fumarate hydratase), фумаратгідратаза;

GADD153 – (growth arrest and DNA damage-inducible protein153), протеїн153, який активується пошкодженням ДНК і зупиняє ріст;

GADD45 – (Growth Arrest and DNA Damage inducible 45), протеїн 45, який активується пошкодженням ДНК і зупиняє ріст;

GRP170 – (glucose-regulated proteins 170), залежний від глюкози протеїн 170;

GRP78 – (glucose-regulated proteins 78), залежний від глюкози протеїн 78;

GRP94 – (glucose-regulated proteins 94), залежний від глюкози протеїн 94;

HIF-1α – (hypoxia inducible factor 1 α), фактор 1α, що індукується за гіпоксії;

HIF-1β– (hypoxia-inducible factor 1 β), фактор 1β, що індукується за гіпоксії;

HSPA5 – (heat shock 70 kDa protein 5), протеїн теплового шоку 5, 70 kDa;

IRE-1α – (inositol-requiring protein 1α), інозитол-залежний протеїн 1α;

JNK – (c-Jun NH2-terminal kinase), c-Jun-NH2-термінальна протеїнкіназа;

LMO3 – LIM domain only 3 (rhombotin-like 2), транскрипційний кофактор LIM тільки 3 домени (ромботин подібний 2);

MAP3K5 – (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5), протеїнкіназа 5 кінази кінази, яка активується мітогеном;

MDM2 – (E3 ubiquitin protein ligase homolog), гомолог Е3 убіквітин протеїн лігази;

mTOR – (mammalian target of rapamycin), мішень рапаміцину ссавців;

NME6 – (nucleoside diphosphate kinase 6), нуклеозид дифосфаткіназа 6;

p21/Waf1 – (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), інгібітор 1А циклін залежних кіназ;

PDK1 – (pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1), кіназа 1 піруватдегідрогенази;

PERK – (double stranded RNA activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), кіназа ендоплазматичного ретикулума подібна до PKR (протеїн кіназа, що активується дволанцюговою РНК);

PERP – (TP53 apoptosis effector), апоптотичний ефектор TP53;

PI3K – (Phosphoinositide 3-kinase), фосфоінозитид-3-кіназний сигнальний шлях;

POLO1 – (POLO-like kinase 1), подібна до POLO кіназа 1;

PTEN – (Phosphatase and tensin homolog) гомолог фосфатази та тензину;

PUMA – (TP53 upregulated modulator of apoptosis), модулятор апоптоза, який позитивно регулюється TP53;

RB1 – (retinoblastoma 1), ретинобластома 1;

RBL1 – (retinoblastoma-like 1), подібний до ретинобластоми 1;

SDH – (Succinate dehydrogenase), сукцинатдегідрогеназа;

SV40 – (T-antigen), Т-антиген;

TOPORS – (Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase), збагачена аргінін/серином Е3 убіквітин протеїн лігаза, що зв'язується з топоізомеразою 1;

TP53 – (tumor protein 53), пухлинний протеїн 53;

TP53AIP1 – (TP53-regulated apoptosis-inducing protein 1), протеїн 1, що регулюється TP53 та індукує апоптоз;

TP53BP1 – (Tumor protein 53 binding protein 1), протеїн 1, який зв'язує пухлинний протеїн TP53;

TP53BP2 – (Tumor protein 53 binding protein 2), протеїн 2, який зв'язує пухлинний протеїн TP53;

TSC2 – (Tuberous Sclerosis Complex 2), комплекс 2 туберозного склерозу;

UPR – (Unfolded protein response), відповідь на незгорнуті протеїни;

USP7 – (ubiquitin specific peptidase 7), убіквітин специфічна пептидаза 7;

VEGF-A – (Vascular endothelial growth factor A), ендотеліальний фактор росту судин А;

VHL – (tumor suppressor von Hippel-Lindau, E3 ubiquitin protein ligase), пухлинний супресор Гіппеля-Ліндау, Е3 убіквітин протеїнлігаза;

WT1 – (Wilm's tumor suppressor gene 1), ген 1 супресор пухлини Вільмса;

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

XBP1s – (X-box binding protein 1, splice variant), сплайс-варіант протеїну 1, що зв’язується з Х-боксом;

ZMAT3 – (zinc finger Matrin-type 3), цинковий палець 3 типу Матрин;

ЕР – ендоплазматичний ретикулум;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція.

ВСТУП

Актуальність теми. Гліоми – це пухлини головного мозку, які виникають в результаті злоякісного переродження астроцитів і характеризуються дуже високою агресивністю. За рахунок швидкої проліферації клітин у цих пухлинах створюються умови гіпоксії і дефіциту поживних речовин, що призводить до змін і в мікрооточенні пухлини, а тому у пухлинних клітинах для їх виживання та подальшого росту ініціюються специфічні зміни метаболізму. На сьогоднішній день ще не з'ясовані до кінця ті молекулярні механізми, що лежать в основі такої агресивної поведінки клітин гліоми і на даний момент ще немає ефективних протоколів боротьби з цим захворюванням.

Відомо, що злоякісні пухлини використовують стрес ендоплазматичного ретикулума та ішемію для свого виживання та активації процесів проліферації, оскільки вони направляють метаболізм клітин на активацію ростових процесів, активують ангіогенез, а також сприяють толерантності до гіпоксії [1-4]. За фізіологічних умов стрес ендоплазматичного ретикулума також є невід'ємною частиною нормального функціонування клітин, так як всі секреторні клітини постійно знаходяться в цьому стані, тому що стрес репрограмує геном на створення нових протеїнів для нормального фізіологічного функціонування організму.

Клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума відома як відповідь на незгорнуті протеїни (unfolded protein response; UPR). Ця відповідь спрямована на відновлення нормального функціонування ендоплазматичного ретикулума. Таким чином, клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного поділу, а тому вплив на сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума може бути використаний в якості нової стратегії для розробки ефективних протипухлинних ліків.

Існує три основні шляхи відповіді на не згорнуті чи не правильно згорнуті протеїни, кожен з яких включає трансмембранну молекулу, локалізовану в ендоплазматичному ретикулумі: PERK, ERN1 та ATF6 [5], серед яких ERN1 є найважливішим. Шлях PERK відповідає за блокування основної трансляції під час стресу ендоплазматичного ретикулума, і цей процес блокування вже давно змодельований і широко використовується в біотехнології. Раніше було показано, що сигнальний шлях ERN1 пов'язаний з розвитком ішемії та гіпоксії, а також з процесами проліферації клітин та ростом злоякісних пухлин [6-10], причому повне блокування ERN1 призводить до різкого пригнічення росту пухлин, процесів ангіогенезу та проліферації [11-14].

В останні роки детально вивчаються молекулярні основи вищих рівнів регуляції найважливіших процесів у клітинах різних організмів, головним чином тих, що визначають активацію контрольних точок протікання клітинного циклу, виявлення і виправлення пошкоджень в ДНК, убіквітинування і деградацію протеїнів, передачу мітогенного сигналу, індукцію апоптозу, диференціацію та специфікацію клітин, їх міграцію, пухлинний ангіогенез та ін. [15]. Одним з найголовніших регуляторів даних процесів є пухлинний супресор TP53. Він відіграє важливу роль у забезпечені генетичного гомеостазу багатоклітинного організму, завдяки цьому його ще називають «стражем геному» [16]. TP53 є фактором транскрипції і активує або пригнічує транскрипцію більше сотні генів, а також взаємодіє з великою кількістю інших протеїнів [17]. Для виконання таких різнобічних функцій TP53 є велика кількість регуляторів.

Так, було встановлено, що впродовж клітинного циклу рівень та функціональна активність TP53 контролюється різноманітними факторами, зокрема такими як MDM2, USP7, POLO1, RBL1, CSNK2, NME6, TOPORS, ZMAT3, TP53BP1 та TP53BP2, які приймають участь у регуляції активності та стабільності цього пухлинного супресора. Відомо, що інактивація TP53 призводить до неопластичної трансформації та канцерогенезу [18].

Таким чином, вивчення експресії гена *TP53* та пов’язаних з ним протеїнів за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну у клітинах гліоми з пригніченою ERN1-опосередкованою сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулума для вияснення їх ролі у регуляції проліферації клітин є актуальним напрямком біохімічних досліджень і може сприяти виявленню перспективних генів-мішеней для розробки нових способів створення анти-пухлинних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної біології Інституту біохімії імені О.В. Палладіна Національної академії наук України протягом 2011-2015 років у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: «Молекулярні основи взаємодії генів в механізмах регуляції їх експресії», № ДР 0111U002234 (2011-2015 р.р.) та «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», № ДР 0112U002624 (2012-2016 р.р.).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – вивчення залежності експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* від функціональної активності сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози у клітинах гліоми лінії U87.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Вивчити рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою активністю ензиму ERN1.

2. Дослідити вплив пригнічення ендорибонуклиазної активності ERN1 на експресію *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87.

3. Вивчити вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у

клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії в залежності від активності сигнального ензиму ERN1.

4. Дослідити ефект дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригніченя функції ензиму ERN1.

5. Вивчити вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього протеїнів у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ензиму ERN1.

Об'єкт дослідження: функція генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2*.

Предмет дослідження: зміни рівнів експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою функціональною активністю сигнального ензиму ERN1 за умов гіпоксії, дефіциту глюкози або глутаміну.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети були використані методи біохімії та молекулярної біології: виділення РНК із клітин гліоми, спектрофотометричні методи визначення концентрації РНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, синтез комплементарних ДНК, вестерн-блот аналіз, методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, клонування продуктів ампліфікації та комп'ютерний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було показано, що експресія генів *TP53*, *MDM2*, *PERP*, *USP7*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *NME6*, *TOPORS*, *ZMAT3*, *TP53BP1* та *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87 залежить від функціональної активності ERN1, сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, причому виявлені зміни в експресії досліджених генів корелюють зі зменшенням інтенсивності проліферації клітин з пригніченою активністю ERN1. Встановлено, що зміни в експресії генів *TP53*, *MDM2* та *USP7* у клітинах гліоми за умов пригнічення ERN1 обумовлені виключенням саме кіназної, а не ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1,

а гена *PERP* – обома активностями, оскільки за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму спостерігається різке підвищення експресії гена *PERP*, причому у напрямку нормалізації (до рівня експресії цього гена у нормальних астроцитах). Показано також, що гіпоксія знижує рівень експресії генів *TP53*, *USP7*, *TOPORS*, *NME6*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2B* та *ZMAT3* і збільшує рівень *MDM2*, *TP53BP2*, *CSNK2A2* та *PERP* у клітинах гліоми. Виявлений ефект гіпоксії на експресію генів *TP53*, *USP7*, *CSNK2A2*, *POLO1* та *ZMAT3* знімається пригніченням функції сигнального ензиму ERN1. Пригнічення функції ERN1 також робить чутливими до гіпоксії ген *TP53BP1*. Крім того, встановлено, що рівень експресії мРНК *TP53* і більшості залежних від нього протеїнів збільшується за умов дефіциту глутаміну і що цей ефект залежить від функціональної активності ERN1. За умов дефіциту глюкози експресія генів *TP53*, *MDM2*, *USP7* та *PERP* не змінюється у контрольних клітинах гліоми, але пригнічення ERN1 робить чутливими до дефіциту глюкози експресію генів *TP53*, *MDM2* та *PERP* і посилює вплив дефіциту глюкози на експресію гена *TOPORS*, а також знімає вплив дефіциту глюкози на ген *ZMAT3*. Одержані результати розкривають молекулярні механізми участі TP53 та асоційованих з ним протеїнів в процесах проліферації клітин, а також механізми взаємодії гіпоксії та ішемічних чинників із ERN1, основним сенсорно-сигнальним ензимом стресу ендоплазматичного ретикулума.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що вони розкривають деякі сторони молекулярних механізмів пригнічення проліферації клітин гліоми за умов виключення ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, через зміни в експресії генів пухлинного супресора TP53 і залежних від нього протеїнів як за нормальних умов, так і за гіпоксії, що буде сприяти виявленню нових перспективних мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин. Результати досліджень включені до програм спецкурсів „Сучасні біотехнології” та „Конструювання генів” ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом було самостійно виконано аналіз даних літератури по темі роботи, проведено експериментальні дослідження по вивченню експресії генів *TP53*, *MDM2*, *PERP* та *TP53BP2*, а також обробку отриманих результатів. Дослідження експресії генів *USP7*, *RBL1*, *POLO1*, *CSNK2*, *TP53BP1*, *NME6*, *TOPORS* та *ZMAT3* проводились за участі к.мед.н. Д. О. Мінченка, к.б.н. Карбовського Л. Л. та провідних інженерів Харькової А. П. і Кривдюк І.В., розробка методології, аналіз та обговорення результатів здійснювались за участі наукового керівника, д.б.н., проф. Мінченка О. Г.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертації були представлені на вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях: Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference Science and Art for the Advancement in Medicine, Budapest, 2012; X та XII Міжнародних міждисциплінарних науково-практичних конференціях студентів, аспірантів та молодих вчених "Шевченківська весна" 2012 та 2014. Київ; 7th Lviv-Lublin Conference of Experimental and Clinical Biochemistry, Lviv, 2013; конференціях молодих учених Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України „Актуальні проблеми біохімії та біотехнології", Київ, 2013, 2014; XI Українському біохімічному конгресі, Київ, 2014.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 робіт, з них 6 статей, опублікованих у фахових іноземних журналах і наукових виданнях, що входять до переліку, затвердженого ДАК України, та 6 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних з'їздів і конференцій.

РОЗДІЛ І.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Гени, що впливають на ріст злоякісних пухлин, їх біологічне значення в нормі та за пухлинного росту

1.1.1. Онкогени та гени-супресори пухлинного росту, їх біологічне значення

Початок розуміння онкогенетики пов'язаний з німецьким біологом Теодором Бовері, який у 1914 р. висунув гіпотезу, що деякі хромосоми можуть стимулювати клітинний поділ, а інші можуть пригнічувати його [19]. Ідея Бовері довго ігнорувалась, проте зараз відомо, що існують гени обох типів: гени, що стимулюють проліферацію (протоонкогени), та гени, що здійснюють негативний контроль клітинної проліферації, тобто перешкоджають вступу клітин у поділ та вихід з диференційованого стану (антионкогени або гени-супресори пухлинного росту) [20].

Протоонкогени і гени-супресори створюють складну систему позитивно-негативного контролю проліферації та диференціювання клітин, а злоякісна трансформація реалізується через порушення цього балансу та призводить до виникнення злоякісного росту. Таким чином, більшість генетичних змін, що асоційовані з онкологічними захворюваннями людини, можна розділити на дві категорії: мутації, які посилюють функції протоонкогенів і стимулюють ріст, поділ та виживання клітин, перетворюючи їх в онкогени, а також мутації що призводять до втрати функцій генів-супресорів пухлин і активації клітинного циклу.

Для збереження і накопичення інформації про соматичні мутації у людських пухлинах було створено базу даних, де записані докладні анотації для кожного знайденого гена, пов'язаного з пухлинами. Ця база отримала назву COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) [21-26]. На даний час відомо

біля семи десятків генів, залучених до канцерогенезу і асоційованих зі спадковими мутаціями, та 342 гени, що асоційовані із соматичними мутаціями.

Гени-супресори пухлин, за нормальних умов, виступають як «стражі клітини», відіграючи важливу роль у регуляції численних клітинних функцій, включаючи:

- активацію контрольних точок клітинного циклу;
- виявлення і виправлення пошкоджень в ДНК;
- убіквітинування і деградацію протеїнів;
- передачу мітогенного сигналу;
- індукцію апоптозу;
- диференціацію та специфікацію клітин;
- міграцію клітин;
- ангіогенез та ін. [27].

У рамках запропонованої Кінзлером і Фогельштайном концепції, гени-супресори пухлинного росту можна поділити на дві великі групи: гени першої групи отримали назву "хранителів клітинного циклу" (gatekeepers), а гени другої - "загального контролю" (caretakers) [28].

Гени-"хранителі клітинного циклу" напряму залучені до його регуляції, оскільки протеїнові продукти цих генів здатні стримувати ріст пухлин, інгібуючи процеси, пов’язані з поділом клітин. Дефекти "генів загального контролю" призводять до підвищення нестабільності геному, збільшення частоти виникнення мутацій, і, в результаті цього, до підвищення вірогідності пошкодження генів, у тому числі і "хранителів клітинного циклу". До групи "хранителів клітинного циклу" відносять такі гени, як *RB1* (ретинобластома 1), *WT1* (ген 1 супресор пухлини Вільмса), *NF1* (нейрофібромін 1), а також гени, що сприяють утворенню клітинних контактів та інші [28].

1.1.2. Порушення функції генів-супресорів пухлинного росту у злоякісних пухлинах

Як і всі гени, гени-супресори пухлин можуть зазнавати різноманітних мутацій, проте більшість мутацій, які призводять до втрати функції цих генів, є рецесивними. Таким чином, щоб клітина трансформувалася в пухлинну, обидва алелі її гена-супресора повинні зазнати мутації. Це твердження відоме як гіпотеза "двох ударів". Вперше вона була запропонована генетиком Альфредом Кнудсоном у 1971 р. [29]. Сьогодні ця гіпотеза є основою для розуміння того, як мутації в генах-супресорах призводять до онкологічних захворювань.

Процес, який веде до інактивації другого алеля гена-супресора, часто називають "втратою гетерозиготності". Під час цього процесу в гетерозиготній за мутацією клітині мутує функціональний алель гена-супресора і таким чином ця клітина стає гомозиготною за мутантним геном.

Мутації, які інактивують ген-супресор пухлин, називаються мутаціями з втратою функції. До них належать:

- точкові мутації або невеликі делеції, що призводять до порушення функції протеїну, який кодується цим геном;

- хромосомні делеції або розриви, які видаляють ген-супресор пухлини;

- випадки соматичної рекомбінації, протягом якої нормальний ген замінюється його мутантною копією [30].

Сучасні дослідження показали, що ключова роль генів-супресорів пухлин у розвитку онкологічних захворювань однакова на генетичному та епігенетичному рівнях. Генетична інактивація або зниження функції генів-супресорів пухлин часто розглядаються як ключові моменти, які надають перевагу пухлинному росту клітин [27]. Крім того, часто спостерігається видалення генів-супресорів пухлин у геномі [31].

На епігенетичному рівні багато класичних генів-супресорів пухлин транскрипційно пригнічені шляхом гіперметилювання, що сприяє аномальному росту клітин у пухлині [32]. Також були отримані дані, які вказують на те, що

некодуючі РНК, такі як мікроРНК та довгі некодуючі РНК, можуть діяти як гени-супресори, так і як онкогени, регулюючи апоптоз, проліферацію і метастазування клітин на посттранскрипційному рівні [33-38]. Крім того, шляхом епігенетичної регуляції змінюється експресія генів-супресорів, які кодують ензими модифікації гістонів [39, 40].

Гіпотеза Кнудсона довгий час була дуже популярною, однак зараз вона потребує перегляду у зв'язку з відкриттям нових фактів про гени-супресори пухлин [19, 41]. Відома також безперервна модель пригнічення росту пухлин, що враховує вплив гена-супресора на схильність до утворення пухлин та/або їх прогресію і має важливі наслідки для діагностики онкологічних захворювань, а також їх терапії, зокрема це стосується функцій гена *PTEN* [42].

Для інших генів-супресорів пухлин може бути критичною не стільки рівень їх експресії, скільки активність, і це спостерігається у пухлинах з мутантним *TP53*, де мутантний алель підвищено експресується, але він діє як домінант-негативний, бо кодує функціонально неактивний TP53 [43, 44].

Відомо, що надмірна експресія мутантних онкогенів *RAS* призводить до клітинного старіння, а гена *MYC* – до апоптозу, а не до проліферації [45, 46].

Найбільш досліджені гени-супресори пухлинного росту приведені у таблиці 1.1.2.1, де вказані як функції цих генів, так і захворювання, що виникають при порушенні їх експресії або у результаті мутацій.

Таблиця 1.1.2.1

Функції деяких генів-супресорів та наслідки їх мутацій

Ген-супресор пухлин	Функції	Пухлини
TP53	Фактор транскрипції, регуляція клітинного циклу, апоптозу, репарації ДНК.	Саркома, пухлина молочної залози
RB1	Транскрипційний корепресор, контролює вхід у S-фазу і диференціювання клітин	Остеогенна саркома
PTEN	Стимулює апоптоз, інгібує вхід у S-фазу клітинного циклу	-
TSC2	Протеїновий комплекс, що активує GTP-азу (інгібування mTOR)	Ангіофіброма, ангіоміоліпома нирки
NF1	Переводить гени RAS з активної форми в неактивну	Нейрофіброми, нейрофібросаркоми, пухлини головного мозку
WT1	Регуляція урогенітального диференціювання	Нефробластома
NBS1	При пошкодженнях ДНК активує CHK2, BRCA1, контрольна точка в S-фазі	Лімфоретікулярні злоякісні новоутворення
CHK2	Протеїнкіназа (G1 контрольна точка), при пошкодженнях ДНК активує p53 і BRCA1	-
BRCA1	Модулює активність багатьох факторів транскрипції, приймає участь в репарації ДНК	Рак молочної залози, яєчників, товстої кишки, передміхурової залози
VHL	Фактор, що розпізнає Е3 лігазу для HIFα, поділ клітин, їх загибель, диференціація та відповідь на стрес	феохромоцитома, ангіома сітківки, гемангіобластома

1.2. TP53 як один з найважливіших генів-супресорів пухлинного росту

1.2.1. Структурна організація і механізми регуляції експресії гена TP53

У 1979 році шість різних груп дослідників заявили про відкриття протеїну масою 53 кДа, який був присутній у клітинах людини та миші [47-51]. У п'яти з цих досліджень протеїн був виявлений за рахунок того, що він зв'язувався з великим Т-антигеном в SV40 інфікованих клітинах і був ко-імунопреципітований з антитілами, створеними проти вірусного протеїну. Протеїн з масою 53 кДа був також ідентифікований іншими дослідниками [52], які виявили його у комплексі з антисироваткою проти хімічно-індукованої мишачої саркоми, причому цей протеїн був присутнім лише у трансформованих, але не в нормальних клітинах миші.

Різноманітність досліджень, проведених з протеїном TP53, а потім з геном, що його кодує, вказувала на те, що це онкоген, оскільки він був пов'язаний з основним онкогенним протеїном SV40 і його рівень був підвищеним у багатьох видах злоякісних пухлин. [53-56].

Ключовий момент у дослідженні гена *TP53* відбувся у 1989 році [57]. В пошуках передбачуваного гена-супресора пухлин на хромосомі 17p була досліджена ділянка, що містила *TP53* і який виявився геном-супресором, а це вивело *TP53* в центр уваги дослідження пухлин людини. Пацієнти з успадкованими мутаціями у гені *TP53* були схильні до різних типів пухлин [58, 59], а миші нокаутні по цьому гену також були схильні до утворення пухлин [60, 61]. Наступні дослідження показали, що у пухлинах людини мутації у гені *TP53* зустрічаються частіше, ніж будь-якого іншого гена у геномі [62].

В організмі людини ген *TP53* знаходиться на короткому плечі хромосоми 17 (17p13.1) [63, 64]. Він має довжину 20 Kb та містить 11 екзонів і 10 інтронів [64]. Перший екзон є некодуючим, за ним розташований дуже довгий перший інтрон довжиною 10 Kb. Кодуюча послідовність містить п’ять регіонів, що

показують високий ступінь консервативності у хребетних, особливо в екзонах 2, 5, 6, 7 і 8, але послідовності, знайдені у безхребетних, показують віддалену схожість з TP53 ссавців [65].

Родина *TP53* включає в себе три гени: *TP53*, *TP63* та *TP73* (рис. 1.2.1.1.).

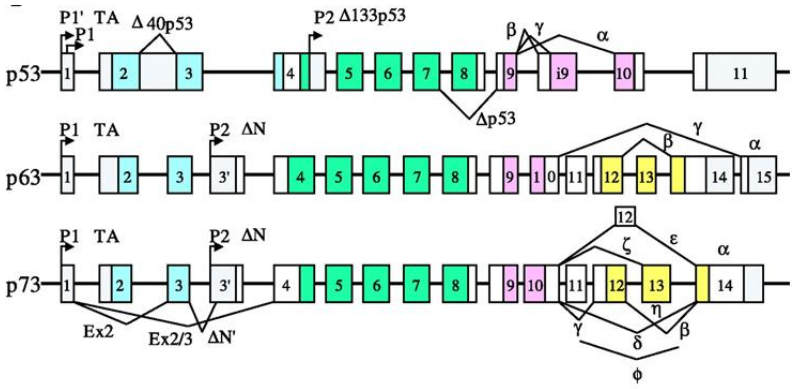


Рис. 1.2.1.1. Гени родини TP53 та їх ізоформи. Інтрони забарвлені сірим кольором, екзони – відповідно до кодуючих доменів (трансактиваційний домен – блакитного кольору, ДНК-зв'язуючий – зеленого, регуляторний – рожевого, стерильний α мотив – жовтого) [72].

Усі ці гени експресують множинні сплайс варіанти і містять різні внутрішні промотори. Ізоформи TP53 включають: TAp53, Δ40p53 (утворюються альтернативним сплайсингом з інтрона 2 або альтернативним сайтом ініціації трансляції в екзоні 4 з кодона 40), Δp53 (утворюється шляхом альтернативного сплайсингу екзона 7/9 з видаленням 66 амінокислот всередині ДНК-зв'язуючого домену) і Δ133p53 (утворюється з використанням внутрішнього промотора в інтроні 4). Альтернативний сплайсинг інтрону 9 дає α, β та γ ізоформи. Загалом, з гена *TP53* може утворюватися десять різних варіантів p53: TP53 (α, β, γ), Δ40p53 (α, β, γ), Δ133p53 (α, β, γ) і Δp53 [66-70]. У випадку TP63 та TP73 проксимальний промотор P1 дає TA ізоформи, в той час як дистальний промотор P2 в інтроні 3 дає початок вкороченим варіантам ΔNp63/p73. Крім того, сплайсинг С-кінця веде до утворення p73 α, β, γ, δ, ε, ζ, η, ϕ і p63 α, β, γ для обох TA та ΔN форм. Також TP73 може використовувати додатковий N-кінцевий сайт сплайсингу всередині екзону 2, який продукує ΔN-подібні протеїни Ex2p73, Ex2/3p73 та ΔN′p73 [71].

У відповідь на стрес змінюється як транскрипція гена *TP53*, так і рівень та активність протеїну TP53. Так, було встановлено, що рівень мРНК *TP53* істотно зростає за умов стимуляції сіркою і це може бути обумовлено наявністю у промоторі сайтів зв'язування для факторів, які індукуються сіркою [73, 74]. Індукція експресії гена *TP53* фактором росту c-Myc опосередковується зв'язуванням цього фактора росту з промотором гена *TP53* [75].

Промотор гена *TP53* містить TATA-бокс та сайт з яким зв'язується протеїн TP53 і регулює транскрипцію власного гена [76, 77]. Транскрипційна активність промотора TP53 посилюється також фактором USF, який зв'язується з мотивом спіраль-петля-спіраль (b-HLH, від англ. basic-Helix-Loop-Helix; CACGTG) і знаходиться близько старту ініціації транскрипції [78]. Більш того, з цим же мотивом у промоторі TP53 може зв'язуватися та активувати транскрипцію і фактор росту c-Myc, що було показано для деяких ліній B-лімфоїдних клітин [79]. У промоторній ділянці гена *TP53* виявлена також послідовність для зв'язування протеїну *pax*, яка відповідальна за пригнічення експресії цього гена у первинних дифузних астроцитомах людини [80]. Показано також, що транскрипційні фактори NF1 та YY1 активують промотор гена *TP53*, причому тканино-специфічно [81, 82].

1.2.2. Функціональне значення протеїну TP53

Протеїн TP53 складається з 393 амінокислот. Він отримав свою назву за масою, визначеною під час його переміщення при гель-електрофорезі, яка складала 53 кДа [83, 84]. Протеїн TP53 людини має 5 функціональних доменів:

1) трансактиваційний домен, що складається з двох комплементарних частин: основної (активаційна ділянка 1), яка знаходиться на N-кінці і відповідає за активацію транскрипційних факторів, та додаткової (активаційна ділянка 2), яка приймає участь у регуляції кількох про-апоптичних генів, причому багато амінокислотних залишків цього домену служать мішенями для посттрансляційних модифікацій TP53 [85];

2) пролін-багатий домен, який є важливим для апоптотичної активності TP53;

3) центральний ДНК-зв’язуючий домен, що містить декілька залишків аргініну і забезпечує безпосередній контакт з ДНК, а також зв’язує один атом цинку та відповідає за взаємодію TP53 із ко-репресором LMO3 [86-88];

4) тетрамеризаційний домен, який відповідає за утворення тетраметрів, що є дуже важливим для активності TP53 *in vivo*;

5) С-кінцевий регуляторний домен, що задіяний у від’єднанні центрального, ДНК-зв’язуючого домену від ДНК [89].

Схематичне зображення протеїну TP53 приведено на рис. 1.2.2.1.

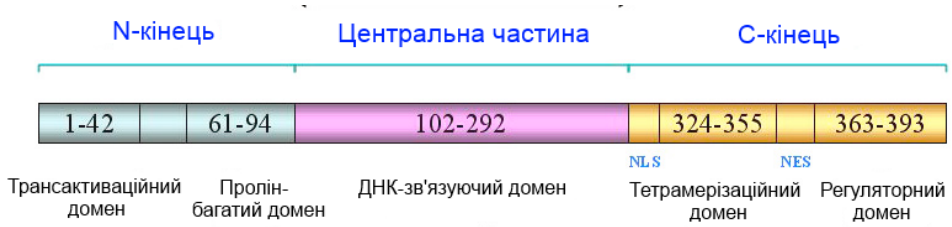


Рис. 1.2.2.1. Структура протеїну TP53. Цифрами вказані амінокислотні залишки. NLS – сигнальна послідовність, що обумовлює ядерну локалізацію TP53, а NES – сигнальна послідовність для експорту цього протеїну із ядра.

TP53 відіграє важливу роль у забезпечені генетичного гомеостазу багатоклітинного організму, завдяки цьому його ще називають «стражем геному» [16]. TP53 є фактором транскрипції та активує або пригнічує транскрипцію близько 129 генів-мішеней [17]. Продукти цих генів регулюють різноманітні внутрішньоклітинні процеси, що включають поділ клітин, запрограмовану клітинну смерть, репарацію генома, диференціювання, метаболізм та міжклітинні взаємодії [15]. Для контролю таких різнобічних властивостей TP53 має велику кількість регуляторів. TP53 взаємодіє із більш ніж 350 протеїнами.

До родини TP53 входять ще протеїни TP63 та TP73, яких об’єднує наявність трьох основних еволюційно консервативних доменів: трансактиваційного, ДНК-зв’язуючого та тетрамеризаційного, що необхідні для

функціонування цих протеїнів в якості факторів транскрипції, причому ДНК-зв'язуючі домени TP63 та TP73 здатні розпізнавати і зв'язувати ті ж самі специфічні ділянки ДНК, що і TP53 [90]. Більше того, протеїни TP63 та TP73 здатні утворювати гетеротетрамери між собою, але не з TP53 [91].

На С-кінці протеїнів TP63 та TP73 знаходиться додаткова ділянка, що включає стерильний α-мотив та домен, який інгібує транскрипцію, але протеїни родини TP53 не завжди мають ці послідовності [92, 93]. Пояснюється це тим, що гени цих протеїнів дають початок багатьом ізоформам, які відрізняються будовою С-кінцевих (p53α, або класичний TP53, TP53β та TP53γ) та N-кінцевих ділянок (TP53, Δ40p53 та Δ133p53) [94]. Було також показано, що транскрипційно-активні ізоформи TP73 посилюють транскрипцію таких TP53-залежних генів, як *p21/WAF1*, *GADD45*, *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *CD95*/*FAS*, *PIG3*, *TP53AIP1* [95].

У відповідь на стрес активність і стабільність TP53 регулюються через складну сітку посттрансляційних модифікацій [96], включаючи фосфорилювання, ацетилювання, АДФ-рибозилювання, убіквітинування, сумоїлування, неддилювання та цитоплазматичне зв'язування [97-99]. Більшість цих модифікацій відбувається на N- та С-кінцевих ділянках TP53. Посттрансляційне фосфорилювання та ацетилювання є основними модифікаціями, що підвищують транскрипційну активність TP53. Ці зміни призводять до стабілізації та накопиченя TP53 у ядрі, де він взаємодіє з генами-мішенями [100, 101]. Посттрансляційна модифікація може запобігати деградації TP53 за рахунок модифікації тих ділянок, які відповідають за його взаємодію з MDM2 [102]. Дослідження, проведені в лабораторії Gu [103] показали, що ацетилювання є абсолютно необхідним для активації TP53, але тільки за присутності MDM2.

Таким чином, посттрансляційні модифікації TP53 є важливими, перш за все, щоб протидіяти убіквітинлігазі MDM2 пригнічувати функціональну активність TP53 та його деградацію.

1.3. Гени, залучені до регуляції рівня та активності TP53

Відомо, що підвищений рівень протеїну TP53 регулюються переважно через подовження періоду його життя, за рахунок його стабілізації. За нормальних умов рівень протеїну TP53 в клітині підтримується на дуже низькому рівні, причому переважно у неактивній формі [104]. У не трансформованих клітинах період напівжиття TP53 обмежений хвилинами, у той час, як стрес клітини або ДНК-пошкоджуючі агенти продовжують його до годин [105].

Регуляція рівня протеїну TP53 представляє собою складну мережу, до якої належать WT1 [106], MDM2 [107, 108], JNK [109]. Крім того, TP53 може переходити із неактивної у активну форму, в якій він функціонує як транскрипційний фактор. Зв’язування WT1 або з TP53 підвищує його стабільність, в той час як асоціація з MDM2 прискорює його деградацію.

Надзвичайно важливим в регуляції TP53 є протеїн MDM2 (murine double minute 2) [110]. Це убіквітинлігаза Е3, яка блокує транскрипційну активність TP53, сприяє його експорту із ядра та стимулює деградацію цього протеїну [107, 108, 111]. Ген MDM2 згодом був клонований і встановлено його локалізацію на хромосомі 12q13-14. Також було встановлено наявність двох транскрипційних промоторних елементів, що були названі P1 і P2, причому останній виявився p53-залежним. Ген MDM2 експресується у вигляді різних ізоформ. Повнорозмірний транскрипт цього гена кодує протеїн розміром в 491 амінокислоту. За нормальних умов MDM2 експресується в ядрі, але він транслокується до цитоплазми, де опосередковує деградацію деяких протеїнів, перетворюючи їх на мішені для протеасоми. Сам MDM2 також є транскрипційною мішенню TP53, таким чином утворюючи негативний зворотній зв'язок [112-114]. Пізніші дослідження показали таку ж важливу роль і для MDMX (MDM4), гомолога MDM2 [115]. Вважається, що роль обох протеїнів у підтримці низького рівня TP53 у нормальній клітині не пересікається [116-120]. MDMX безпосередньо зв'язується з трансактиваційним

доменом TP53 та інгібує його активність, але не викликає деградацію TP53. На даний час визнано, що убіквітинази під час процесу деубіквітинації визначають активність мережі TP53.

Різні стресові сигнали призводять до порушення взаємодії MDM2 - TP53, що веде до активації TP53-залежних клітинних відповідей. Найбільш характерним з них є ефект пошкодження клітинної ДНК [121-123].

MDM2 впливає на трансляцію TP53 двома шляхами. По-перше, через безпосередню взаємодію з мРНК, що кодує TP53 та пригнічує його трансляцію [124]. По-друге, через рибосомний протеїн RPL26, який є необхідним для трансляції TP53 у відповідь на генотоксичний стрес [125]. MDM2 здатний мітити RPL26 для убіквітин-залежної деградації і при пошкоджені ДНК цей ефект MDM2 на RPL26 пригнічується, що призводить до підвищення асоціації RPL26 з мРНК TP53 та підвищення рівня протеїну TP53.

Також були виявлені й інші регулятори TP53, зокрема TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2, POLO1, RBL1, CSNK2 та ZMAT3, контролюючи стабільність та транскрипційну активність TP53 [125-130]. TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase) функціонує як E3 убіквітин-протеїн лігаза і відома також як TP53BP3 (tumor protein 53 binding protein 3). Він регулює стабільність TP53 через убіквітин-залежну деградацію і приймає участь в клітинній проліферації та апоптозі, причому його активність контролюється POLO1 (POLO-like kinase 1). Неправильна експресія PLK-1 викликає аномалії, в тому числі, анеуплоїдію та мітотичні дефекти, що призводить до канцерогенезу в результаті інгібування генів p53 і pRB. Надлишкова експресія PLK-1 корелює з широким спектром злоякісних пухлин людини і поганим прогнозом лікування злоякісних захворювнь [129], а NME6 (NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6) пригнічує TP53-індукований апоптоз, а також приймає участь в онтогенезі [131, 132].

TP53BP1 (tumor protein 53 binding protein 1) відіграє важливу роль в регуляції контрольних точок мітозу, підвищує TP53-опосередковану активацію

транскрипції і приймає участь у відповіді на пошкодження ДНК [133], а TP53BP2 (tumor protein 53 binding protein 2) є членом родини протеїнів ASPP (apoptosis-stimulating protein of p53), які необхідні для індукції TP53-опосередкованого апоптозу і підвищує здатність TP53 зв'язуватись з ДНК на промоторах проапоптотичних генів [134].

Ген *ZMAT3* (zinc finger, Matrin-type 3) є геном, що контролюється TP53. Відомо, що ріст клітин позитивно регулюється mTOR (mammalian target of rapamycin), чия активність інгібується SESN1 (sestrin 1) і SESN2 [135]. Протеїн ZMAT3 сприяє TP53-опосередкованому апоптозу шляхом регуляції експресії TP53 і його транслокації до ядра і ядерця. У той же час, пригнічення ZMAT3 викликає різке інгібування експресії N-MYC і диференціацію клітин нейробластоми.

RBL1 (retinoblastoma like-1, p107 – також відомого як Rb-like protein 1 (pRb1) (RBL1/p107)) – це протеїн, який є подібним за своєю послідовністю та функціями до продукта гена RB1. Обидва протеїни: RB1 та RBL1 можуть інгібувати транскрипцію генів, які контролюють клітинний цикл та містять на своїх промоторах сайт зв'язування для E2F. Протеїни ретинобластоми і родина асоційованих з ними протеїнів беруть участь в контролі клітинного циклу, проліферації, апоптозі та диференціації [136].

CSNK2 (casein kinase 2) – це серин/треонінова протеїнкіназа, яка складається з двох каталітичних α/α' і двох регуляторних β субодиниць, та відіграє регуляторну роль в клітинній проліферації, диференціації та апоптозі. CSNK2 регулює метаболічні шляхи, сигнальну трансдукцію, транскрипцію, трансляцію та реплікацію шляхом фосфорилювання низки ключових внутрішньоклітинних сигнальних протеїнів, залучених до прогніченння росту пухлин (TP53 і PTEN) та канцерогенезу (myc, jun, NF-kB) [137, 138].

1.4. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума у канцерогенезі та репрограмуванні геному

Стрес ендоплазматичного ретикулума забезпечує зміни в метаболізмі клітин, що направлені на активацію ростових та прозапальних процесів, активує ангіогенез, а також толерантність до гіпоксії. Клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума відома як відповідь на незгорнуті протеїни (UPR). Ця відповідь спрямована на відновлення нормального функціонування ендоплазматичного ретикулума. Вона використовує декілька стратегій, які діють паралельно і послідовно. Наприклад, експресія шаперонів в ендоплазматичному ретикулумі збільшується, щоб попередити агрегацію протеїнів для сприяння їх правильному згортанню. Крім того, кількість протеїну, яка проходить через ендоплазматичнй ретикулум, знижується внаслідок тимчасового інгібування трансляції. Також збільшується об'єм ендоплазматичного ретикулума у відповідь на стимуляцію синтезу мембранних ліпідів. Деградація незгорнутих протеїнів підвищується шляхом активації процесу ЕР-асоційованої деградації протеїну (ERAD). Під час UPR порушення гомеостазу в ендоплазматичному ретикулумі відчувається і передається в цитоплазму і ядро, викликаючи компенсаторну відповідь [139]. Існує три основні шляхи UPR, кожен з яких активує трансмембранну молекулу, локалізовану в ендоплазматичному ретикулумі: PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), ERN1 (from endoplasmic reticulum to nuclei-1) та ATF6 (activating transcription factor–6) [5].

ERN1 за фізіологічних умов знаходиться в неактивному стані через взаємодію з протеїном, який зв'язується з важким ланцюгом імуноглобуліну (BiP) [139]. Після накопичення незгорнутих протеїнів в просвіті ендоплазматичного ретикулума BiP від'єднується від ERN1, що призводить до його активації шляхом трансаутофосфорилювання. До того ж, інші механізми активації, такі як пряме зв'язування незгорнутих протеїнів з ERN1, також можуть мати місце [140]. ERN1 має цитоплазматичну ендорибонуклеазну ділянку, яка при активації запускає трансляцію мРНК, що кодує сплайс форму XBP1. Сплайс форма XBP1 є транскрипційним фактором, що індукує багато важливих генів UPR, підвищує фолдинг протеїнів і розширює площу поверхні

мембрани ендоплазматичного ретикулума [141]. Було показано, що ERN1 потрібен для розщеплення та посттранскрипційної деградації мРНК XBP1. Цей процес може функціонувати в якості ще одного механізму для зниження навантаження на ендоплазматичний ретикулум [142]. ERN1 також має внутрішню кіназну активність, що приймає участь в регуляції його нуклеазної активності. Інші функції ERN1 можуть бути пов’язані з індукцією апоптозу. Наприклад, при активації ERN1 зв’язується з адаптерним протеїном TRAF2, який потім сприяє активації JNK через ASK1 (MAP3K5) [143]. На додаток до своїх ендорибонуклеазної та кіназної активностей, в деяких типах клітин активація ERN1 є тригером для каспази 12 [144]. ERN1 пов'язаний з ішемією та гіпоксією, з процесами проліферації та ростом злоякісних пухлин [6-10]. Було показано, що повне блокування ERN1 призводить до різкого пригнічення росту пухлин, процесів ангіогенезу та проліферації за рахунок змін в експресії проангіогенних та антиангіогених генів, пухлиних супресорів та циклінів [11-14].

PERK є серин-треоніновою кіназою, яка чутлива до стресу та активується через трансаутофосфорилювання. Активована PERK фосфорилує eIF2α, що призводить до зниження трансляції та зменшує протеїнове навантаження на ендоплазматичний ретикулум [139, 145]. Проте, фосфорилювання eIF2α сприяє трансляції ATF4, який індукує ефектор UPR CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, також відомий як DDIT3 або GADD153). За патологічних умов, експресія CHOP викликає апоптоз через ряд механізмів, включаючи пригнічення антиапоптичного фактору Bcl-2 (B cell lymphoma-2) та індукцію кальцій-опосередкованого шляху апоптозу, викликаного транскрипційною мішенню CHOP ER оксидазою-1α [146].

Третій шлях UPR ініціюється ATF6. При виникненні стресу ендоплазматичного ретикулума ATF6 транслокується до комплексу Гольджі, де він розщеплюється протеазами по двом сайтам. Утворений фактор транскрипції потім мігрує до ядра і підвищує експресію шаперонів ендоплазматичного ретикулума, наприклад, Grp78 [139, 147].

Стрес ендоплазматичного ретикулума не лише контролює протеїновий фолдинг, але має вплив на багато інших фізіологічних процесів. Зокрема, нещодавні дослідження показали, що стрес ендоплазматичного ретикулума призводить до змін в енергетичному, ліпідному, глюкозному метаболізмі, клітинній диференціації, гомеостазі та в багатьох інших процесах.

Так було показано, що порушення регуляції ліпідного обміну призводить до дисліпідемії, резистентності до інсуліну, серцево-судинних захворювань, цукрового діабету 2 типу та ожиріння. До регуляції ліпідного обміну залучені усі три гілки UPR та їх нижче лежачі сигнальні молекули [148, 149]. На сьогоднішній день відомо, що експресія GRP78 знижує стеатоз печінки за допомоги інгібування ЕР-стрес індукованої активації протеїну 1c, який зв’язується зі стерол-регуляторним елементом [150]. PERK-залежний сигнальний шлях сприяє ліпогенній дифференціації, підтримуючи стабільну експресію ліпогенних ензимів [151]. Було показано, що резистентність до інсуліну в печінці також включає в себе активацію ERN1, однієї з головних ланок відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума. Можливо, причиною цього є перетин сигнальних шляхів між ERN1-JNK шляхом і подальшим фосфорилюванням субстрату 1 інсулінового рецептора (IRS1), що послаблює дію інсуліну [152].

Природа стимулів, що активують UPR в печінці мишей з ожирінням, до недавнього часу залишалася невідомою. Завдяки протеомним та ліпідомним підходам, група дослідників знайшла значні зміни у складі ліпідів ендоплазматичного ретикулума в клітинах печінки мишей з ожирінням, які призводили до інгібування кальцієвого насосу ендоплазматичного ретикулума (SERCA) та індукції стресу ендоплазматичного ретикулума [153].

Було показано, що сигнальні шляхи UPR, які залучені до фізіологічних процесів, безпосередньо не пов'язані з неправильним згортанням протеїнів. Наприклад, XBP1 позитивно регулює ліпогенез в печінці на базальних рівнях, впливаючи на рівні холестеролу та тригліцеридів, можливо, шляхом безпосередньої трансактивації ключових генів цього метаболічного шляху

[148]. Подібно до цього функціонують і ATF6 та ERN1 в метаболізмі ліпідів у печінці [154-156]. Крім того, стрес ендоплазматичного ретикулума регулює синтез пептидного гормону гепсидину [157], який секретується печінкою і контролює гомеостаз заліза в організмі. XBP1 фізично взаємодіє з FOXO1 (forkhead box protein O1), який є одним з ключових факторів транскрипції, залучених до контролю енергії [158], а також негативно регулює його рівень.

Фізіологічне значеня UPR дуже тісно пов'язане з його функцією в секреторних клітинах і дослідження показали, що XBP1 має основоположне значення для диференціації В-клітин в активно секретуюючі плазматичні клітини [159]. Було показано, що дефіцит XBP1 повністю припиняє секрецію імуноглобуліну. Це призвело до припущення про те, що необхідність синтезу імуноглобуліну створює базальну стресову умову, яка активує UPR [160]. Потім, у динамічний і циклічний спосіб, UPR може регулювати фолдинг протеїнів в клітині залежно від її потреб, що призводить до набуття клітиною ефективного секреторного фенотипу. Така ж концепція була запропонована і для багатьох секреторних органів [161-164].

До того ж, стрес ендоплазматичного ретикулума контролює глюконеогенні програми шляхом активації ATF6, що негативно модулює активність CREB-регульованого транскрипційного коактиватора 2 (CRTC2) [165].

Слід зазначити також, що дослідження, проведене на хондроцитах (спеціалізованих клітинах, які секретують колаген) показали, що хронічний стрес ендоплазматичного ретикулума, крім апоптозу, може мати і зовсім інший наслідок. Аналізуючи гіпертрофічні хондроцити в трансгенних мишах, які експресували мутантний колаген, автори показали, що стрес ендоплазматичного ретикулума викликає їх дедиференціювання у несекретуючі клітини [166], що може сприяти полегшенню стресу, викликаного накопиченням неправильно згорнутих протеїнів.

Таким чином, компоненти UPR є важливими регуляторами енергетичного обміну і, ймовірно, виконують роль сенсорів, які контролюють та інтегрують інформацію про метаболічний стан клітини.

Пухлинні клітини внаслідок високих темпів свого росту та проліферації не мають достатньої васкуляризації, що призводить до змін навколишнього мікрооточення пухлин та створює умови гіпоксії. Гіпоксія є потужним індуктором стресу ендоплазматичного ретикулума, але окрім сигнальних шляхів UPR вона здатна активувати й інші більш специфічні шляхи, які призводять до репрограмування метаболізму клітини та сприяють її виживанню. Як відомо, гіпоксія веде до збільшення експресії HIF-1, що містить HIF-1α і HIF-1β субодиниці, та діє як ключовий регулюючий фактор транскрипції, відповідальний за адаптивні клітинні зміни. Було показано, що в організмі людини, HIF-1 позитивно регулює експресію генів, що впливають на різноманітні фізіологічні функції: від ініціації запальних реакцій до регуляції метаболізму заліза. Особливо значним є вплив HIF-1 на гліколітичні гени, адже зміни в їх експресії допомагають клітині впоратися зі зниженням доступності та споживання кисню. Такими генами є: глюкозний транспортер 1 (GLUT1), гексокіназа, фосфоглюкоізомераза, фосфофруктокіназа, альдолази, глицеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, фосфогліцераткіназа, фосфогліцератмутаза, енолаза 1, піруваткіназа, ізофермент 1 кінази піруватдегідрогенази, (PDK1) та лактатдегідрогеназа A [167].

В умовах гіпоксії в пухлинах спостерігається підвищена експресія майже кожного гліколітичного ензиму. Надекспресія цих протеїнів опосередковується HIF-1 і повністю змінює нормальний клітинний метаболізм. Зі зниженням рівня мітохондріального окислення, починають накопичуватися лактат і протони. Цікаво, що високі рівні гліколізу та синтезу лактату, які спостерігаються у гіпоксичних пухлинних клітинах, є відмінною ознакою пухлинних клітин навіть у присутності кисню.

На додаток до змін у концентрації кисню, пов'язаних з гіпоксичним мікрооточенням, градієнти концентрації глюкози в пухлинах також впливають

на рівні аеробного та анаеробного гліколізу. Елемент, чутливий до вуглеводів (ChoRE), відповідає за регуляцію експресії генів гліколітичних ензимів у відповідь на зміну концентрації глюкози шляхом взаємодії з тією ж консенсусною послідовністю, що і HIF-1. Взаємодії HIF-1 та ChoRE з послідовністю ДНК 5'-RCGTG-3' призводять до підвищення експресії генів, перерахованих вище [168].

Для того, щоб полегшити ацидоз в пухлинних клітинах, після активації HIF-1 починають високо експресуватись карбоангідрази. Ці ферменти каталізують зворотню гідратацію діоксиду вуглецю в бікарбонат і протони. Вони також призводять до підкислення позаклітинного середовища та підтримання злегка лужного внутрішньоклітинного середовища, що сприяє виживанню пухлинних клітин [169]. Лактат з гіпоксичних пухлинних клітин екскретується в навколишнє середовище клітини завдяки карбоангідразі 9, натрій-гідрогенному обміннику 1 (NHE1) та монокарбоксилатному транспортеру 4 (MCT4). Аеробні ж пухлинні клітини поглинають цей лактат, формуючи, так званий, метаболічний симбіоз [170].

1.5. Роль гіпоксії в механізмах регуляції експресії генів та в рості злоякісних пухлин

Пухлинні клітини внаслідок високих темпів свого росту та проліферації не мають достатньої васкуляризації, що призводить до змін навколишнього мікрооточення пухлин, створює умови гіпоксії або аноксії, обумовлює дефіцит глюкози та деяких поживних речовин, змінює pH і експресію багатьох життєво важливих протеїнів, і це має серйозні наслідки для злоякісної прогресії та відповіді на протипухлинну терапію [171]. З’ясування процесів, які дозволяють пухлинним клітинам адаптуватись до несприятливих умов гіпоксії, має важливе значення для розуміння прогресії пухлин та для розробки більш ефективних моделей протипухлинної терапії. Гіпоксія є сильним індуктором стресу для клітини, що запускає каскад реакцій направлених на виживання та, у випадку

неспроможності клітини справитись зі стресом, на апоптоз. Одну з ключових ролей в адаптації пухлинних клітин до гіпоксії відіграє HIF-1, що регулює експресію більше ніж 60 генів, залучених до ангіогенезу, анаеробного гліколізу та виживання клітин [172, 173]. Дослідження показали, що втрата функції HIF-1 протидіє росту пухлин [174, 175]. Однак роль HIF-1 є багатогранною і значною мірою залежить від мікрооточення пухлин [176, 177].

Гіпоксія клітин також викликає додаткові HIF-1 незалежні адаптивні відповіді, що сприяють підвищенню виживання клітин в умовах низького рівня кисню. Швидка реакція на вплив гіпоксії призводить до загального зниження темпів синтезу протеїнів для зниження потреб в енергії за умов низького рівня кисню та АТФ [178].

Гіпоксія є потужним індуктором стресу ендоплазматичного ретикулума, викликаючи порушення його гомеостазу та нормального функціонування. За цього стану відбувається акумулювання незгорнутих чи помилково згорнутих протеїнів в просвіті ендоплазматичного ретикулума. Відновлення гомеостазу ендоплазматичного ретикулума має важливе значення для виживання клітин.

Зниження вмісту кисню активує метаболічну адаптацію клітин для їх виживання шляхом посилення гліколізу для продукції енергії, а також зниження витрат АТФ. Основним фактором, що контролює перебудову метаболізму за умов гіпоксії є HIF1 (фактор, що індукується за гіпоксії), який забезпечує збільшене споживання та метаболізм глюкози шляхом посилення експресії і активності ензимів гліколізу, а також його регуляторів [179]. Транскрипційний фактор HIF1 функціонує як гетеродимер і саме його альфа-субодиниця є залежною від гіпоксії, причому її рівень контролюється убіквітинацією, яка опосередковується пролілгідроксилазами та пухлинним супресором VHL (von Hippel-Lindau) [10]. Відомо, що активність пролілгідроксилаз є залежною від кисню, а тому за гіпоксії вони втрачають активність і HIF1α не убіквітинується, а стабілізується і акумулюється у клітинах [180]. Акумулювання HIF1α також може бути результатом впливу активних форм кисню, утворених в процесі мітохондріального окисного

фосфорилювання, які інгібують пролілгідроксилазну активність, а це сприяє стабілізації HIF1α [181].

Транскрипційний фактор HIF, що утворюється шляхом димеризації альфа-субодиниці HIF із HIF-1-β (ARNT), посилює експресію низки генів, залучених до анаеробного гліколізу, в тому числі, переносників глюкози, ферментів гліколізу та лактатдегідрогенази А (LDH-A) [182]. Крім того, HIF1 сприяє транспорту піровату з мітохондрій шляхом позитивної регуляції кінази 1 піруватдегідрогенази (PDK1), негативного регулятора піруватдегідрогенази (PDH), ензиму, що обмежує швидкість перетворення піровату в ацетил-КоА [183, 184].

Відомо, що HIF1, окрім адаптації до гіпоксії, відіграє значно більшу роль, оскільки активність HIF1 стимулюється окисним, енергетичним, запальним та онкогенетичним стресом, а також підвищенням концентрації проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот (сукцината і фумарата) шляхом порушення функції пролілгідроксилази [185]. Більше того, мутації в субодиницях сукцинатдегідрогенази або фумаратгідратази приводять до стабілізації HIF1α за нормальних умов [186, 187].

Альфа субодиниця HIF1, окрім основної регуляції шляхом убіквітин-залежної деградації, регулюється також на рівні транскрипції факторами росту, в тому числі і через фосфоінозитид-3-кіназний (PI3K) сигнальний шлях [188]. Таким чином, у злоякісних пухлинах, в яких активуються різні фактори росту, переважає транскрипційний шлях активації HIF1 [189-192].

Іншою важливою відповіддю на адаптацію до гіпоксії є швидке пригнічення загальної трансляції протеїнів, яка є зворотною і опосередковується сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема PERK (double stranded RNA activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase), яка знаходиться на ендоплазматичному ретикулумі і призводить до інгібування трансляції мРНК за допомогою фосфорилювання фактору ініціації трансляції eIF2α [193, 194]. За хронічної гіпоксії порушується функція кеп-зв'язуючого комплексу eIF4F і зменшується

асоціація мРНК з рибосомами, в результаті чого ефективно блокується трансляція [195]. Крім того, за гіпоксії спрацьов ує і інший механізм гальмування трансляції шляхом активації AMPK (AMP-activated protein kinase), що призводить до TSC2-залежного інгібування mTOR [196] та пригнічення елонгації внаслідок активації кінази еукаріотичного фактору елонгації 2 (eEF2) [197].

Інші протеїни, що залучені у метаболічну адаптацію за умов гіпоксії, в тому числі TP53, також активуються [198, 199]. Під час гіпоксичного стресу TP53 активує свої мішені для виконання різноманітних функцій, включаючи затримку клітинного циклу ($p21^{Waf1}$, GADD45, 14-3-3δ та ін.), репарацію ДНК (p48, p53R2, APE1, Pol β, GADD45 та ін.) та апоптоз (BCL2, PUMA, NOXA, Fas, DR5, BAX, APAF-1 та ін.).

Таким чином, гіпоксія впливає на зміни в експресії багатьох протеїнів, зокрема, шаперонів GRP78 та GRP94, які відповідають за забезпечення правильного згортання протеїнів, а також GRP170, який пов'язаний з виходом із пухлинних клітин ендотеліального фактору росту судин VEGF-A, а останній забезпечує виживання пухлинних клітин за умов гіпоксії [200-202]. В умовах гіпоксії в пухлинних клітинах активуються процеси проліферації та метастазування за рахунок активації пентозофосфатного шляху та гліколізу, а також індукує у пухлинах резистентність до лікування [203-206].

Таким чином, дослідження молекулярних механізмів пригнічення проліферації цих клітин за умови виключення ERN1, основного сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума, є надзвичайно актуальним, оскільки ще немає ефективних методів лікування гліом і не з’ясовані повністю механізми, які лежать в основі агресивної поведінки клітин гліоми. В цьому плані вивчення змін в експресії генів пухлинного супресора TP53 і асоційованих з ним протеїнів у клітинах гліоми з пригніченою активністю ERN1 як за нормальних умов, так і за гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну буде сприяти виявленню перспективних генів-мішеней для розробки нових стратегій пригнічення росту злоякісних пухлин.

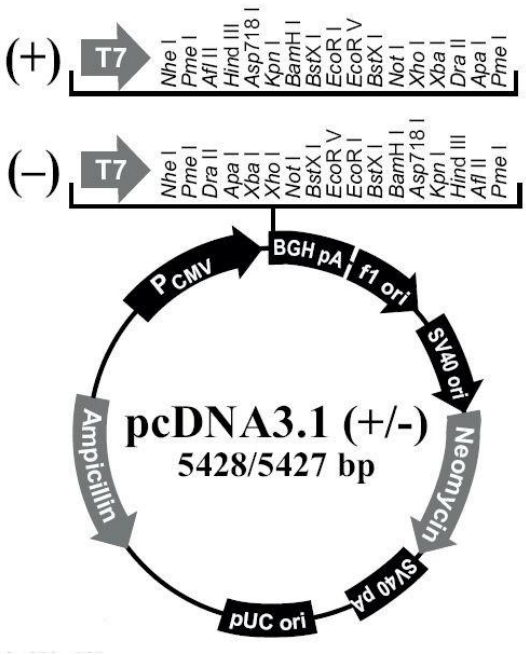
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

Досліди проводили на культурах клітин гліоми лінії U87, які були отримані із American Type Culture Collection (США). У цій роботі були використані також дві сублінії клітин гліоми. Одну з них було отримано шляхом селекції клонів, стабільно трансфекованих вектором pcDNA3.1, який був використаний для створення домінант-негативних конструкцій, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1). Для отримання другої сублінії було використано домінан-негативну конструкцію на основі вектора pcDNA3.1, що містила кДНК ERN1 з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1), яка була індукована введенням в структуру каталітичного домена ендорибонуклеази чотирьох нуклеотидних залишків, що змінили рамку зчитування і ініціювали появу передчасного термінуючого трансляцію кодону. Створена таким чином конструкція могла кодувати синтез вкороченого з С-кінця ензиму без ендорибонуклеазної активності [GenBank accession number JQ425696].

Використані у роботі домінант-негативні конструкції на основі вектора pcDNA3.1, що містили кДНК сенсорно-сигнального ензиму ERN1 без кіназного та ендорибонуклеазного доменів (dnERN1) була надана професором M. Moenner (Франція), а з мутацією в каталітичній частині ендорибонуклеази (dnrERN1) створена науковим керівником, професором О. Г. Мінченком [12, 207].

Генетична карта плазміди, на основі якої були створені зазначені домінант-негативні конструкції, представлена на рис.2.1.1. Структурні форми ERN1, які використовувались у роботі, зображені на рис. 2.1.2.



CMV промотор: 232-819

T7 промотор: 863-882

Мультиклональний сайт: 895-1010

pcDNA3.1/BGH зворотній сайт зв’язування праймерів: 1022-1039

Послідовність поладеніювання BGH: 1028-1252

f1 оріджин: 1298-1726

ранній промотор і оріджин SV40: 1731-2074

ген, нечутливий до дії Неоміцину (ORF): 2136-2930

сигнал ранього поліаденілювання SV40: 3104-3234

pUC оріджин: 3617-4287 (комплементарний ланцюг)

ген резистентності о ампіциліну (bla): 4432-5428 (комплементарний ланцюг)

ORF: 4432-5292 (комплементарний ланцюг)

Сайт зв’язування рибосоми: 5300-5304 (комплементарний ланцюг)

bla промотор (P3): 5327-5333 (комплементарний ланцюг)

Рис. 2.1.1. Генетична карта плазміди pcDNA3.1.

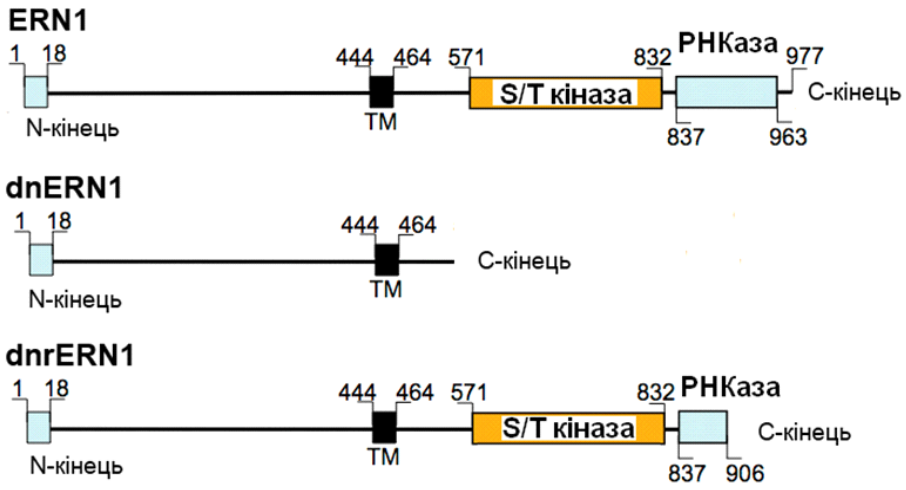


Рис. 2.1.2. Схематичне зображення структури ERN1 та його мутантних варіантів:

ERN1 - структура нативного ERN1;

dnERN1 - ERN1 без обох ензиматичних активностей (кіназа та ендорибонуклеази);

dnrERN1 - ERN1 з мутацією в ендорибонуклеазному домені [12, 207]. Цифрами – позначено амінокислотні залишки у послідовності ERN1; N-кінець – (N-кінцева частина), TM – (трансмембранна частина), (S/T кіназа – (ділянка серин/треонінової кінази), (РНКаза – ендорибонуклеаза), а С-кінець – (С-кінцева частина ERN1).

2.2. Умови проведення експерименту

Трізол (TRIsol) для виділення РНК, трансфекційний реагент Lipofectamine 2000 отримували з *Invitrogen (США)*, вільна вода від нуклеаз та колонки для виділення плазмід – з фірми *QIAGEN (Німеччина)*, буфер Laemmli, знежирене молоко та пофарбовані маркери молекулярної ваги – із *Bio-Rad Lab (США)*, додецилсульфат натрію (SDS), Tween 20, Tris, HEPES, бромистий етидій, LB агар, середовище LB та DMEM – із *Sigma (США)*, ембріональну сироватку телят – з *Equitech-Bio Inc (США)*, пеніцилін, стрептоміцин, агарозу, фенол-

хлороформ-ізоаміловий спирт – із *Gibco (США)*. Інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації ос. ч. та х. ч.

PVDF мембрану Immobilon було отримано від *Millipore (США)*, реагент ESL+ – з *GE Healthcare (США)*, набори для проведення реакції зворотної транскрипції (QuantiTect Reverse Transcription Kit та Sensiscript RT Kit), набір для проведення полімеразної ланцюгової реакції HotStarTaq Master Mix Kit, були отримані від *QIAGEN (Німеччина)*, а також набір для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції SYBRGreen Mix – від *AB gene, Thermo Fisher Scientific (Велика Британія)*.

В проведених дослідженнях використовували компетентні бактерії TOP10 One Shot Chemically Competent cells, які отримували з *Invitrogen (США)*. Праймери для проведення полімеразної ланцюгової реакції отримували із компанії *Sigma-Aldrich (США)*.

В роботі також було застосовано наступне обладнання: лічильник клітин Coultronics (*Margency (Франція)*), ампліфікатор “MasterCycler Personal” (*Eppendorf (Німеччина)*), фотокамера MINTRON 168p (Mintron Enterprise Co. Ltd, Тайвань), трансілюмінатор ECX-15L (Vilber Lourmat, Франція). Кількісний ПЛР проводили на апараті „Mx 3000P QPCR” (*Stratagene (США)*). форезна камера Mupid (ADVANCE CO., LTD Японія), шейкер “water bath shaker type 357” (ELPAN, Польща) та шейкер Aquatron CH-4103 (Infors HT, Швейцарія), термостат електричний сухоповітряний ТС-80М (ВПО “союзмедприбор”, СССР), ваги аналітичні RADWAG WPS 510/C/1 (RADWAG, Польща), pH метр CYBERSCAN pH 510 (EUTECH INSTRUMENTS, США).

2.3. Методи досліджень

У роботі використовували спектрофотометричні методи визначення кількості ДНК та РНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот та фрагментів ампліфікації, методи виділення РНК із клітинних ліній, виділення

плазмідних та рекомбінантних ДНК, зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції.

2.3.1. Робота з культурами евкаріотичних клітин та умови їх культивування

Клітини гліоми лінії U87 вирощувалися згідно рекомендацій фірми-виробника у середовищі DMEM з високою концентрацією глюкози (4,5 г/л), що містило додатково 2 mM глутаміну, 10% ембріональної сироватки телят, пеніцилін (100 одиниць/мл) та стрептоміцин (0,1 мг/мл) при 37^0C в атмосфері з 5% CO_2.

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

Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума клітини витримували в середовищі з тунікоміцином (0,01мг/мл) протягом 2 год.

2.3.2. Дослідження інтенсивності проліферації клітин

Швидкість проліферації контрольних клітин гліоми і клітин з блокованим ERN1 були виміряні за допомогою лічильника клітин. Число клітин вимірювали в трьох примірниках після 3 днів росту клітин.

2.3.3. Виділення РНК

РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Trisol, який містить ізотіоціанат гуанідину, буфер та фенол (Invitrogen, США), згідно з протоколом виробника, а також методом гуанідинтіоціанат-фенол-хлороформної екстракції, який був описаний Chomczynski та Sacchi [208]. До клітин безпосередньо в

чашки додавли по 2 мл розчину гуанідинізотіоціаната (ультрачистого) (4М гуанідинізотіоціанат, 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 25mM EDTA, та 0,1М 2-меркаптоетанол). Далі до клітинного лізату послідовно додавали 0,2мл 2М натрію ацетату (pH 4,0), 2мл фенолу і 0,4мл суміші хлороформу та ізоамілового спирту (49:1), ретельно перемішуючи після додавання кожного реагенту. РНК осаджували рівним об'ємом 2-пропанолу. Осад РНК промивали 75% етанолом, розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз, переосаджували етанолом для видалення можливих залишків фенолу, знову розчиняли у воді і використовували для синтезу комплементарної ДНК.

Концентрацію РНК вимірювали спектрофотометрично, а чистоту та стабільність отриманих препаратів РНК перевіряли електрофорезом в агарозному гелі.

2.3.4. Зворотна транскрипція РНК

Зворотну транскрипцію проводили як описано Minchenko та співав. [209]. Для зворотної транскрипції використовували тотальну РНК, виділену з різних субліній клітин. У реакційну суміш, загальним об’ємом 20 мкл, вносили 0,5 мкг тотальної РНК, 5 нмоль (oligo dT)-праймера, 4 мкл 5х буфера, 1 мкл 100 мМ ДТТ, 10 ммоль суміші всіх чотирьох dNTP, 0,5 мкл інгібітору РНКази (40 од./мкл), 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus M-MuLV з активністю 200 од/мкл. Денатурацію РНК проводили при +65^{0}С протягом 5 хв одразу після додавання (oligo dT)-праймера, охолоджували і після цього додавали інші компоненти реакційної суміші. Синтез проводили при +42^{0}С протягом однієї години. Реакцію зупиняли шляхом інкубації при 70^{0}С протягом 5 хв, охолоджували і до використання зберігали при -20^{0}С. Для синтезу кДНК використовували також набір „QuantiTect Reverse Transcription” (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію можливих залишків геномної ДНК, оскільки в ньому передбачено етап інкубації РНК з ДНКазою, вільною від РНКази (gDNA Wipeout Buffer). До 1 мкг РНК спочатку додавали 2 мкл gDNA

Wipeout Buffer та розводили вільною від рибонуклеаз водою до загального об'єму 14 мкл, після чого інкубували суміш при 42^0C протягом 2 хвилин, та переносили суміш на лід. Далі додавали 4 мкл Quantiscript RT Buffer, 1 мкл суміші праймерів і 1 мкл Quantiscript Reverse Transcriptase та інкубували при 42^0C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95^0C протягом 3 хвилин. Для деяких досліджень було використано набір Sensiscript RT Kit.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції реакційну суміш кДНК розводили і брали в реакцію від 1/20 до 1/1000 її частки в залежності від досліджуваного гена.

2.3.5. Аналіз експресії генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Ампліфікація кДНК XBP1 була здійснена використовуючи HotStarTaq Master Mix Kit ("QIAGEN", Germany), "MasterCycler Personal" ("Eppendorf", Germany) та праймери: прямий —5'-GGAGTTAAGACAGCGCTTGG -3' і зворотній —5'-TCACCCCTCCAGAACATCTC-3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 441 - 460 та 608 - 589 мРНК XBP1 (GenBank accession number NM_005080). Розмір ампліфікованого фрагмента 168 п.н.з. для основного варіанту та 142 п.н.з. для альтернативного сплайс варіанту (XBP1s), а для ампліфікації кДНК бета-актина (ACTB) були використані такі праймери: прямий - 5'– ggacttcgagcaagagatgg –3' та зворотний - 5'– agcactgtgttggcgtacag –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 747 – 766 та 980 – 961 кДНК ACTB людини (GenBank accession number NM_001101). Розмір ампліфікованого фрагмента 234 п.н.з. По рівню експресії мРНК бета-актину оцінювали кількість РНК, взятої для аналізу.

Перед початком ампліфікації реакційну суміш прогрівали при 95^0C протягом 15 хв для активації Taq-полімерази. Ампліфікацію проводили при таких умовах:

денатурація – $+94^0$C, 30 сек.;

асоціація праймерів – 55^0C, 30 сек.;

синтез – $+72^0$C, від 30 сек.;

кількість циклів – 35.

На заключному етапі проводили інкубацію при $+72^0$C протягом 5 хв для повного завершення синтезу всіх ланцюжків і зупиняли реакцію, охолоджуючи до 4^0C. Кількість взятої для аналізу РНК додатково оцінювали по синтезу кДНК β-актину.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 20 мкл. Реакційна суміш містила 10 мкл двократної реакційної суміші для ПЛР в режимі реального часу, що містить інтеркаляційний барвник SybrGreen, 2 мкл препарату кДНК, по 1 мкл прямого та зворотного праймерів та 6 мкл вільної від нуклеаз води.

Для ампліфікації кДНК пухлинного протеїну 53 (TP53) були використані такі праймери: прямий 5'– ggcccacttcaccgtactaa –3' та зворотний 5'– gtggtttcaaggccagatgt –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1694 – 1713 та 1849 – 1830 кДНК TP53 людини (GenBank accession number NM_000546). Розмір ампліфікованого фрагмента 159 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК TP53BP1 (tumor protein p53 binding protein 1) проводили з такими праймерами: прямий 5'– cagtccccagaagaccatgt –3' та зворотний 5'– ctgggaagcaggagaaacag –3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 3229 – 3248 та 3463 – 3444 кДНК TP53BP1 людини (GenBank accession number NM_005657). Розмір ампліфікованого фрагмента 235 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК TP53BP2 (tumor protein p53 binding protein 1) також відомого як apoptosis-stimulating of p53 protein 2 (ASPP2) були використані такі праймери: прямий 5'– cataccagagggccacactt –3' та зворотний

5’– tcagcatcactctggtttcg –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 2345 – 2364 та 2592 – 2573 кДНК TP53BP2 людини (GenBank accession number NM_005426). Розмір ампліфікованого фрагмента 248 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК MDM2 (MDM2 p53 binding protein homolog), також відомого як p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog, були використані такі праймери: прямий 5’– cagcttcggaacaagagacc –3’ та зворотний 5’– gtccgatgattcctgctgat –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 364 – 383 та 656 – 637 кДНК MDM2 людини (GenBank accession number NM_002392). Розмір ампліфікованого фрагмента 293 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК USP7 (the ubiquitin specific peptidase 7), також відомого як herpes virus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP), в ПЛР у реальному часі проводили з такими наступними олігонуклеотидними праймерами: прямий – 5’– gttatagggatggcccaggt –3’ та зворотний – 5’– tccacggccttttacattc –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 2730 – 2749 та 2988 – 2969 кДНК USP7 людини (GenBank accession number NM_003470). Розмір ампліфікованого фрагмента 259 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК PERP (TP53 apoptosis effector) також відомого як p53-induced protein (PIGPC1) були використані такі праймери: прямий 5’– catgctcttctgtggcttca –3’ та зворотний 5’– aaagccgtaggcccagttat –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 420 – 439 та 648 – 810 кДНК PERP людини (GenBank accession number NM_022121). Розмір ампліфікованого фрагмента 229 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК CSNK2A1 (casein kinase-2alpha 1), також відомого як herpes virus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP), в ПЛР у реальному часі проводили з такими наступними олігонуклеотидними праймерами: прямий – 5’– acgagtcacatgtggtggaa –3’ та зворотний – 5’– ggttcgtgacacagggtctt –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 535 – 372 та 600 – 581 кДНК CSNK2A1 людини (GenBank accession number NM_001895). Розмір ампліфікованого фрагмента 248 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК CSNK2A2 (casein kinase-2A2) також відомого як p53-induced protein (PIGPC1) були використані такі праймери: прямий 5’– catgcacagggatgtgaaac –3’ та зворотний 5’– tgcgaacaagctggtcatag –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 601 – 620 та 878 – 859 кДНК CSNK2A2 людини (GenBank accession number NM_001896). Розмір ампліфікованого фрагмента 278 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК CSNK2B (casein kinase-2B) в ПЛР у реальному часі проводили з такими олігонуклеотидними праймерами: прямий – 5’– tcctggatttcctggttctg –3’ та зворотний – 5’– cactctggttggggttgtct–3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 362 – 381 та 548 – 529 кДНК CSNK2B людини (GenBank accession number NM_001320). Розмір ампліфікованого фрагмента 187 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК TOPORS (topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin protein ligase) також відомого як tumor suppressor p53-binding protein 3 були використані такі праймери: прямий – 5’– ttcgctgtgtacaggagtgg –3’ та зворотний – 5’– ccggtggagttgttgttctt –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 566 – 585 та 814 – 595 кДНК USP7 людини (GenBank accession number NM_005802). Розмір ампліфікованого фрагмента 249 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК NME6 (non-metastatic cells 6) також відомого як NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6 були використані такі праймери: прямий 5’– ttctatccgtgggagtttcg –3’ та зоротний 5’– taggcctcctgttccagcta –3’). Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 409 – 428 та 619 – 600 кДНК NME6 людини (GenBank accession number NM_005793). Розмір ампліфікованого фрагмента 211 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК POLO1 (Polo-like kinase 1; serine/threonine-protein kinase 13, STK13) були використані такі праймери: прямий - 5’– caccaaggttttcgattgct –3’ та зоротний - 5’– tacccaaggccgtacttgtc –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1018 – 1037 та 1327 –

1308 кДНК POLO1 людини (GenBank accession number NM_005030). Розмір ампліфікованого фрагмента 310 п.н.з.

Ампліфікацію кДНК RBL1 (Retinoblastoma like-1) були використані такі праймери: прямий - 5’– gaagggatgttcgaggacaa –3’ та зоротний - 5’– tgcggcatgcaacatataat –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 74 – 93 та 284 – 265 кДНК RBL1 людини (GenBank accession number NM_002895). Розмір ампліфікованого фрагмента 211 п.н.з.

Для ампліфікації кДНК ZMAT3 (zinc finger, Matrin-type 3) також відомого як p53-activated gene 608 protein and p53 Target Zinc Finger Protein) були використані такі праймери: прямий 5’– gaattccggcagcatttaga –3’ та зоротний 5’– acgttcttcacacccacctc –3’. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовності 1109 – 1128 та 1396 – 1377 кДНК ZMAT3 людини (GenBank accession number NM_022470). Розмір ампліфікованого фрагмента 288 п.н.з.

Відносна кількість транскриптів розраховувалась по кількості транскриптів β-актину. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі використовували по три – п’ять незалежно виділених препаратів РНК. Ампліфікацію кожнго із генів проводили у трьох повторах.

Здійснювали серію розведень для визначення оптимальної кількості кДНК, необхідної для проведення полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Максимальна концентрація кДНК в контролі забезпечувала досягнення порогового циклу C(T), в діапазоні 24-26 циклів, а мінімальна концентрація забезпечувала дещо більший C(T) ніж у експериментальних зразків. Оптимальна концентрація кДНК у контролі забезпечувала C(T) в районі 25 - 28 циклів. Результати аналізовували завдяки інтегрованому програмному забезпеченню системи “Mx 3000P QPCR” та для кожного сигналу отримали величини C(T).

Усі пари праймерів, які були використані в подальших дослідженнях, мали ефективність у межах 70 – 100% та не утворювали неспецифічних продуктів і димерів. Для кожної пари праймерів було підібрано оптимальну температуру гібридизації, що забезпечувала найвищу ефективність реакції.

Також для кожної пари праймерів було перевірено коректність визначення кількості контрольної кДНК з використанням методу стандартних розведень матриці, для подальших досліджень брали праймери з коефіцієнтом кореляції за методом стандартніх розведень ≥ 0,95.

Специфічність ампліфікації визначали за допомогою аналізу кривих плавлення продуктів полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Криві плавлення були проаналізовано в діапазоні температур 55 – 94^{0}C. На кривих плавлення спостерігався 1 пік флуоресценції, що відповідав плавленню специфічного продукту.

Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator".

2.3.6. Приготування компетентних бактерій та їх трансформація

Для проведення трансформації використовували компетентні бактерії TOP10 One Shot Chemically Competent cells або готували їх власноручно. Для цього бактерії висівали на LB-агар, ростили, відбирали окрему бактеріальну колонію (1-3 мм діаметром) із чашки і переносили її у пробірку з 5 мл поживного середовища LB. Бактерії ростили протягом 15 години при 37^{0}C з енергійним перемішуванням. 1 мл культури переносили в 50 мл поживного середовища і культуру ростили біля трьох годин при 37^{0}C з енергійним перемішуванням. Бактеріальну суспензію переносили в пробірки і охолоджували до 0^{0}C на льодяній бані. Осаджували клітини центрифугуванням при 2700 g протягом 10 хв при 4^{0}C. Ресуспендували бактерії в 10 мл охолодженого на льоду 0,06 М $CaCl_2$, що містив 10 мМ HEPES (pH 7.0) і 10% гліцерину та інкубували на льодяній бані протягом 5 хв. Центрифугували, надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували у 10 мл холодного 0,06 М $CaCl_2$. Суспензію інкубували на льоду протягом 5 хв, центрифугували, надосадову рідину зливали, а осад ресуспендували в 2 мл охолодженого до 0^{0}C 0,06 М $CaCl_2$, що містив 10 мМ HEPES (pH 7.0) та 10% гліцерину. Суспензію

отриманих таким чином компетентних бактерій ділили на аліквоти об’ємом по 10 – 50 мкл, заморожували у пробірках і зберігали при -80^{0}С.

Компетентні бактерії (TOP10 One Shot Chemically Competent cells) трансформували плазмідами методом теплового шоку. Принцип методу полягає у тому, що після обробки клітин E. coli льодяним розчином $CaCl_2$, вони здатні адсорбувати на себе плазмідну ДНК. Наступне різке підвищення температури сприяє локальному частковому руйнуванню клітинної стінки, внаслідок чого плазміди, адсорбовані мембраною бактеріальних клітин, проникають у бактерії. Максимальна частота трансформації цим методом наближається до 10^{-3}.

Для трансформації до суспензії бактерій додавали 10 нг розчину плазміди, дуже обережно перемішували і залишали на льодяній бані. Через 30 хв пробірку з бактеріями інкубували протягом 45 с при 42^{0}С. Швидко переносили пробірку на лід і інкубували протягом 2 хв. Додавали 5 об’ємів теплого середовища LB. Пробірки поміщали в термостат на 1 год при 37^{0}С. Висівали бактерії на заздалегідь підігріту до 37^{0}С чашку з агаром, що містив ампіцилін, та ростили їх при 37^{0}С. Трансформовані колонії з’являються через 12 – 15 годин.

2.3.7. Виділення плазмід із бактерій

Виділення плазмід проводили згідно протоколу компанії QIAGEN (Німеччина). Принцип методу полягає в отриманні лізату бактерій та сорбції плазмід із лізату бактерій на спеціальних колонках з подальшою елюцією буферним розчином, що містить 1,25 М NaCl.

Реактиви, що використовувались при виділенні плазмід:

- буфер для ресуспендування (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM ЕДТА, 100 мг/мл РНКази А);

- лізуючий буфер (200 мМ NaOH і 1% додецилсульфату натрію);

- нейтралізуючий буфер (3.0 М ацетату калію, pH 5.0);

- еквілібріруючий буфер (750 мМ NaCl, 50 мМ MOPS, pH 7.0, 15% ізопропанолу і 0,15% Triton X-100);

- промивний буфер (1.0 М NaCl, 50 мМ MOPS, pH 7.0, 15% ізопропанолу);

- буфер для елюції (1.25 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8.5, 15% ізопропанолу);

- ТЕ буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA);

- STE буфер (100 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA).

Бактерії вирощували протягом 12 год в LB-середовищі з ампіциліном (80 мкг/мл), переносили в пробірки, осаджували при 6000g протягом 5 хв і ресуспендували в 4 мл буфера для ресуспендування. Додавали 4 мл лізуючого буферу і лізис проводили при кімнатній температурі протягом 5 хв. Лізат нейтралізували 4 мл нейтралізуючого буферу, проби ставили на льодяну баню на 5 хв, а потім центрифугували при 15000g протягом 20 хв. Прозору надосадову рідину наносили на пре-еквілібровані 4 мл еквілібруючого буферу колонки. Потім колонки промивали 15 мл промивного буферу. Плазміди із колонки елюювали 5 мл буферу для елюції та осаджували 3.5 мл ізопропанолу при 15000g протягом 20 хв. Осад плазмід промивали 1 мл 70% етанолу і розчиняли в ТЕ буфері.

2.3.8. Електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелях

Для електрофорезу нуклеїнових кислот використовували різні по концентрації агарози (від 0,7 до 2%) гелі в тріс-ацетатному буфері з ЕДТА (ТАЕ). Агарозу розчиняли при нагріванні, охолоджували до 50^0С і заливали у камеру для електрофорезу. Гель формувався протягом 30 – 35 хв при кімнатній температурі. Електрофорез проводили в буфері ТАЕ при градієнті напруги 10 вольт/см та силі струму 50 мА протягом 60 хв. Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували 100bp ДНК-маркер. По закінченні електрофорезу гель інкубували з бромистим етидієм (0,05 мкг/мл) протягом 20

хв, відмивали та аналізували в ультрафіолетовому світлі при довжині хвилі 310 нм у спеціальній камері та фотографували за допомогою цифрової фотокамери.

Аналіз отриманих білкових фракцій здійснювали електрофоретично у 6% ПААГ за присутності SDS.

Для приготування гелю використовували наступні реактиви:

Буфер для розділяючого гелю: 0.375 М Трис-HCl, pH 8.8, 0.4% TEMED.

Буфер для концентруючого гелю: 0.125 М Трис-HCl, pH 6.8, 0.5% TEMED.

Акриламід 30%, в якому співвідношення акриламіду до метиленбісакриламіду становить 29 : 1.

Електродний буфер: 0.025 М Трис, pH 8.3, 0.192 М гліцин, 0.1% SDS. 0.28% персульфат амонію.

Проби проварювали протягом 5хв. при температурі 100^0C у буфері наступного складу: 8% SDS, 0.2 М ДТТ, 0.5 М Tris-HCl pH = 6.8, 40% гліцерол, 0.2% бромфеноловий синій (4х буфер). Їх вносили на дно кишеньок у концентруючому гелі з розрахунку ~10-18 мкг білка на один трек. Для визначення молекулярної маси білків у пробах, використовували білкові стандарти Bio-Rad: 6 мкг білка на один трек.

Фіксацію здійснювали 70% ізопропанолом протягом 30 хв.

Білки забарвлювали розчином 0.04% Coomassie Blue в суміші ізопропанол/етанол/льодова оцтова кислота/вода (2 : 1 : 1 : 6) протягом 2 год.

Відмивання здійснювали 10% розчином оцтової кислоти.

2.3.9. Вестерн-блот аналіз протеїнів

Вестерн блот-аналіз проводили використовуючи цитозольні екстракти з клітин гліоми, які отримували як описано [210]. Для цього клітини гомогенізували у холодному буфері А (10 мМ HEPES-KOH pH 7.9, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 0,5 мМ дитіотриітол, 0,5 мМ фенілметилсульфоніл флуорид, 1 мМ бензамідин, 1 мг/л лейпептин, 1 мг/л пепстатин, 0.5 % NP-40). Гомогенат

залишали на льоду протягом 10 хвилин, ресуспендували та центрифугували 15 секунд. Супернатант (цитозольний екстракт) переносили у нові мікропробірки використовували для проведення вестерн блот-аналізу.

Отримані цитозольні екстракти з двох субліній клітин гліоми лінії U87 денатурували у буфері з додецилсульфатом натрію і дітіотрейтолом, лізат інкубували 3 хв при 94^{0}С та центрифугували при 16600 g і +20^{0}С протягом 3 хв. та розділяли за допомогою електрофорезу у 12 % поліакриламідному гелі з використанням Трис-гліцинового буферу. Окрім екстрактів клітин гліоми в окрему лунку також вносили протеїновий маркер (Fermentas, США). Продукти електрофорезу переносили на PVDF мембрану шляхом електротрансферу у буфері (25 мМ Tpic, 192 мМ гліцину, 10% метанол) протягом 1 год при 100 В. Далі мембрану було блоковано у буфері TBST (10мМ Tris-HCl, pH 7.5, 150мМ NaCl, 0.05% Tween-20) з додаванням 5% знежиреного молока, протягом 1 год при кімнатній температурі. Для вестерн-блот аналізу було використано первинні моноклональні антитіла до TP53 (Santa Cruz Biotechnology, США), що додавали у буфері TBST з 3% знежиреного молока у відношені 1:2000 і 1:10000. Мембрану інкубували з первинними антитілами протягом 18 год при 4^{0}С. Далі мембрану промивали 4 рази TBST та інкубували з вторинними антитілами протягом 2 год у TBST з додаванням 3% знежиреного молока. Далі мембрану промивали 4 рази TBST, проявляли з використанням реагенту ESL+ відповідно до протоколу виробника і фотографували використовуючи систему MINTRON.

2.3.10. Аналіз результатів та їх статистична обробка

Аналіз результатів ПЛР у реальному часі виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми „Differential expression calculator". Дані, отримані з ампліфікатора, є показником інтенсивності флуоресценції на певному циклі реакції, що відповідає рівню накопичення дволанцюгового продукту реакції, зв'язаного із флуоресцентним барвником SybrGreen. При обчисленні дані виражають у координатах: логарифм значення інтенсивності

флуоресценції/номер циклу. За допомогою функції auto-threshold встановлюється порогова лінія, у якій аналізовані криві флуоресценції мають лінійний характер. Для кожної пари праймерів порогові значення обраховувалися окремо. Значення C(t), при яких криві флуоресценції перетинають порогову лінію, використовували для подальших обчислень.

Рівні експресії генів розраховували за формулою. Рівень експресії = E^(ΔC(t) контрольного гена - ΔC(t) досліджуваного гена), де: ΔC(t) контрольного гена = C(t) за експериментальних умов - C(t) за контрольних умов); ΔC(t) досліджуваного гена = (C(t) за експериментальних умов - C(t) за контрольних умов); E – ефективність ПЛР з використаною парою праймерів.

Статистичний аналіз результатів проводили як описано [211]. Результати виражали як M ± *m*. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$ [212].

РОЗДІЛ 3.
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика клітин гліоми з пригніченою активністю сигнального ензиму ERN1

В даній роботі були використані клітини гліоми лінії U87 та дві сублінії цих клітин трансфековані вектором pcDNA3.1, що містив конструкції модифікованого сенсорно-сигнального ензиму ERN1: dnERN1 (без обох ензиматичних активностей) та dnrERN1 (з мутантною ендорибонуклеазою). За рахунок своєї надекспресії в клітинах гліоми модифіковані конструкції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 призводили до витіснення нормальної форми сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

За індукції стресу ендоплазматичного ретикулума активується кіназна активність ERN1, яка забезпечує його автофосфорилювання, внаслідок чого відбувається його активація та димеризація в мембрані ендоплазматичного ретикулума, що призводить до активації ендорибонуклеази [213-215]. Основна функція ендорибонуклеази сенсорно-сигнального ензиму ERN1 полягає у вирізанні короткого фрагмента з кодуючої частини мРНК транскрипційного фактора XBP1 (протеїн-1, що зв’язується з Х-боксом), з утворенням вкороченого альтернативного сплайс-варіанта транскрипційного фактора XBP1 (XBP1s), який активує стрес-залежні гени.

Таким чином, ефективність пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми оцінювали по рівню фосфорильованої форми ERN1 та експресії альтернативного сплайс-варіанту мРНК XBP1 (XBP1s) за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, індукованого тунікаміцином. Як видно із даних, наведених на рис. 3.1.1.А, у контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором, тунікаміцин збільшує рівень як фосфорильованої по серину 724 форми ERN1, так і альтернативного сплайс-

варіанту мРНК XBP1, що кодує синтез ключового транскрипційного фактора ERN1 за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

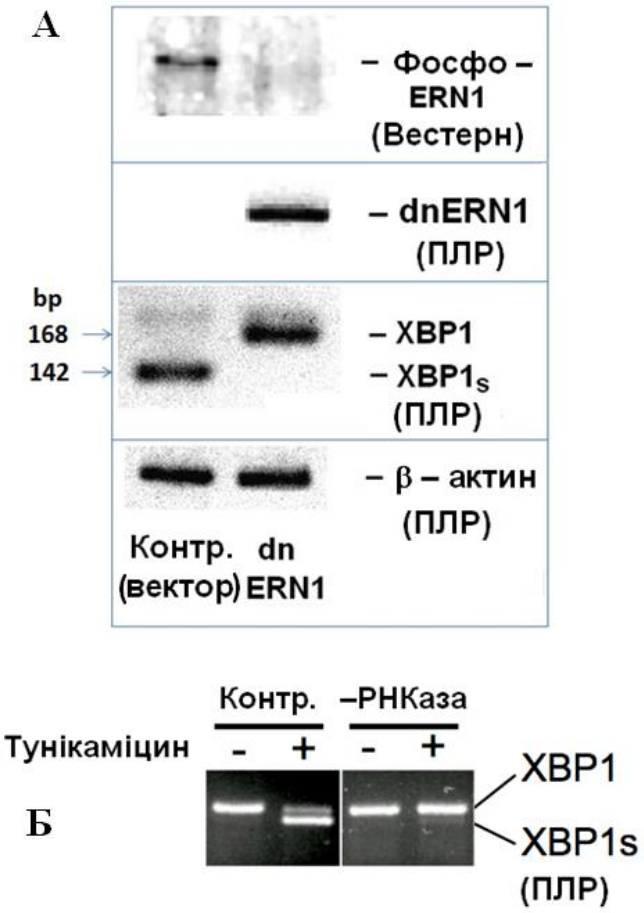


Рис. 3.1.1. Вплив тунікаміцину (0,01 мг/мл – 2 год) на:

А – рівень фосфорильованої форми ERN1 (фосфо-ERN1), визначеної за допомогою вестерн-блот аналізу, а також на рівень експресії мРНК домінант негативної конструкції ERN1 (dnERN1) і транскрипційного фактора (XBP1) та його альтернативного сплайс-варіанта (XBP1s) за даними полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі в клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (контр.), та в сублінії цих клітин, стабільно трансфікованих dnERN1-конструкцією;

Б – рівень експресії мРНК XBP1 та XBP1s у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих мутантною за ендорибонуклеазою конструкцією ERN1 (-РНКаза).

В той же час, у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ERN1, ефект тунікаміцину не

проявляється, що переконливо свідчить про відсутність у цих клітинах функціонально активної форми сенсорно-сигнального ензиму ERN1. У клітинах гліоми з мутантним по ендорибонуклеазі ензимом ERN1 також не було виявлено альтернативного сплайс-варіанту мРНК XBP1 за умов індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином (Рис. 3.1.1.Б).

Було показано, що виключення гена ERN1 впливає на ріст гліомних клітин. На рисунку 3.1.2. продемонстровано, що швидкість проліферації клітин в культурі, що експресує dnERN1, є у два рази нижчою в порівнянні з контрольними клітинами гліоми лінії U87. Крім того, швидкість проліферації клітин гліоми з мутантним ERN1 тільки за ендорибонуклеазою зменшується більш, ніж в п’ять разів. Таким чином, блокада ендорибонуклеазної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 має більш сильний вплив на швидкість проліферації клітин гліоми лінії U87, ніж блокування обох активностей цього ензиму.

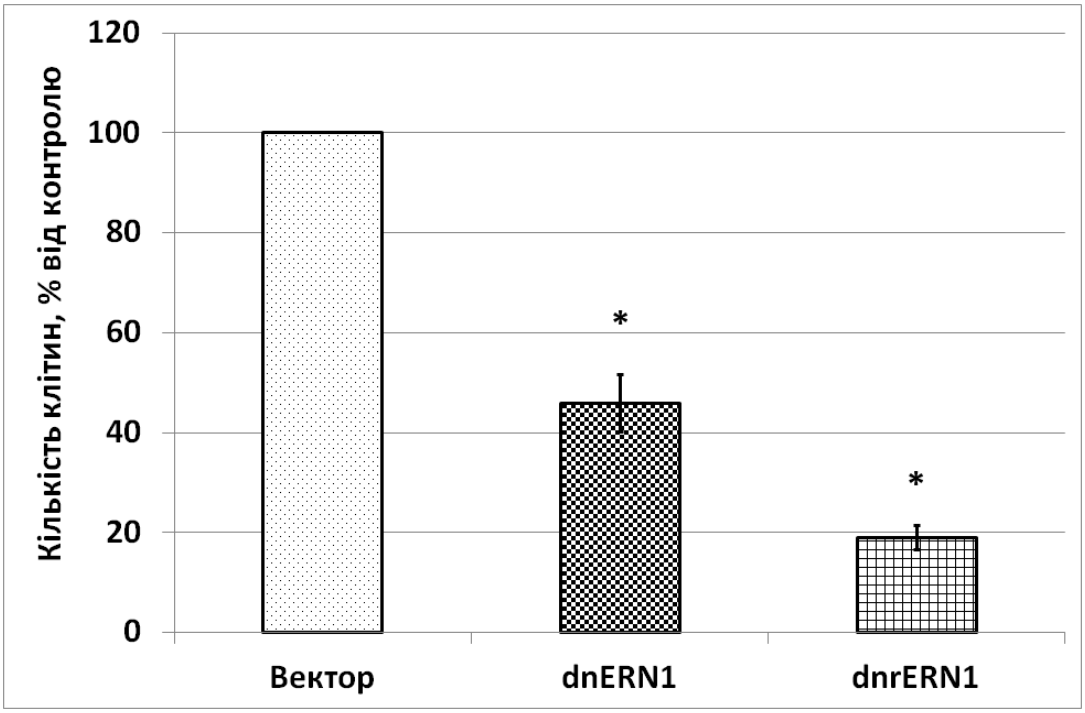


Рис. 3.1.2. Ріст клітин гліоми лінії U87, трансфікованих вектором, та в сублініях цих клітин із пригніченою функцією ERN1, трансфікованих dnERN1 (без ензиматичної активності) та dnrERN1 (з мутантною ендорибонуклеазою).

3.2. Експресія генів TP53, USP7, MDM2 та PERP у клітинах з пригніченою функцією ензиму ERN1

Для дослідження впливу повного виключення функції сигнального ензиму ERN1 на експресію *TP53* та залежних від нього протеїнів USP7, MDM2 та PERP було виміряно експресію мРНК цих генів в гліомних клітинах лінії U87, трансфекованих вектором з dnERN1. За результатами, представленими на рисунку 3.2.1, бачимо підвищення рівня експресії мРНК гена *TP53* більш, ніж у два рази. Також спостерігаємо підвищення рівня експресії мРНК *USP7* (на 35%) та зниження в два рази рівня експресії мРНК генів *MDM2* та *PERP*.

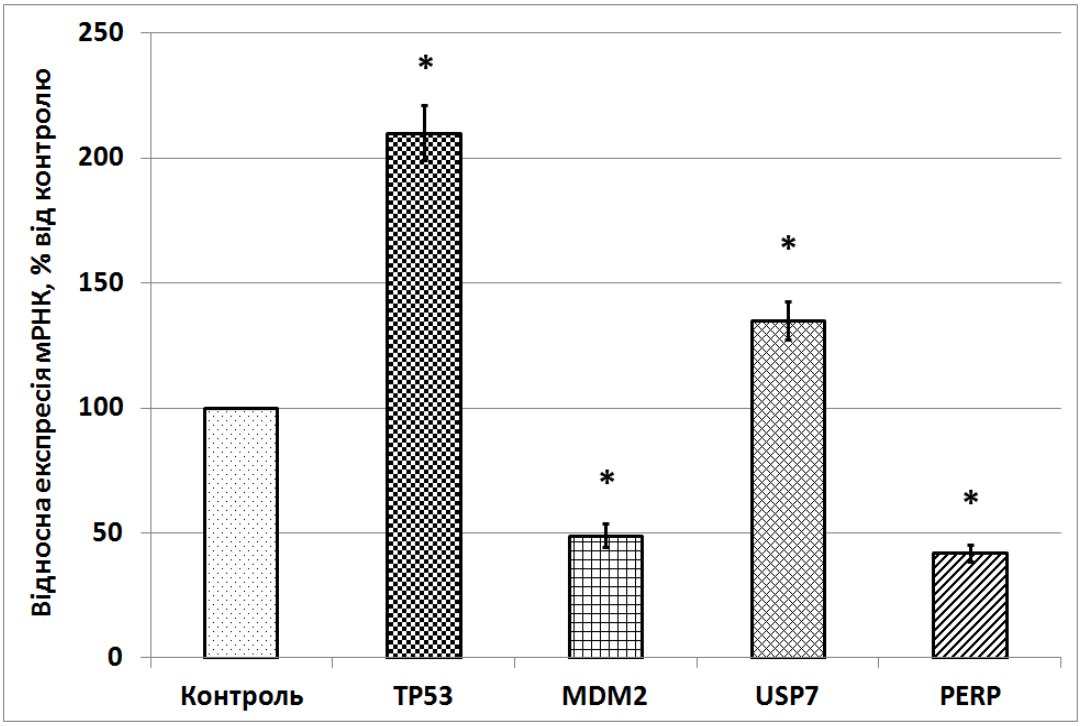


Рис. 3.2.1. Рівень експресії мРНК *TP53* та асоційованих з ним генів – *MDM2*, *USP7* і *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Таким чином, спостерігаємо чітку кореляцію між підвищеним рівнем експресії мРНК гена *TP53* та зниженим рівнем експресії мРНК гена *MDM2*, який є негативним регулятором *TP53* та ініціює його деградацію, а також зниженим рівнем експресії мРНК гена *PERP*, який є ефекторним геном для *TP53* та задіяний в розвитку апоптозу. Підвищення рівня експресії мРНК гена *TP53* також узгоджується з посиленою експресією гена *USP7*, який відповідає за деубіквітинацію TP53 і таким чином індукує залежний від *TP53* апоптоз і пригнічення росту пухлини.

Було встановлено, що виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 впливає на експресію *TP53* та залежних від нього генів, а тому наступним етапом ми вирішили дослідити яка саме активність сенсорно-сигнального ензиму ERN1: кіназна чи ендорибонуклеазна зумовлює цей вплив. Для цього було використано сублінію клітин гліоми з конструкцією dnrERN1 (з мутантною ендорибонуклеазою).

За даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі рівень експресії мРНК *TP53* за умови виключення ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1 (dnrERN1) в порівнянні з контролем підвищується (на 15%). При цьому підвищення експресії є значно нижчим, ніж при виключені обох ензиматичних активностей сенсорно - сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) (на 45%), що свідчить про можливу залежність експресії TP53 саме від кіназної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (рис. 3.2.2.).

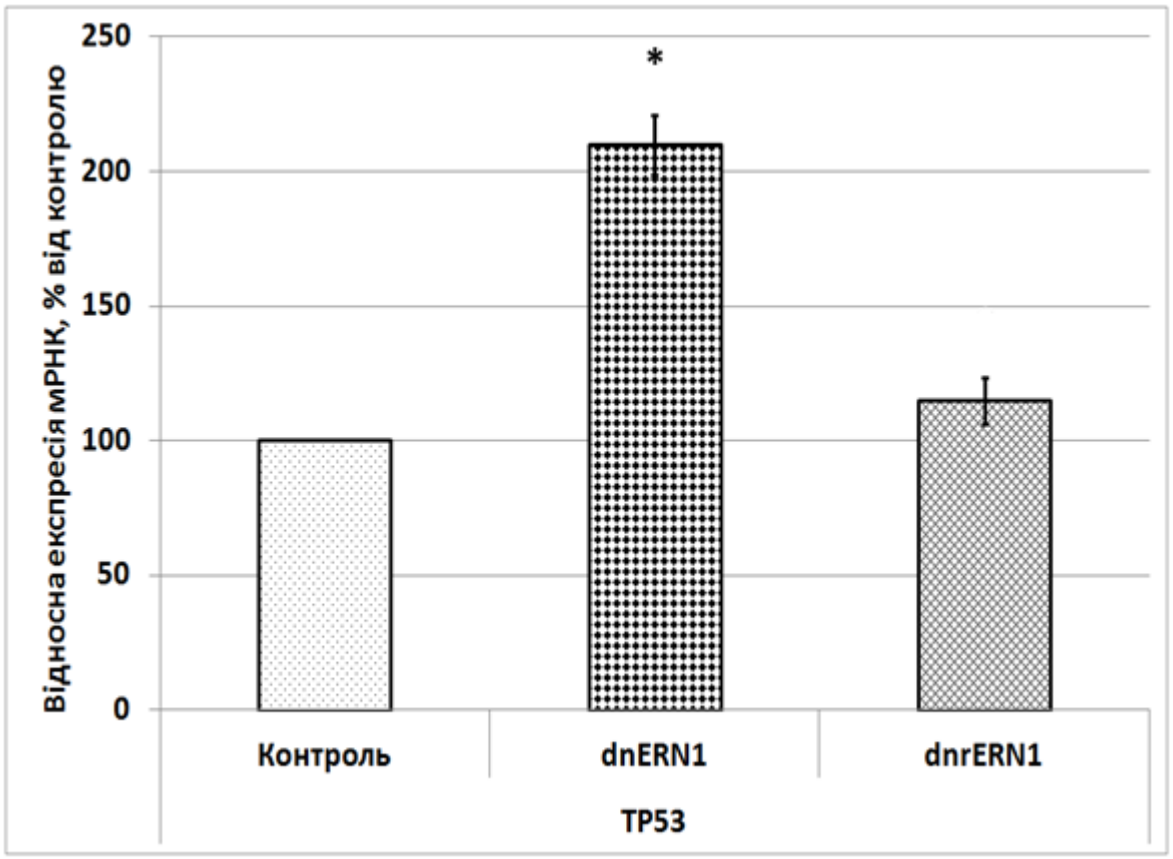


Рис. 3.2.2. Рівень експресії мРНК *TP53* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) та домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Дослідження експресії мРНК *MDM2* показало (рис. 3.2.3.), що виключення лише ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1 призводить до її підвищення у клітинах гліоми, у порівнянні з контролем (на 11%). До того ж, порівнюючи результат з експресією даного гена за умов повного виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 з контролем, спостерігаємо зниження рівня експресії більше, ніж у два рази. Тобто експресія даного гена, також показує можливу залежність саме від кіназної активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1.

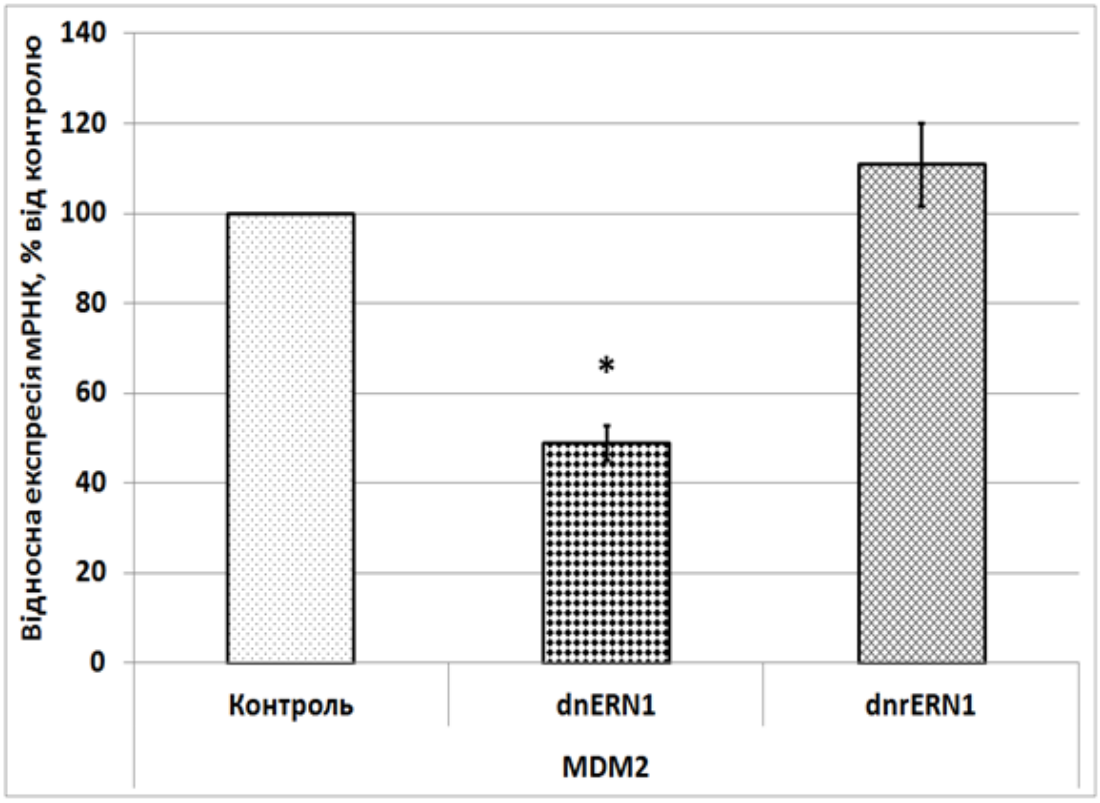


Рис. 3.2.3. Рівень експресії мРНК *MDM2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) та домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

При виключенні обох ензиматичних активностей сенсорно - сигнального ензиму ERN1 ми спостерігали підвищення експресії гена *USP* у клітинах гліоми (на 35%). Але виключення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму має протилежнй вплив – воно призводить до зниження експресії гена *USP7* (на 9%). Отримані результати свідчять, що експресія данного гена, також має залежність від кіназної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1. (рис. 3.2.4)

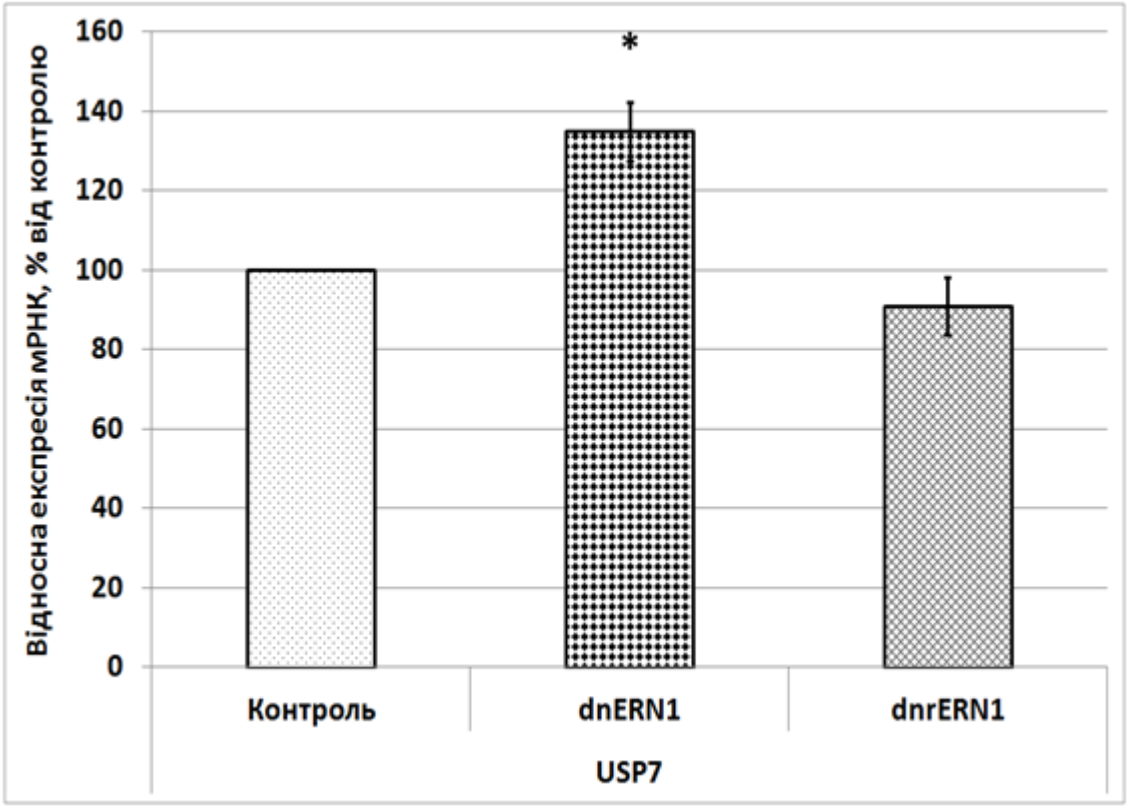


Рис. 3.2.4. Рівень експресії мРНК *USP7* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) та домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

При виключенні обох ензиматичних активностей сенсорно - сигнального ензиму ERN1 ми спостерігали зниження експресії гена *PERP* більше ніж у два рази. Але виключення лише ендорибонуклеазної активності цього ензиму призводить до значного збільшення експресії гена *PERP* – більш ніж у шість разів, тому виходячи з отриманих даних можна сказати, що експресія данного гена залежить як від кіназної так і від ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1. (Рис. 3.2.5).

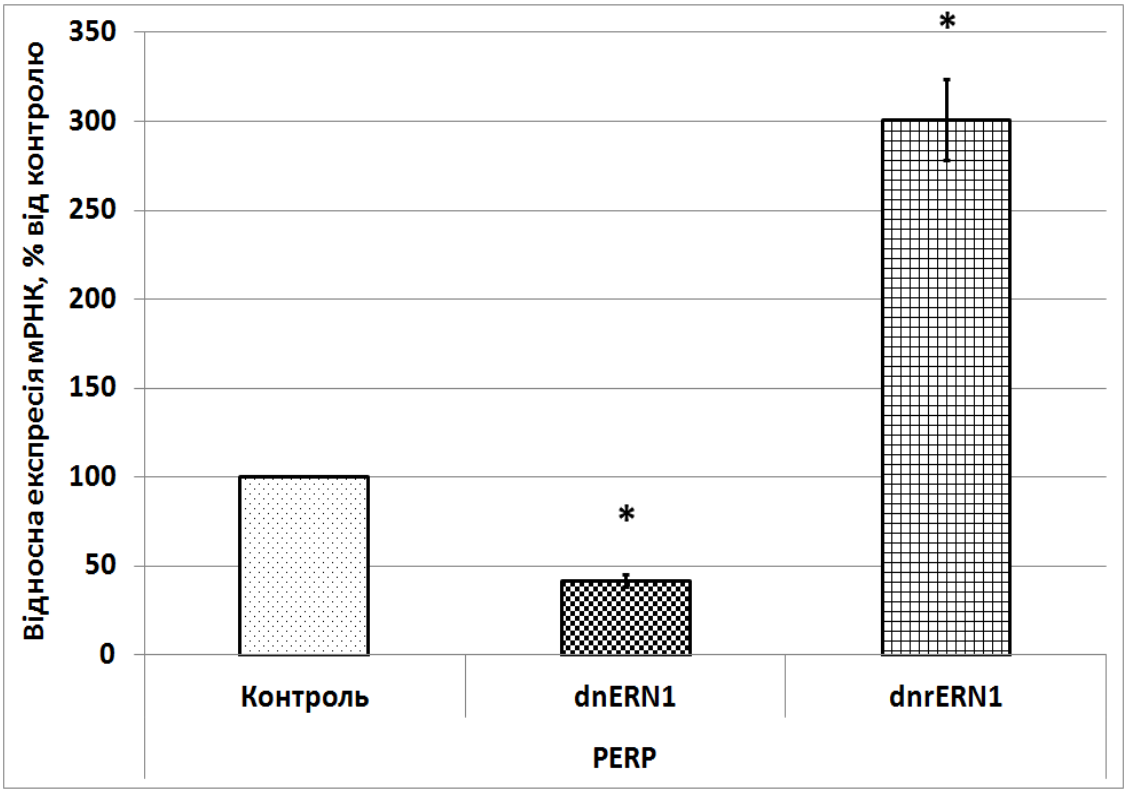


Рис. 3.2.5. Рівень експресії мРНК *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією ензиму ERN1 (dnERN1) та домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Було встановлено, що виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 впливає також і на експресію TP53-залежних генів. Оскільки ERN1 – це головний сенсорно-сигнальний ензим стресу ендоплазматичного ретикулума, то було проведено дослідження чи буде змінюватись експресія генів за умов стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліоми з пригніченою активністю ендорибонуклеази. В якості індуктора стресу ендоплазматичного ретикулума було використано тунікаміцин.

Отримані для гена *TP53* результати показали, що індукція стресу ендоплазматичного ретикулума призводить до значного підвищення (у чотири рази) експресії цього гена у клітинах гліоми лінії U87 з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ензиму ERN1, це підвищеня обумовлене реакцією клітини на стресовий чинник (рис. 3.2.6).

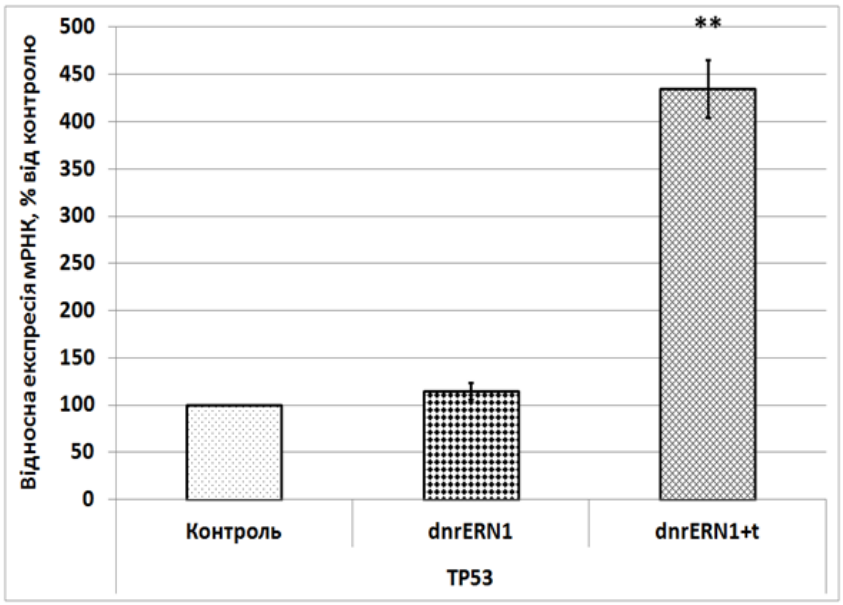


Рис. 3.2.6. Рівень експресії гена *TP53* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), трансфекованих домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), а також у клітинах з конструкцією dnrERN1 з додаванням тунікаміцину (dnrERN1+t) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами трансфекованими dnrERN1.

Встановлено, що при індукції тунікаміцином стресу ендоплазматичного ретикулума відбувається підвищення рівня експресії мРНК *MDM2* (на 32%) за умов пригнічення ендорибонуклеазної активності ERN1 (Рис. 3.2.7). Отримані результати узгоджуються з літературними данними про існування негативного зворотнього зв'язку між TP53 та MDM2. Як відомо MDM2 блокує транскрипційну активність TP53, сприяє його експорту з ядра та стимулює його деградацію, але MDM2 також є і транскрипційною мішенню TP53, таким чином утворюючи негативний зворотній зв'язок.

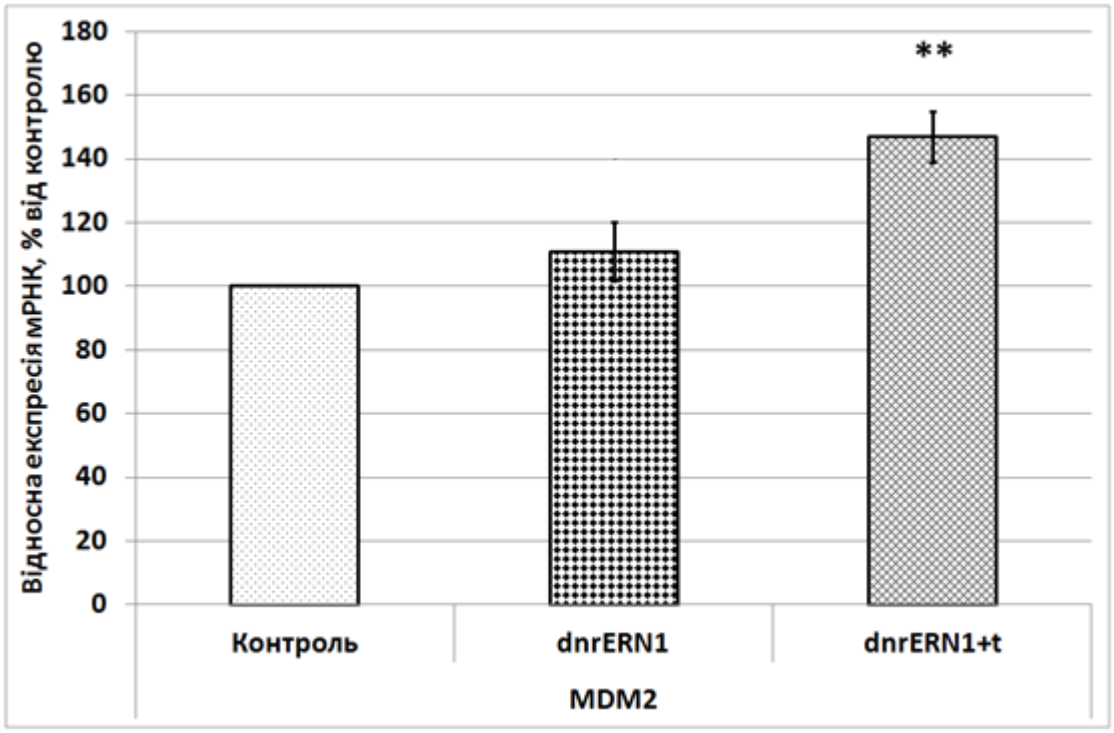


Рис. 3.2.7. Рівень експресії гена *MDM2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), трансфекованих домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), а також у клітинах з конструкцією dnrERN1 з додаванням тунікаміцину (dnrERN1+t) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами трансфекованими dnrERN1.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для гена *USP7* було показано, що індукція стресу ендоплазматичного ретикулума призводить до значного зниження експресії цього гена в клітинах гліоми лінії U87 за умови виключення ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 (на 34%) (рис. 3.2.8). Зниження експресії данного гена також може впливати на підвищення експресії гена *MDM2*.

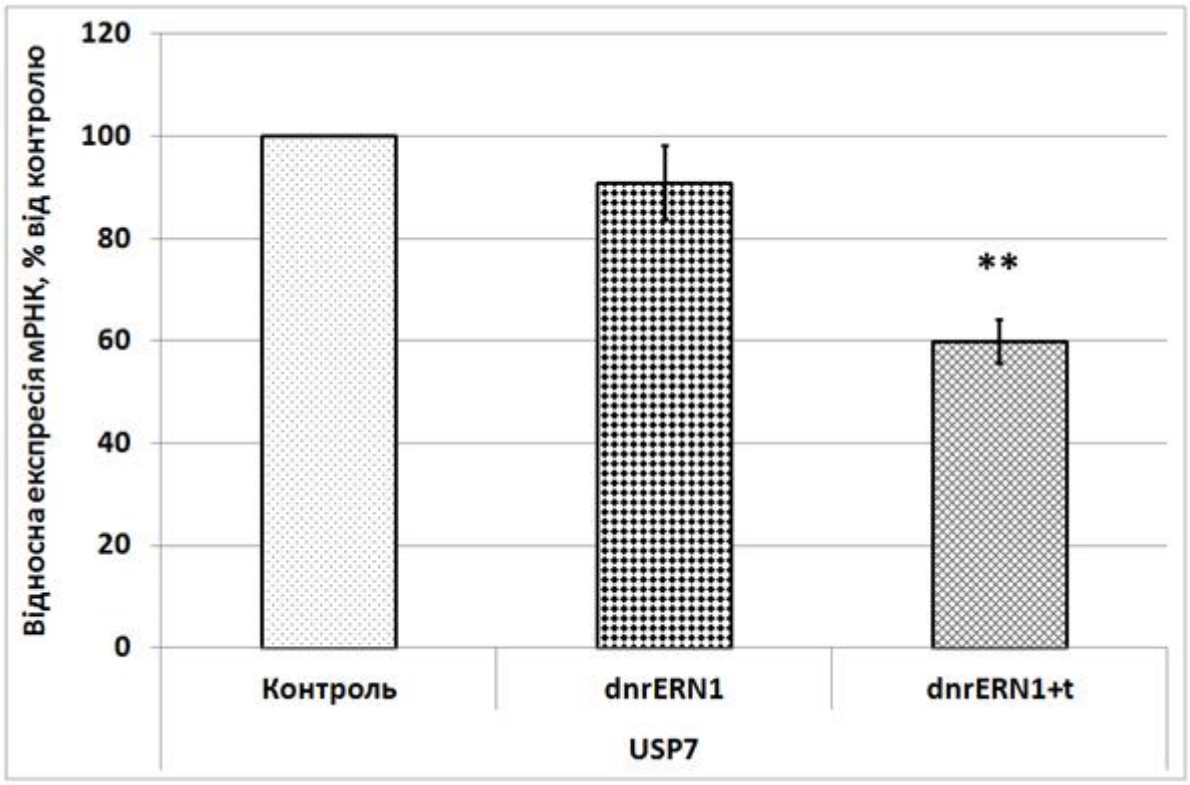


Рис. 3.2.8. Рівень експресії гена *USP7* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), трансфекованих домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), а також у клітинах з конструкцією dnrERN1 з додаванням тунікаміцину (dnrERN1+t) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами трансфекованими dnrERN1.

Отримані для гена *PERP* результати показують, що індукція стресу ендоплазматичного ретикулума призводить до зниження експресії цього гена (на 30%) у клітинах гліоми лінії U87 за умови пригнічення ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1 (рис. 3.2.9).

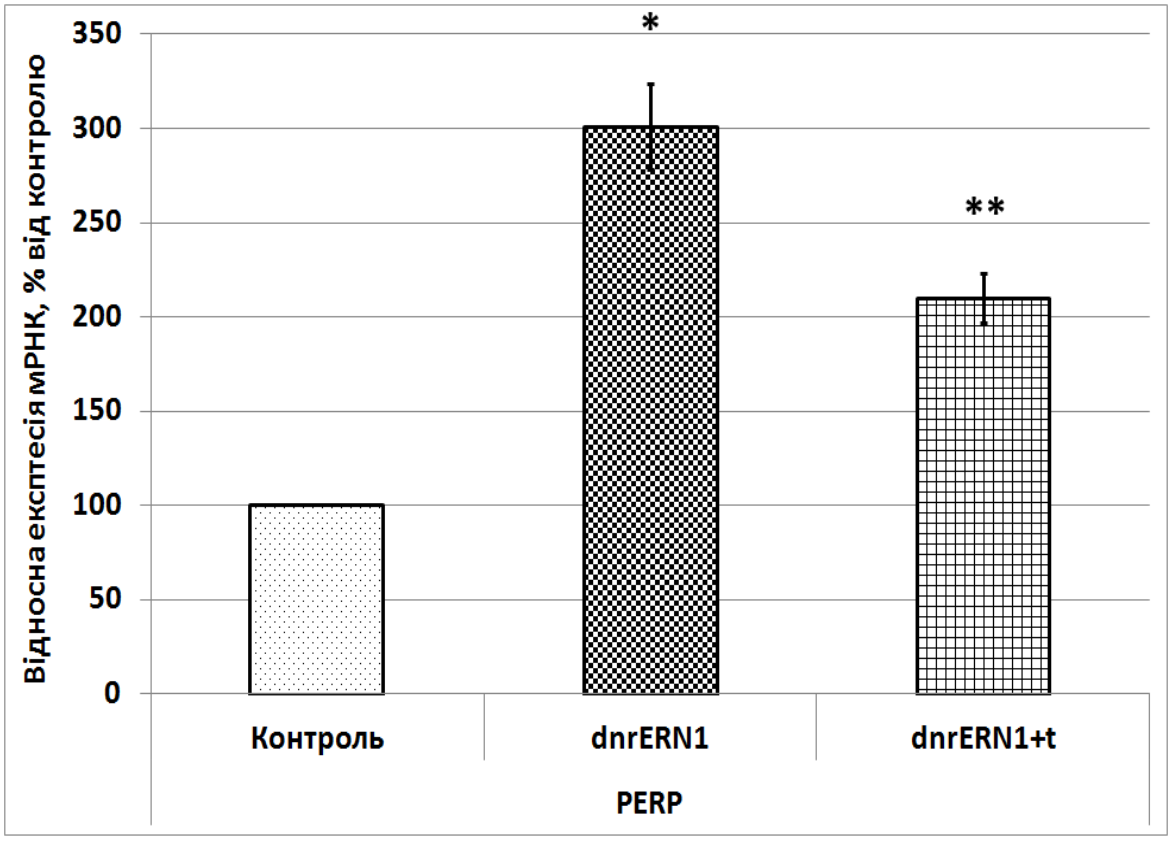


Рис. 3.2.9. Рівень експресії гена *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), трансфекованих домінант-негативною за ендорибонуклеазною конструкцією ензиму ERN1 (dnrERN1), а також у клітинах з конструкцією dnrERN1 з додаванням тунікаміцину (dnrERN1+t) за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем, ** – $P < 0,05$ при порівнянні з клітинами трансфекованими dnrERN1.

3.3. Експресія генів *TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2, POLO1, ZMAT3, RBL1, CSNK2* у клітинах гліоми за умов пригнічення сигнального ензиму ERN1

Було показано, що виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 впливає на експресію TP53 та залежних від нього генів USP7, MDM2 та PERP. Для більш глибого розуміння впливу сенсорно - сигнального ензиму ERN1 на функціонування TP53 було досліджено експресію низки інших генів, які умовно можна розділити на такі групи: інгібітори *TOPORS, POLO1*і *NME6*; активатори *CSNK2, TP53BP1* і *TP53BP2*; ефектори *RBL1 і ZMAT3*.

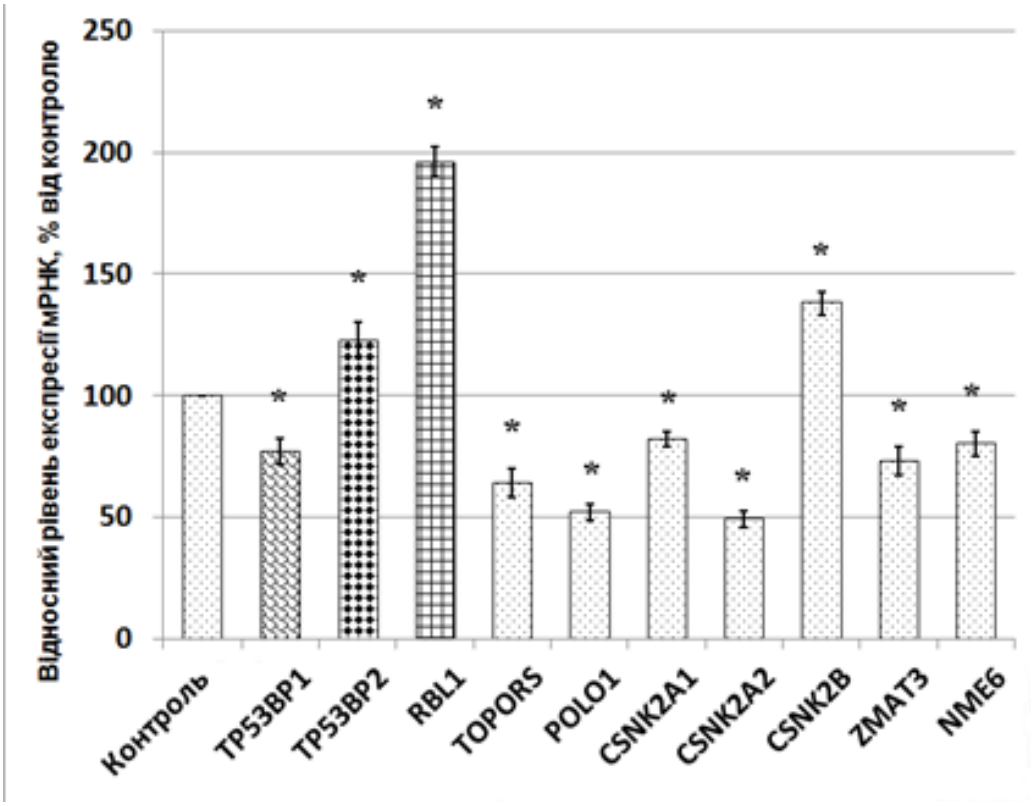


Рис. 3.3.1 Експресія мРНК *POLO1, TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2, CSNK2, RBL1* і *ZMAT3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Контроль), а також стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією сенсорно - сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі. Рівень експресії мРНК досліджуваних генів нормалізували по експресії β-актину і виражали у відсотках від контролю (100%). n = 4; * – $P < 0,05$ при порівнянні з контролем.

Щоб дослідити вплив сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума на рівні експресії *TP53*-залежних генів, було використано гліомні клітини сублінії U87, які стабільно експресують мутантну домінант-негативну конструкцію ERN1. На рисунку 3.3.1 показано, що інгібування функції гена *ERN1* в клітинах гліоми лінії U87 впливає на експресію *TP53*-залежних генів, а саме підвищення експресії гена *RBL1* (майже вдвічі) і активатора TP53 –*TP53BP2* (на 23%) та зниження експресії генів *TOPORS* (на 46 %), *NME6* (на 20%), *POLO1* (на 48 %), *TP53BP1* (на 23%) і *ZMAT3* (на 27 %).

Таким чином, інгібування функції гена *ERN1* у клітинах гліоми лінії U87 змінює експресію всіх досліджених *TP53*-залежних генів, але гено-специфічно у напрямку стабілізації протеїну TP53 та посилення його біологічної дії.

3.4. Експресія генів *TP53, USP7, MDM2, PERP, TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2, ZMAT3, POLO1, RBL1* та *CSNK2* у клітинах гліоми за умови впливу гіпоксії в залежності від функції ензиму ERN1

Гіпоксія є характерною рисою більшості злоякісних пухлин і тісно пов’язана не лише з їх ростом, але і з метастазуванням та резистентністю до лікування [180-183]. Гіпоксія виражено активує процеси проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу і пентозофосфатного шляху, через що пухлинні клітини характеризуються посиленим гліколізом та високим рівнем лактату і пірувату. Так, з літературних джерел відомо, що тиск кисню у деяких типах злоякісних пухлин коливається у межах 0-20 мм Hg (0-2,8%), що значно нижче, ніж у нормальних тканинах, які розташовані поруч: 24-60 мм Hg (3,36-8,4%). У середньому, рівень кисню в нормальних тканинах коливається в межах близько 7%, а у злоякісних пухлинах - не більше 1,5%.

Гіпоксія є сильним індуктором стресу для клітини, що запускає каскад реакцій направлених на виживання та, у випадку неспроможності клітини справитись зі стресом, на апоптоз. Гіпоксія клітин також викликає додаткові

HIF-1 незалежні адаптивні відповіді, що сприяють підвищенню виживання клітин в умовах низького рівня кисню. Швидка реакція на вплив гіпоксії призводить до загального зниження темпів синтезу протеїнів для зниження потреб в енергії за умов низького рівня кисню та АТФ [178].

Гіпоксія є потужним індуктором стресу ендоплазматичного ретикулума, викликаючи порушення його гомеостазу та нормального функціонування. За цього стану відбувається акумулювання незгорнутих чи помилково згорнутих протеїнів в просвіті ендоплазматичного ретикулума. Відновлення гомеостазу ендоплазматичного ретикулума має важливе значення для виживання клітин.

Зважаючи на велике значення гіпоксії для росту злоякісних пухлин, нами було проведено дослідження того, як змінюється експресія мРНК *TP53* та залежних від нього генів при виключенні функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в умовах гіпоксії. В ході даного експерименту клітини культивували при низькому рівні кисню (3% кисню, 5% вуглекислого газу та 92% азоту) протягом 16 годин в інкубаторі при 37^0C.

В результаті проведеного дослідження було показано, що рівень мРНК *TP53* у контрольних клітинах (Вектор) за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі знижується за умов гіпоксії (на 14%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК *TP53* проявляє чітку резистентність до стану гіпоксії (рис. 3.4.1).

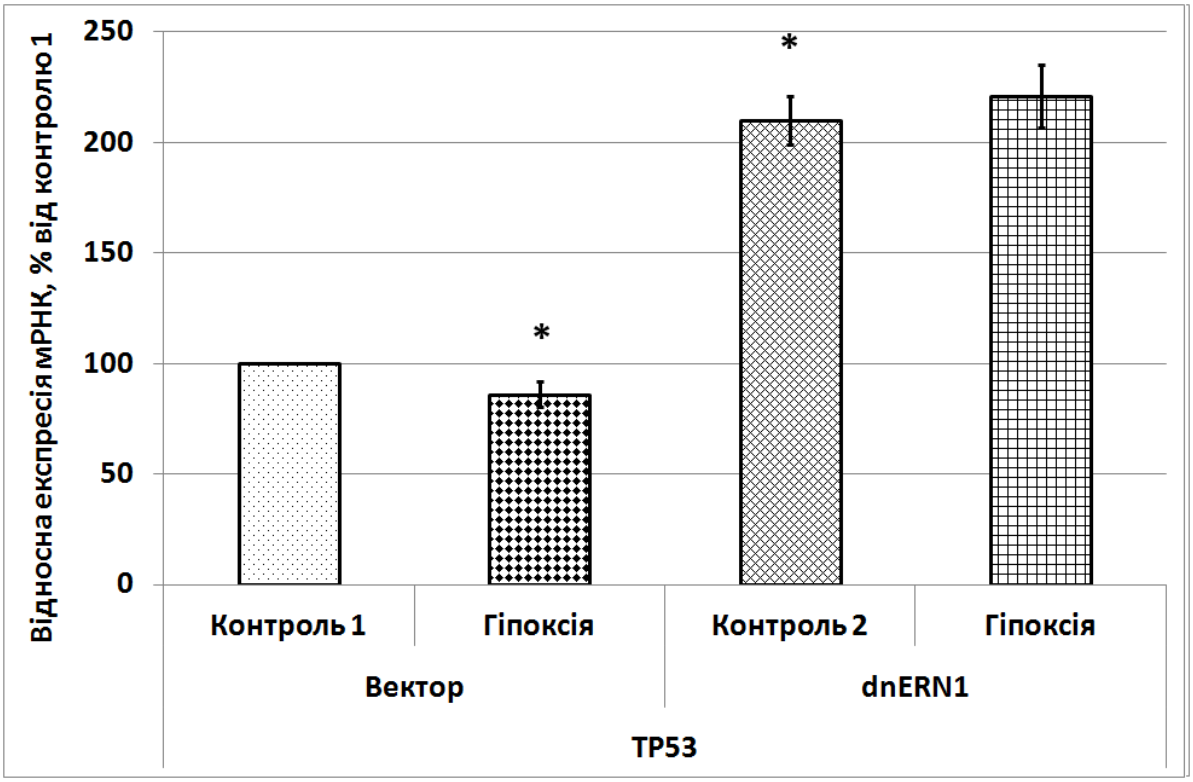


Рис. 3.4.1. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *TP53* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Для того, щоб перевірити чи виявлені зміни в рівні експресії гена *TP53* обумовлюють зміни рівня протеїну, що кодується ним, було проведено вестерн-блот аналіз екстрактів із клітин гліоми з антитілами проти TP53 (рис. 3.4.2). Отримані результати показали, що зміни в рівні експресії мРНК *TP53* узгоджуються зі змінами в рівні протеїну TP53.

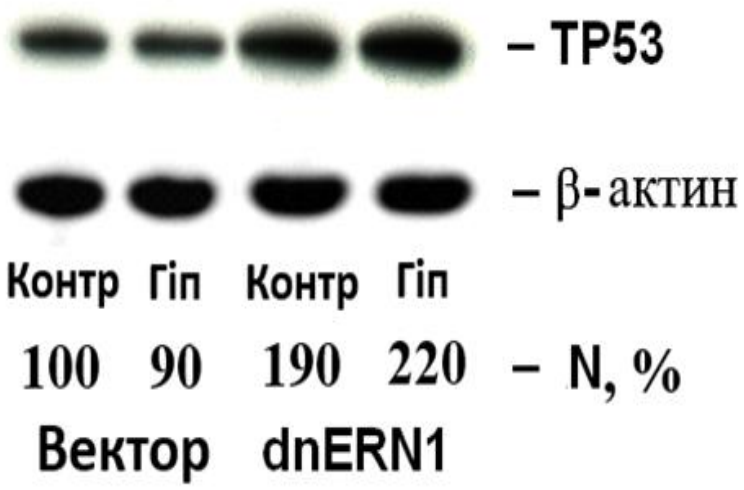


Рис. 3.4.2. Рівень протеїну TP53 у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) і її сублінії з пригніченою функцією сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) за умов гіпоксії. Контр – контроль; Гіп – Гіпоксія. N – кількісна оцінка рівня TP53, що була нормалізована по β-актину і виражена у відсотках від контролю (100%).

Встановлено, що рівень мРНК гена *USP7* у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) знижується за умов гіпоксії за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі (на 13%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *USP7* проявляє резистентність до стану гіпоксії (рис. 3.4.3).

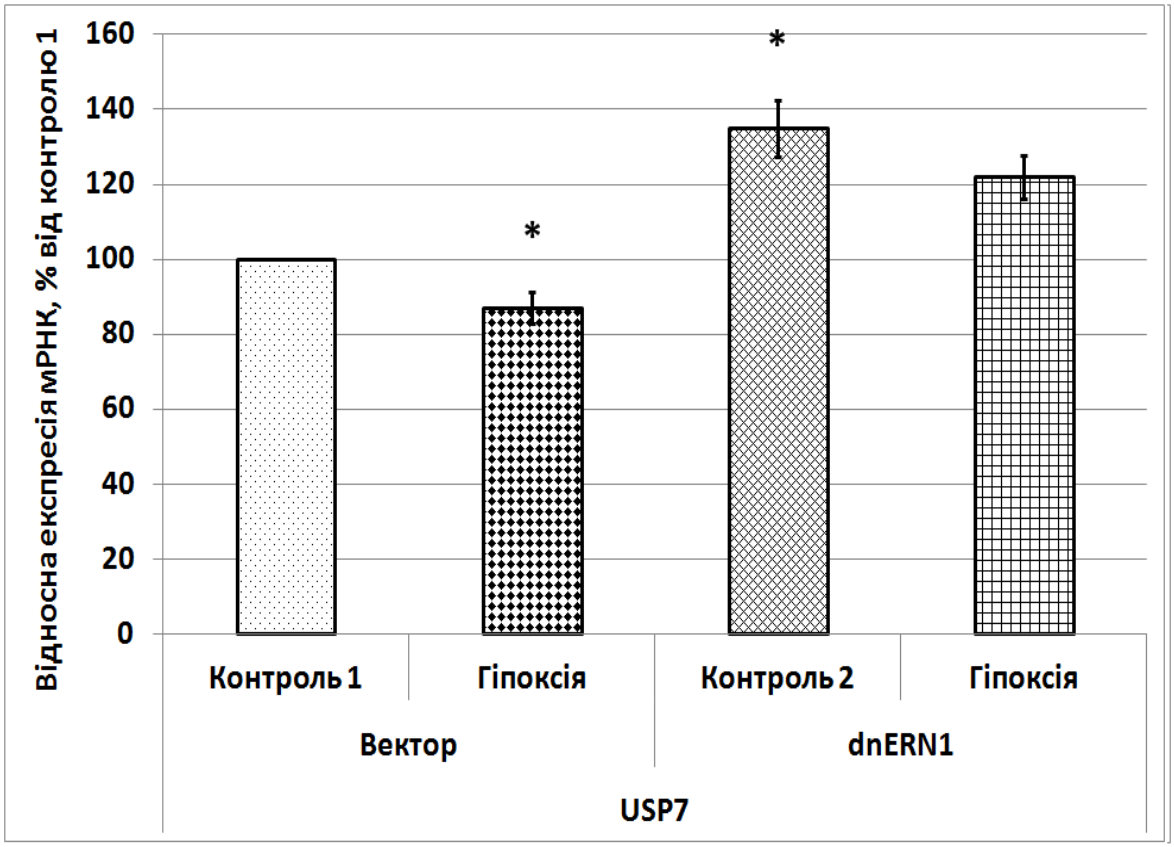


Рис. 3.4.3 Вплив гіпоксії на експресію мРНК *USP7* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *USP7* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Також показано, що гіпоксія підвищує експресію гена *MDM2* майже у два рази в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1.

Таким чином, бачимо чіткий ефект впливу гіпоксії на експресію гена *MDM2*, який не залежить від пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума (рис. 3.4.4).

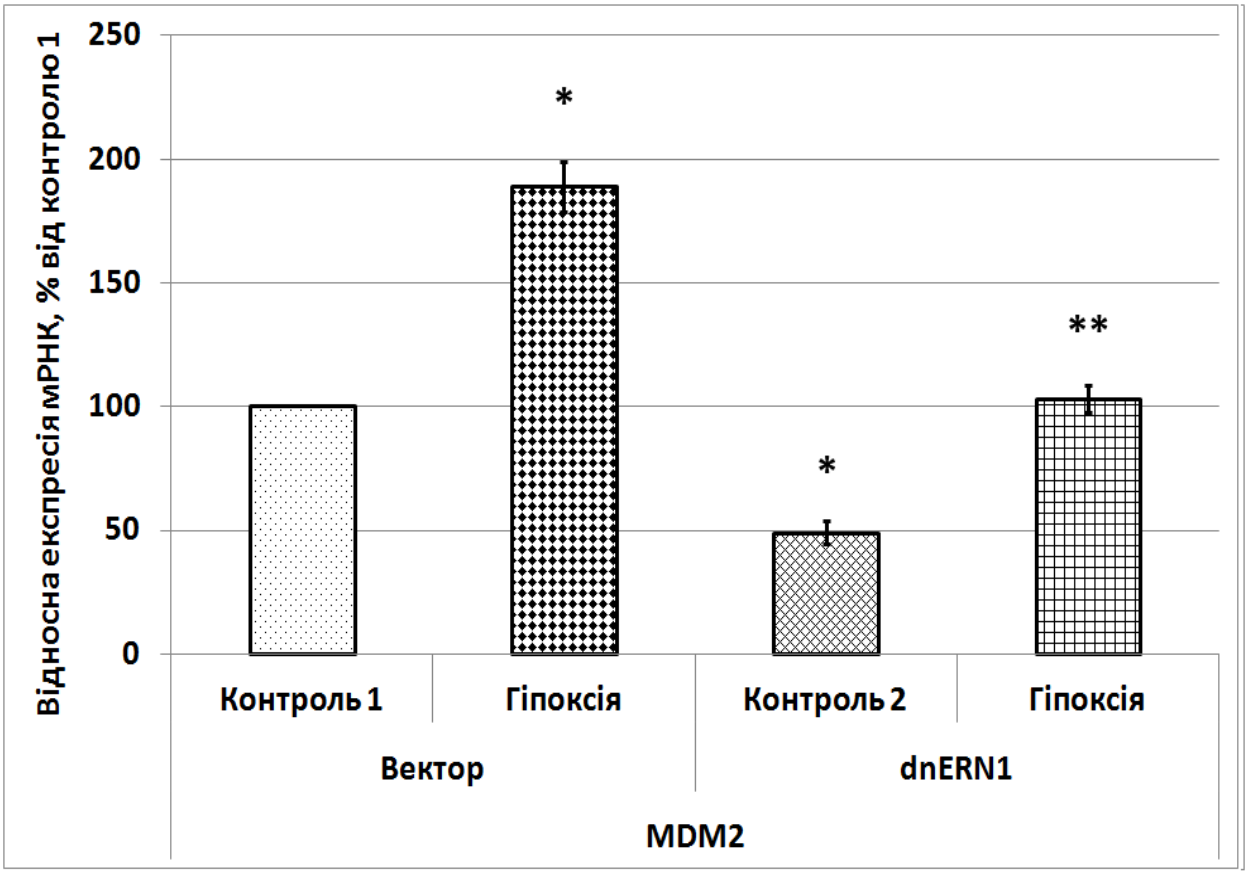


Рис. 3.4.4. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *MDM2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *MDM2* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень експресії мРНК гена *PERP* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за умов гіпоксії підвищується в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 51%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 81%) (рис. 3.4.5).

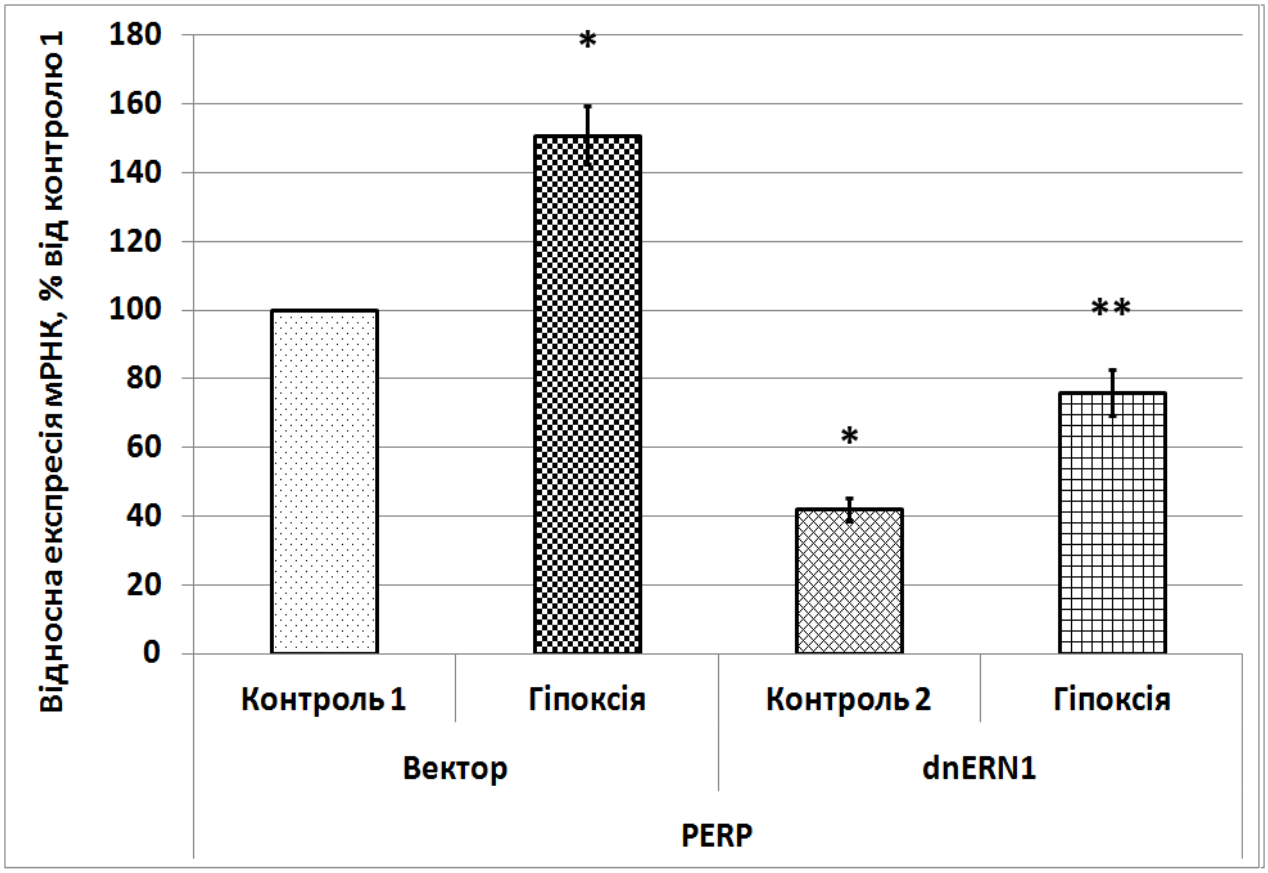


Рис. 3.4.5. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *PERP* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Було виявлено, що рівень експресії мРНК *POLO1* значно знижений (-39 %) за умов гіпоксії у контрольних клітин гліоми лінії U87 (трансфекованих вектором pcDNA3.1), а за умов пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума вплив гіпоксії на експресії гена *POLO1* елімінується (рис. 3.4.6).

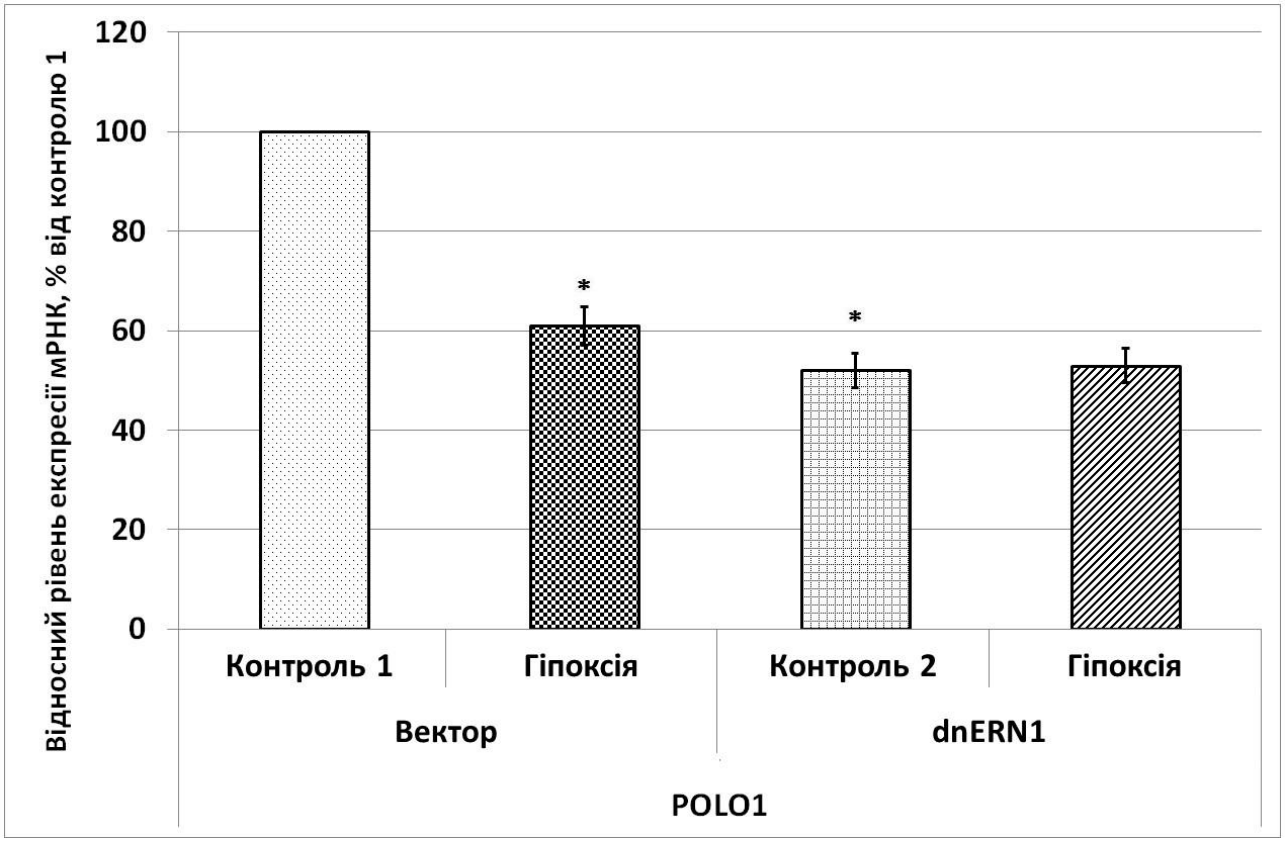


Рис. 3.4.6. Вплив гіпоксії на експресію мРНК POLO1 у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК POLO1 нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *NME6* знижені за умов гіпоксії в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 34%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 36%), з чого можна зробити висновок, що пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума за умови гіпоксії істотно не впливає на експресію цього гена (рис. 3.4.7).

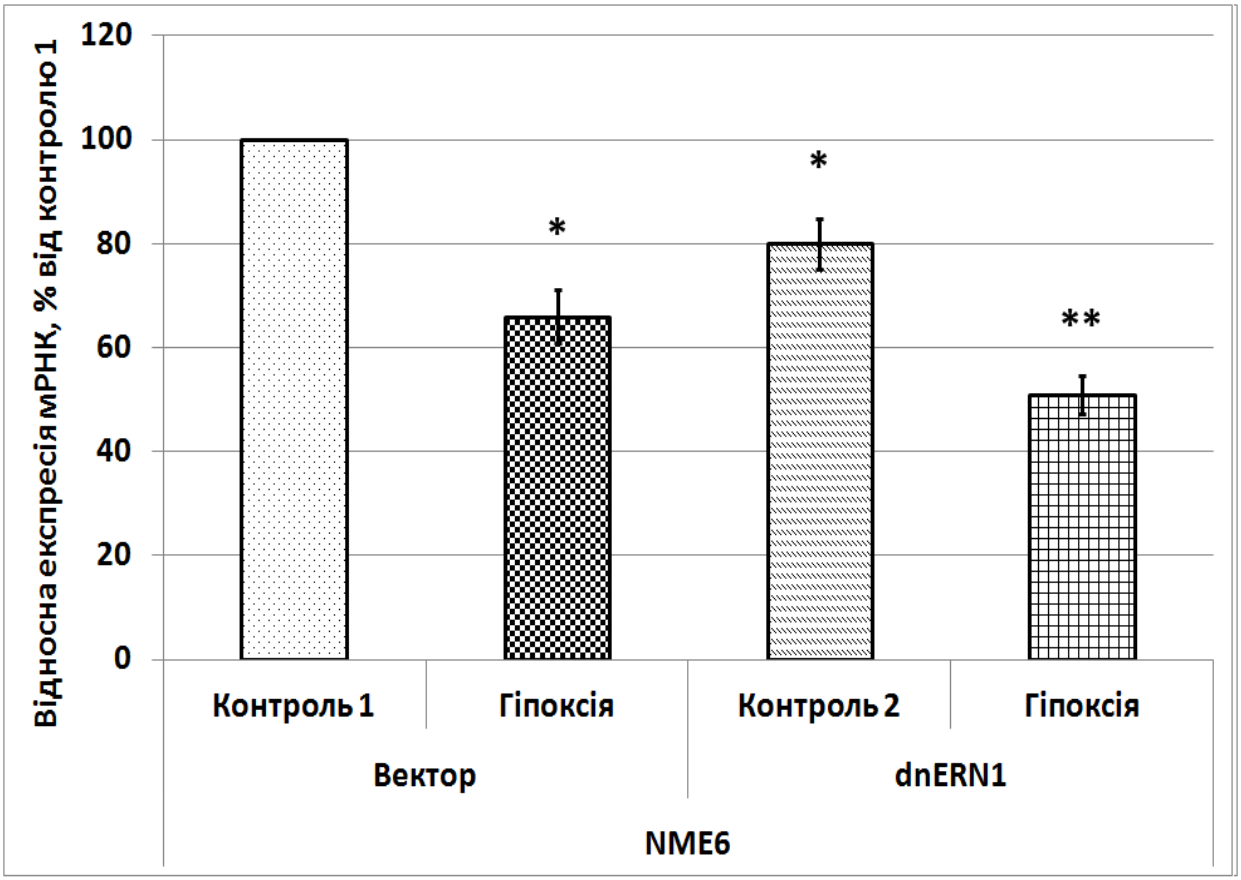


Рис. 3.4.7. Вплив гіпоксії на експресію мРНК NME6 у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК NME6 нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Досліджено, що гіпоксія значно знижує експресію мРНК гена *TOPORS*, в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 19%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 47%) (рис. 3.4.8.).

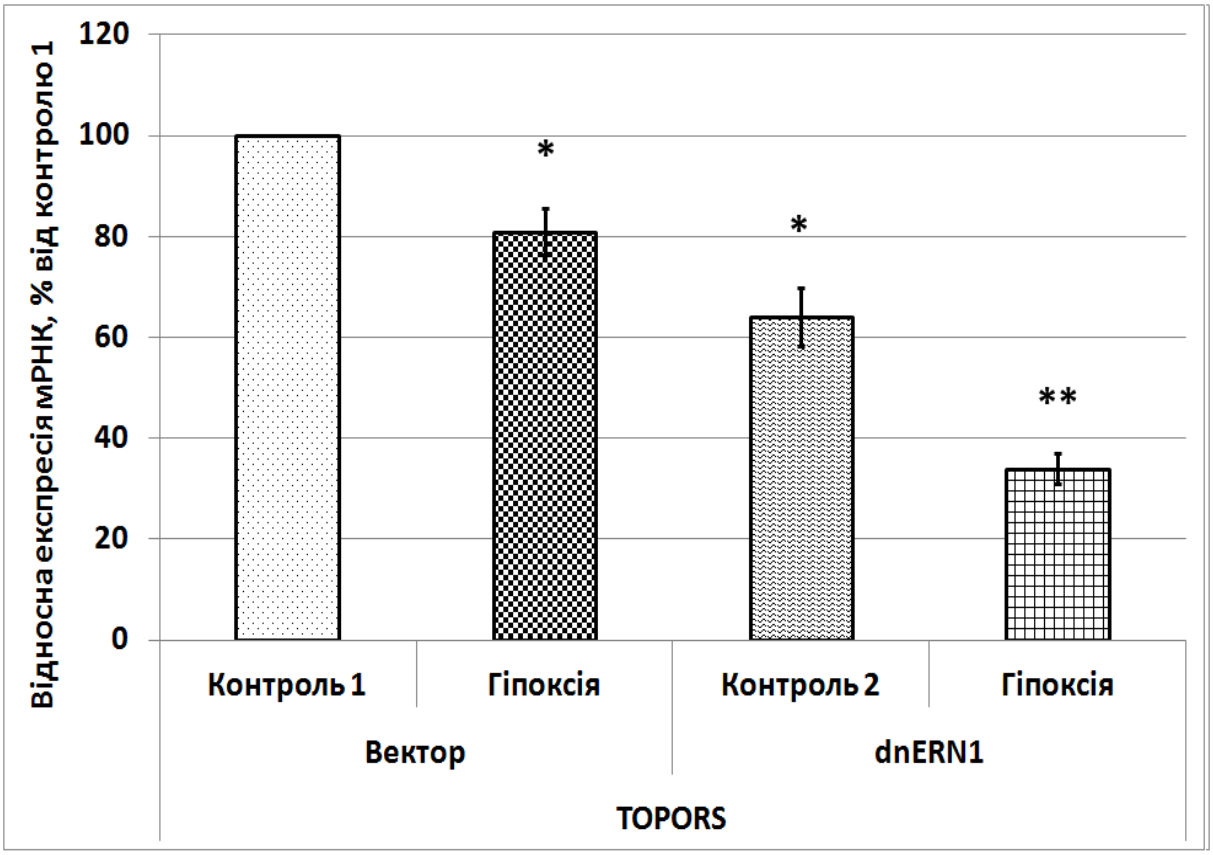


Рис. 3.4.8. Вплив гіпоксії на експресію мРНК TOPORS у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК TOPORS нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *TP53BP1* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі проявляє резистентність до стану гіпоксії у контрольних клітинах (Вектор). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *TP53BP1* показує невелике, але статистично значиме збільшення експресії (на 21%) (рис. 3.4.9.).

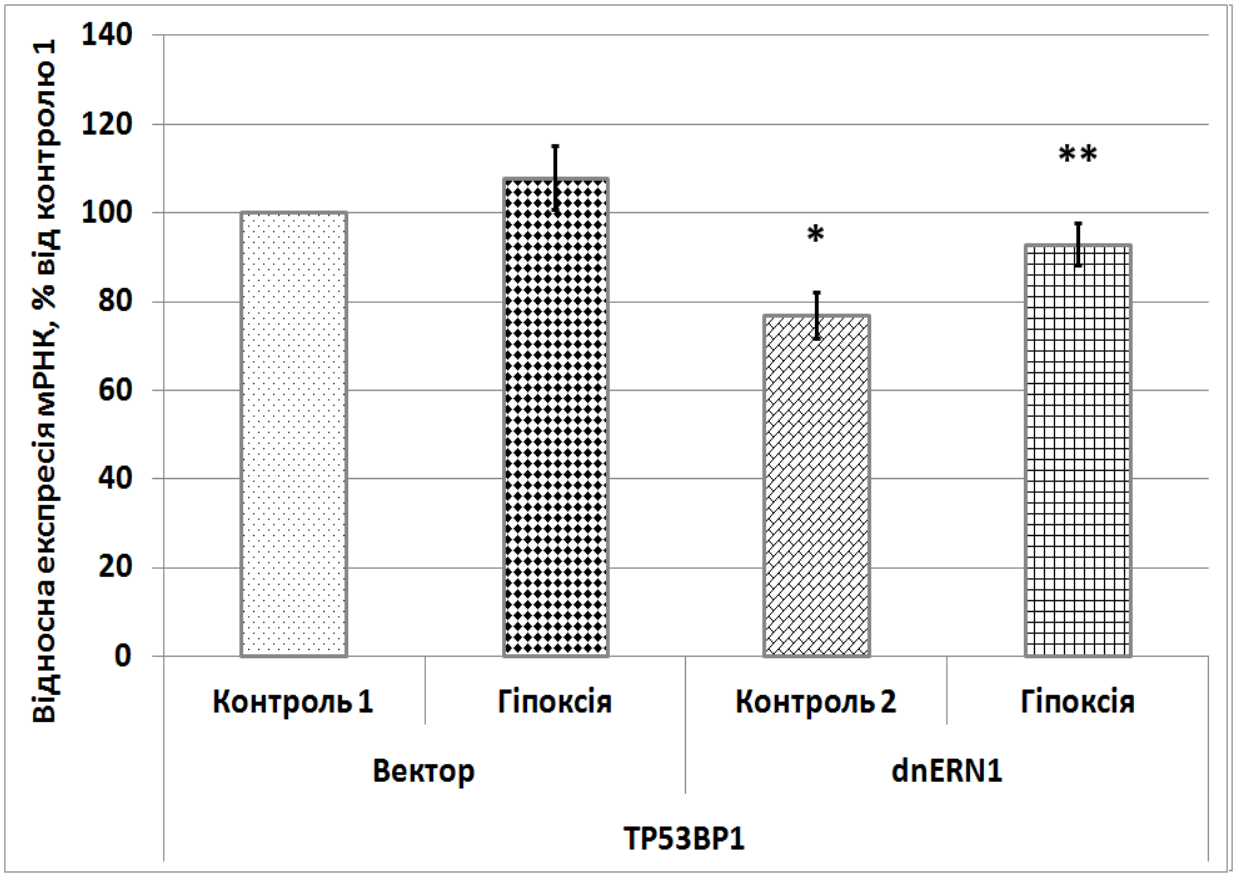


Рис. 3.4.9. Вплив гіпоксії на експресію мРНК TP53BP1 у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК TP53BP1 нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *TP53BP2* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі підвищується за умов гіпоксії у обох типах клітин: у контрольних клітинах (Вектор) (на 68%), за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *TP53BP2* посилюється майже у три рази (рис. 3.4.10).

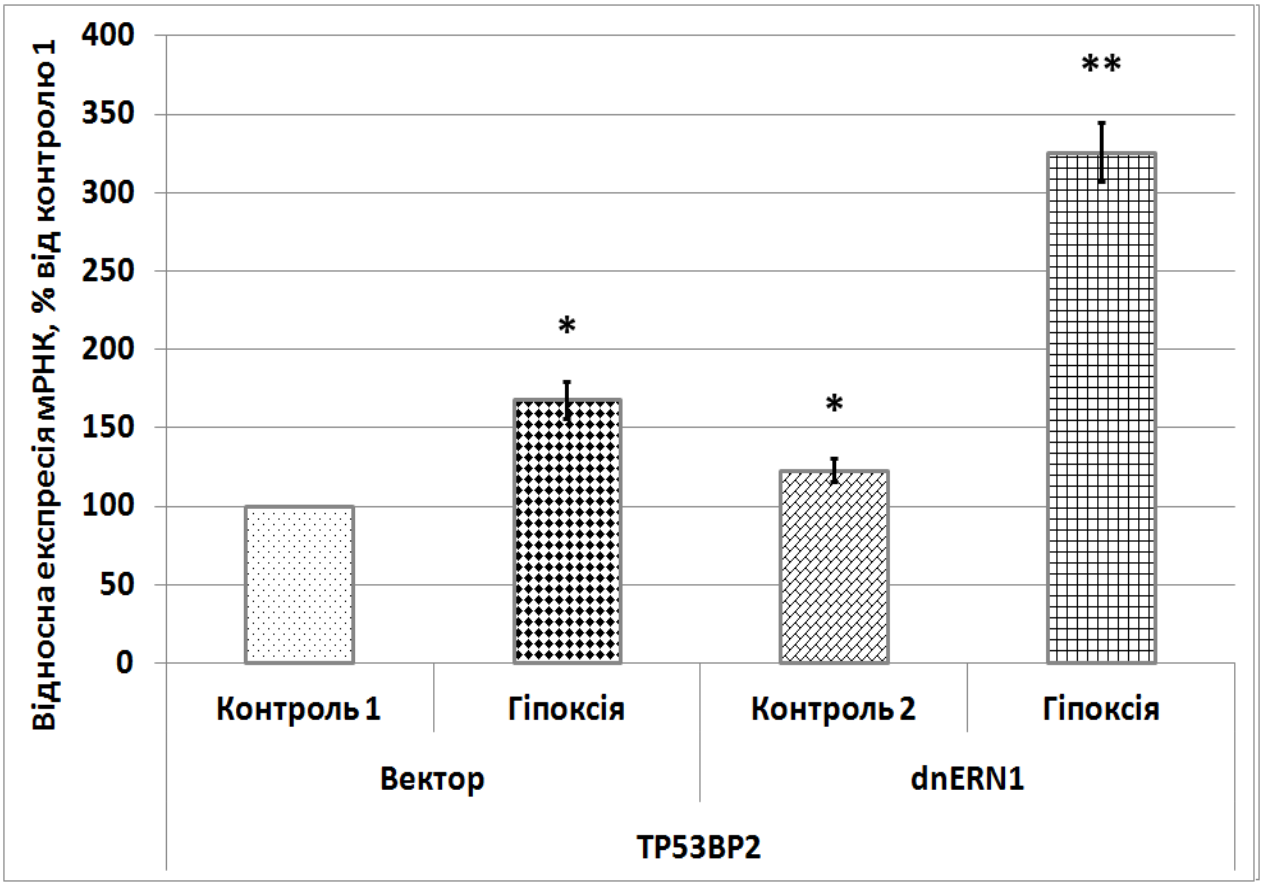


Рис. 3.4.10. Вплив гіпоксії на експресію мРНК TP53BP2 у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК TP53BP2 нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Досліджено, що рівень мРНК гена *RBL1* за умов гіпоксії знижується у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (майже втричі) і у два рази у клітинах з пригніченою активністю сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (рис.3.4.11).

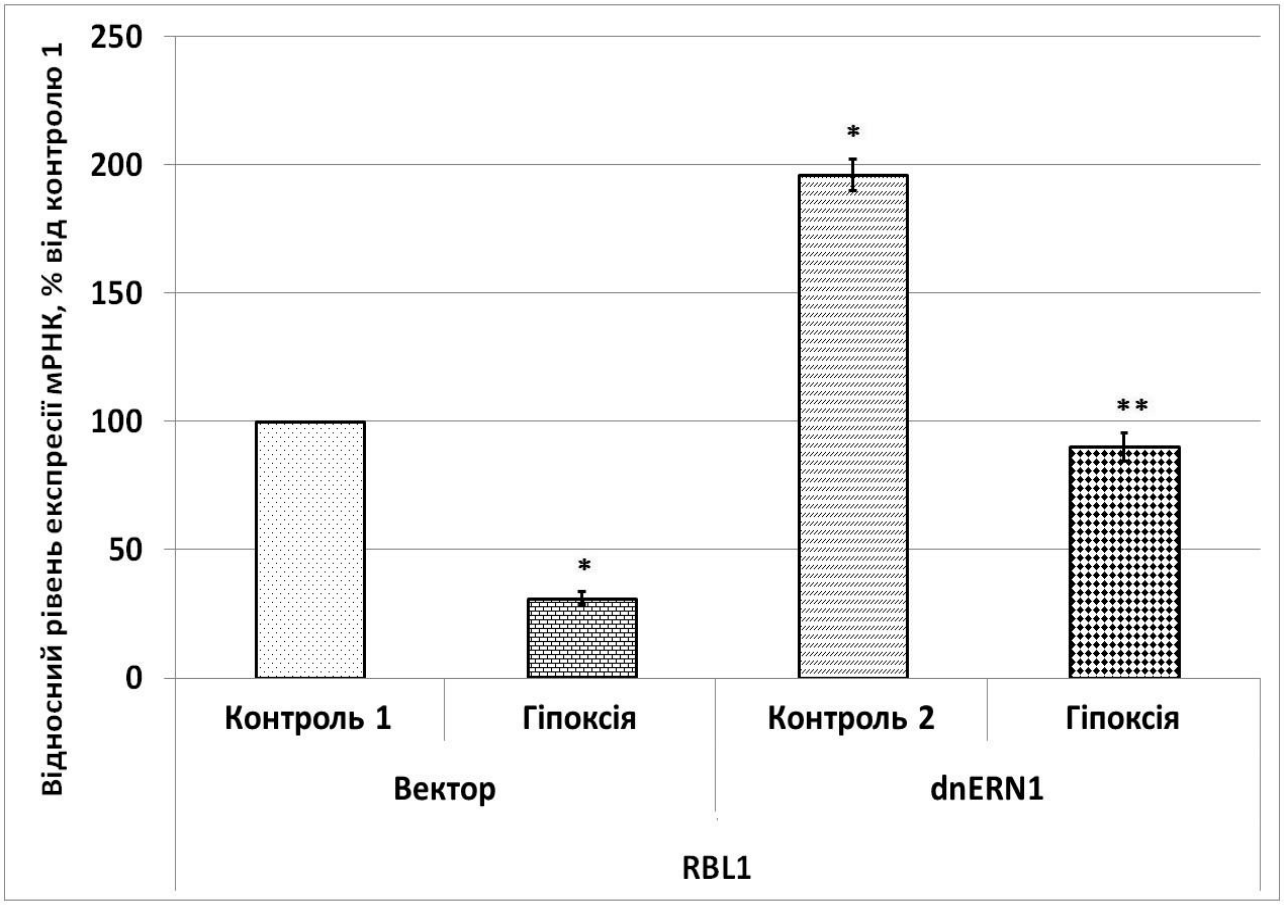


Рис. 3.4.11. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *RBL1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК RBL1 нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *CSNK2A1* проявляють резистентність до стану гіпоксії в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (рис. 3.4.12).

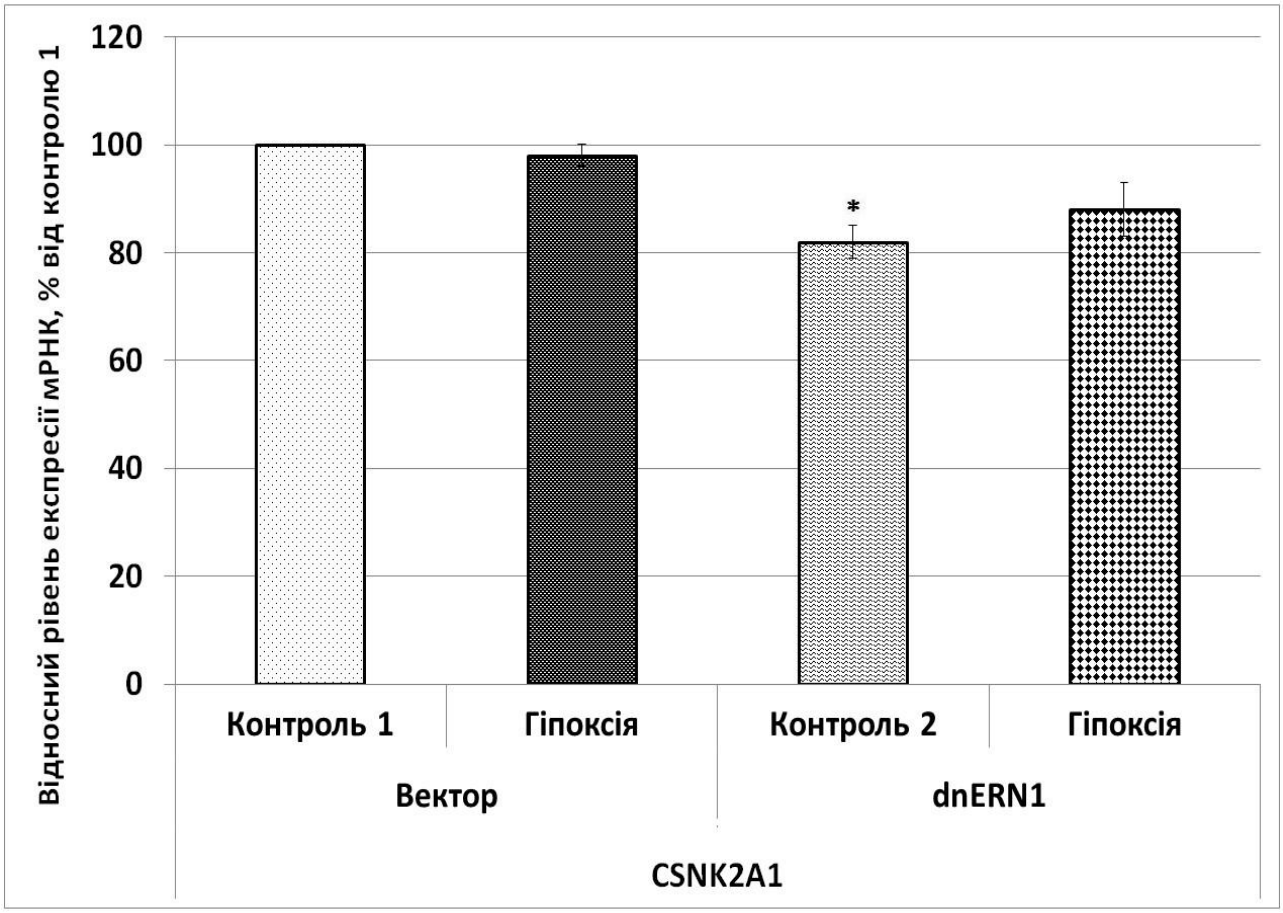


Рис. 3.4.12. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *CSNK2A1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *CSNK2A1* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Встановлено, що рівень мРНК гена *CSNK2A2* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі підвищується за умов гіпоксії у контрольних клітинах (Вектор) (на 36%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *CSNK2A2* проявляє резистентність до стану гіпоксії (рис. 3.4.13).

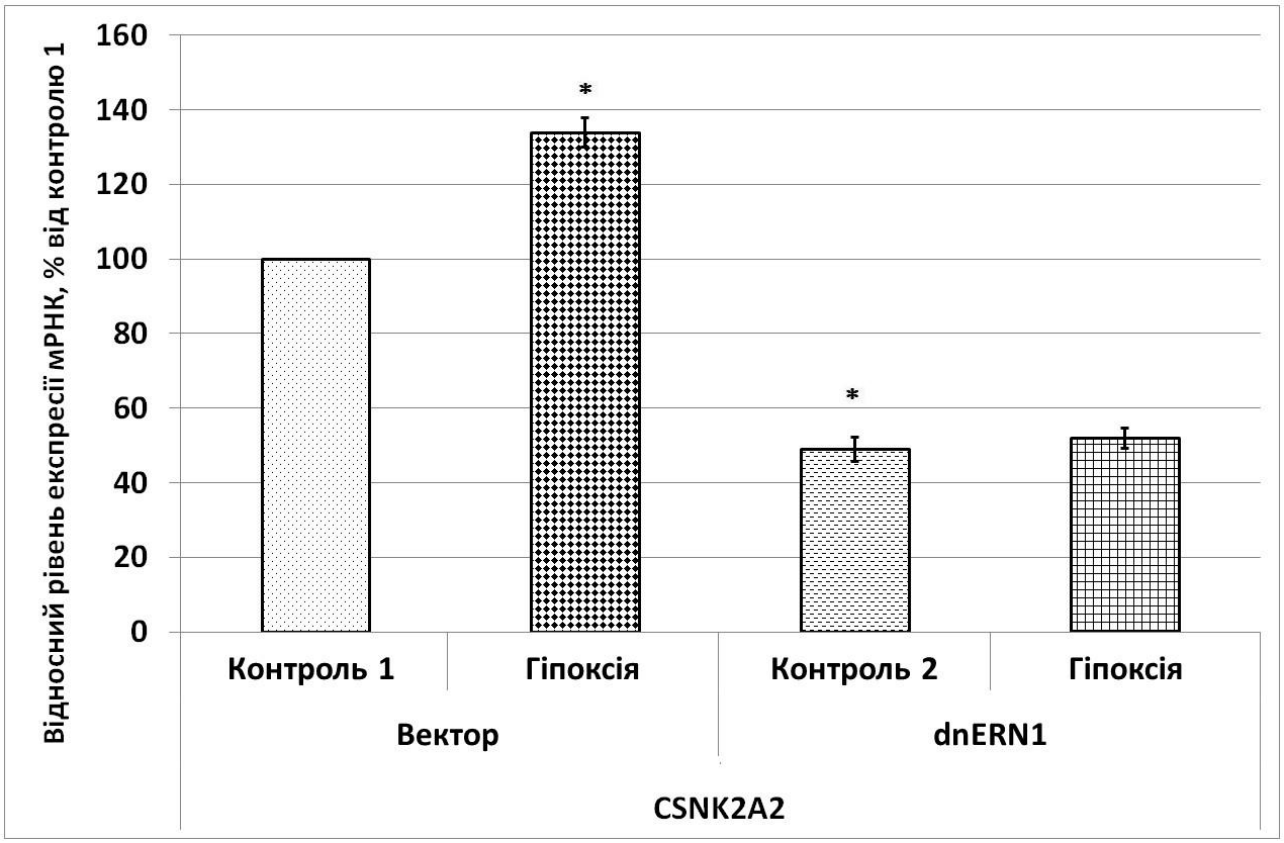


Рис. 3.4.13. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *CSNK2A2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *CSNK2A1*, *CSNK2A2* та *CSNK2B*. нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *CSNK2B* знижені за умов гіпоксії в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 18%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 9%), з чого можна зробити висновок, що пригнічення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума за умови гіпоксії істотно не впливає на експресію цього гена (рис. 3.4.14).

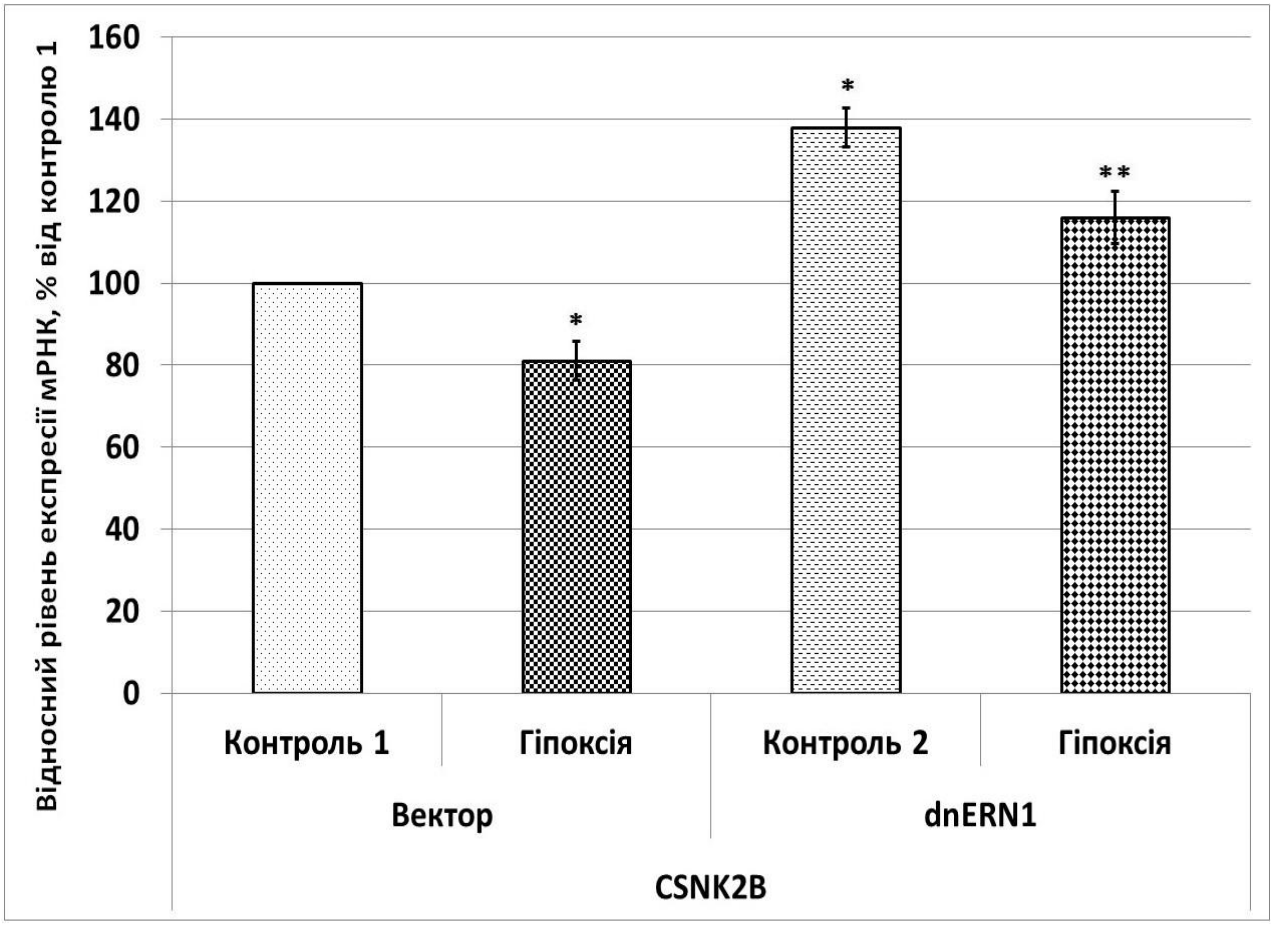


Рис. 3.4.14. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *CSNK2B* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *CSNK2B*. нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *ZMAT3* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі знижується за умов гіпоксії у контрольних клітинах (Вектор) (на 17%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *ZMAT3* проявляє резистентність до стану гіпоксії (рис. 3.4.15).

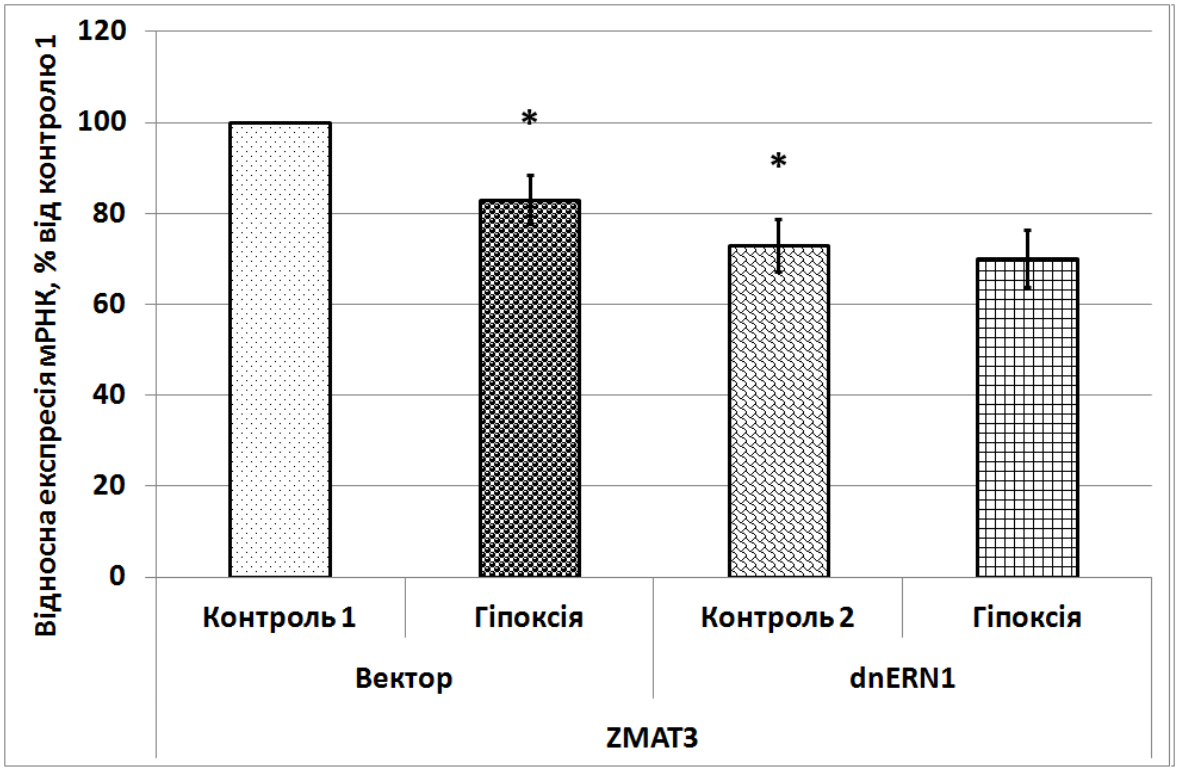


Рис. 3.4.15. Вплив гіпоксії на експресію мРНК *ZMAT3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *ZMAT3* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

3.5. Вплив дефіциту глутаміну на експресію *TP53, USP7, MDM2, PERP, TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2,* та *ZMAT3* у клітинах гліоми в залежності від функції ензиму ERN1

Клітини злоякісних пухлин споживають значно більше глутаміну, ніж нормальні клітини, причому висока інтенсивність його споживання не пояснюється лише збільшенням біосинтезу протеїнів клітинами пухлин [216]. На сьогоднішній день відомо, що метаболізм глутаміну використовується для поповнення рівня проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот, забезпечує пухлинні клітини субстратами, необхідними для їх поділу, і контролює редокс-потенціал в клітинах за допомогою регуляції синтезу в них НАДФН і відновленого глутатіону [217].

Після надходження глутаміну в клітину ензим глутаміназа перетворює його в глутамат, який або дезамінується в α-кетоглутарат (інтермедіат циклу трикарбонових кислот) або переамінується в аспартат, який використовується для біосинтезу нуклеотидів. Глутаміназа-1 (ГМН1), одна з двох ізоформ глутамінази, в надлишкових кількостях виявляється в клітинах різних видів злоякісних пухлин людини, а її активність прямо корелює зі швидкістю пухлинного росту [218].

Глутамін також може перетворюватися в лактат або в аланін, якщо мітохондріальний малат експортується в цитозоль і декарбоксилюється малатдегідрогеназою в піруват, генеруючи НАДФН. Дослідження показали, що в клітинних культурах злоякісних пухлин близько 60% глутаміну перетворюється в лактат і аланін [219].

Метаболізм глутаміну безпосередньо регулюється фактором транскрипції Мус через підвищення експресії мембранних переносників глутаміну і глутамінази-1 [220]. Саме цим можна пояснити, важливість глутаміну для процесів проліферації [221].

Враховуючи важливість глутамін-залежного анаплерозу для функціонування циклу трикарбонових кислот і для проліферації клітин,

регулятори цього процесу можуть володіти онкогенними властивостями. Тому нами було проведене дослідження впливу дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* та залежних від нього генів за умови пригніченої функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, у клітинах гліоми лінії U87 та її сублінії з пригніченою функцією ензиму ERN1 (dnERN1).

Досліджено експресію гена *TP53* за умов дефіциту глутаміну та з використанням сублінії клітин гліоми з конструкцією dnERN1, на основі отриманих даних з кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі які представлено на рисунку 3.5.1, бачимо, що експресія гена *TP53* підвищується в клітинах гліоми з вектором pcDNA3.1 (на 41%) та значно

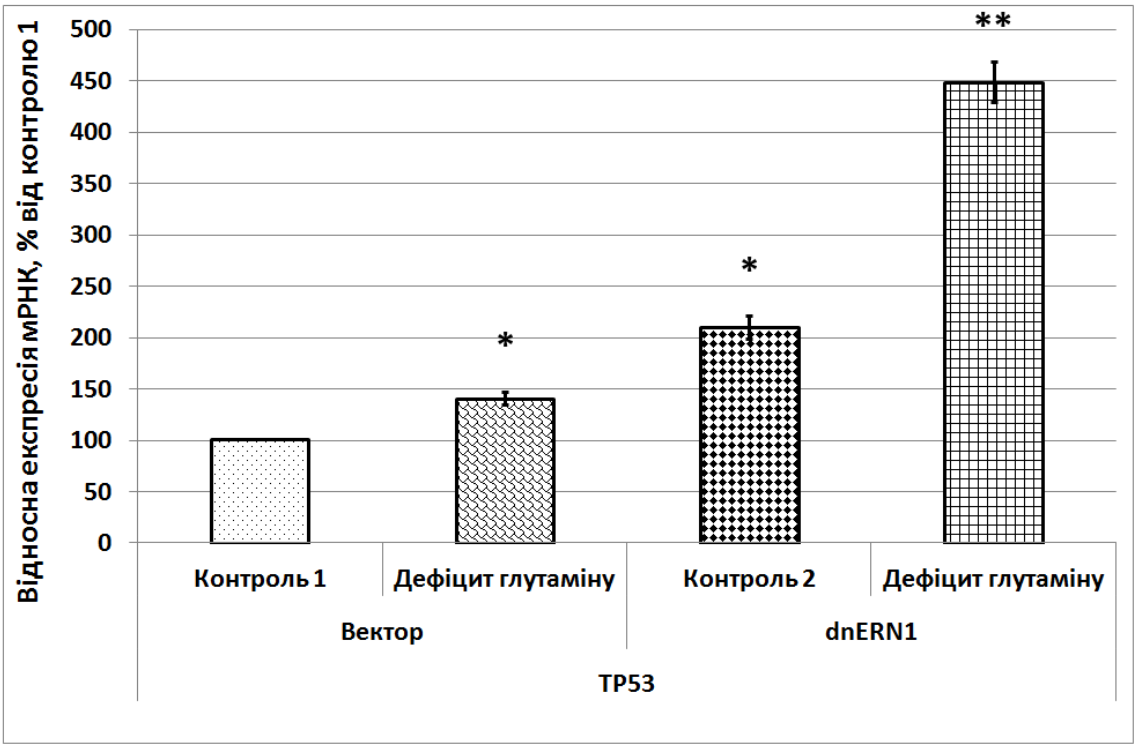


Рис. 3.5.1. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

підвищується експресія гена *TP53* за умов виключення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (на 114%).

Досліджено, що за умов дефіциту глутаміну значно підвищує експресію мРНК гена *MDM2* в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1(на 82%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 155%) (рис. 3.5.2).

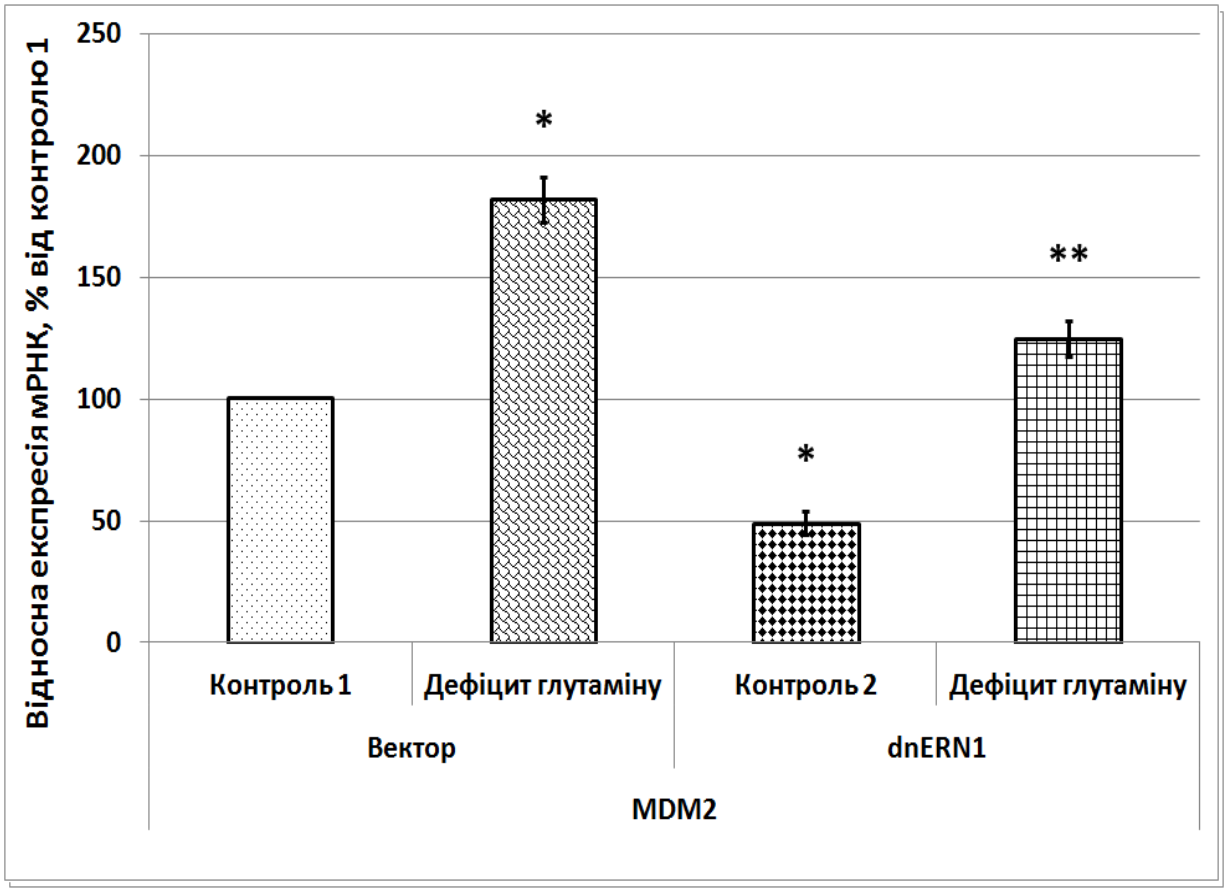


Рис. 3.5.2. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *MDM2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *MDM2* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *USP7* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі знижується за умов дефіциту глутамину у контрольних клітинах (Вектор) (на 14%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *USP7* проявляє резистентність до стану дефіциту глутаміну (рис. 3.5.3).

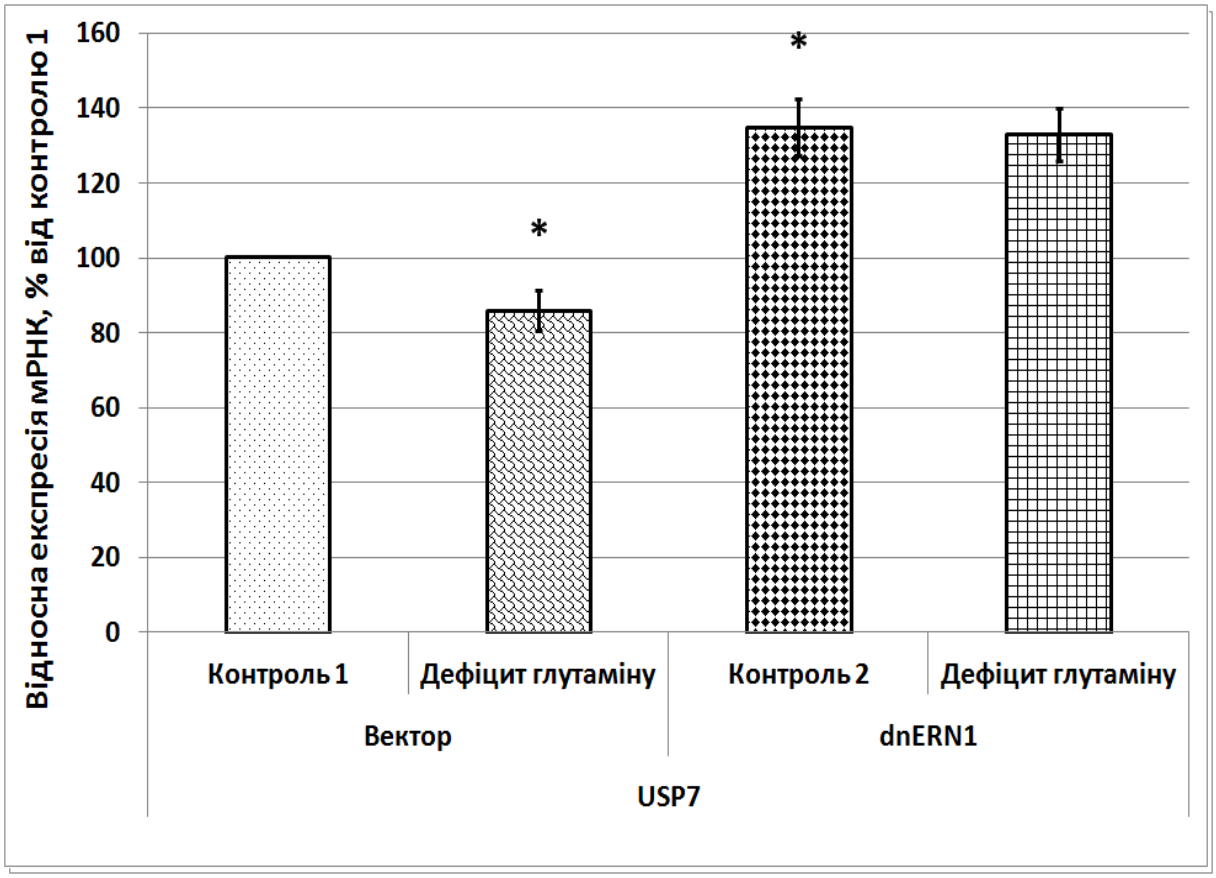


Рис. 3.5.3. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *USP7* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *USP7* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *PERP* проявляють резистентність до стану дефіциту глутамину в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (рис. 3.5.4).

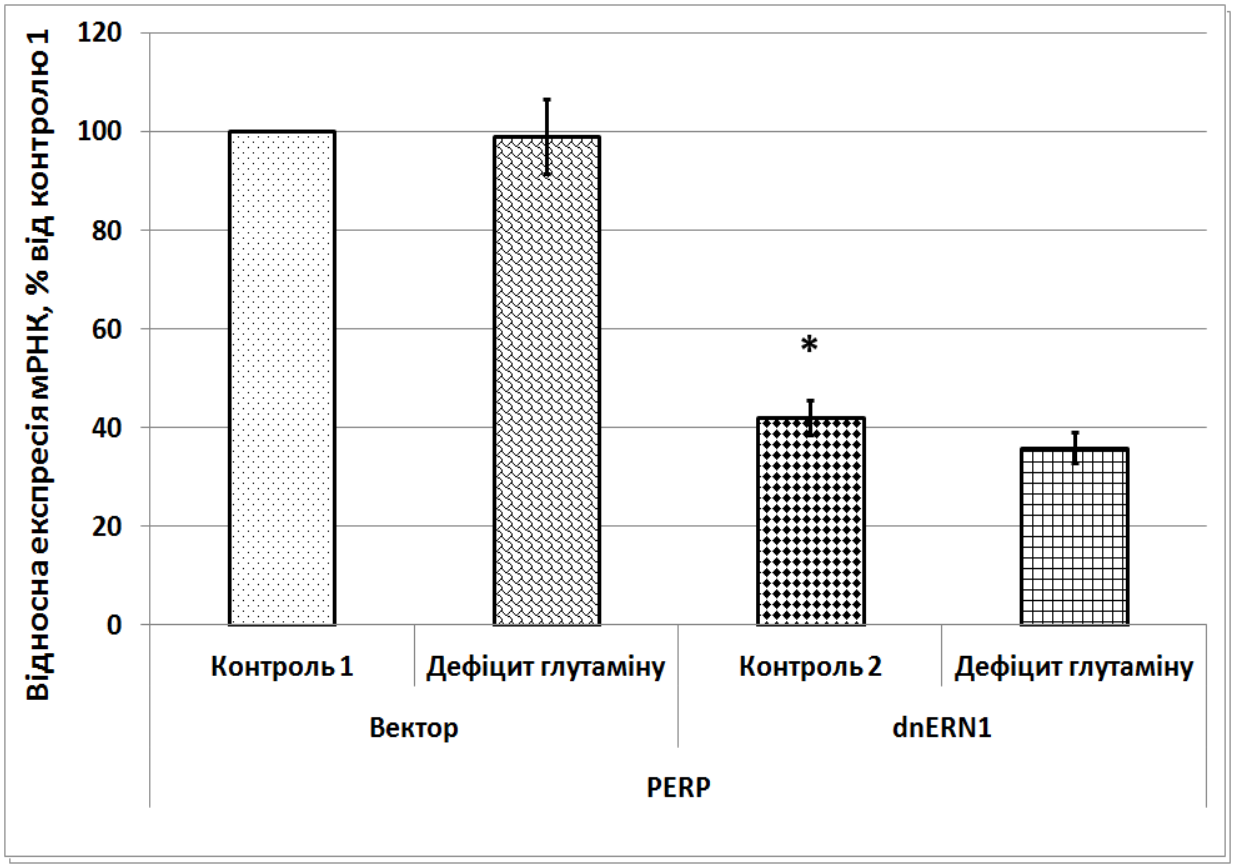


Рис. 3.5.4. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *PERP* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *NME6* проявляють резистентність до стану дефіциту глутамину в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (рис. 3.5.7).

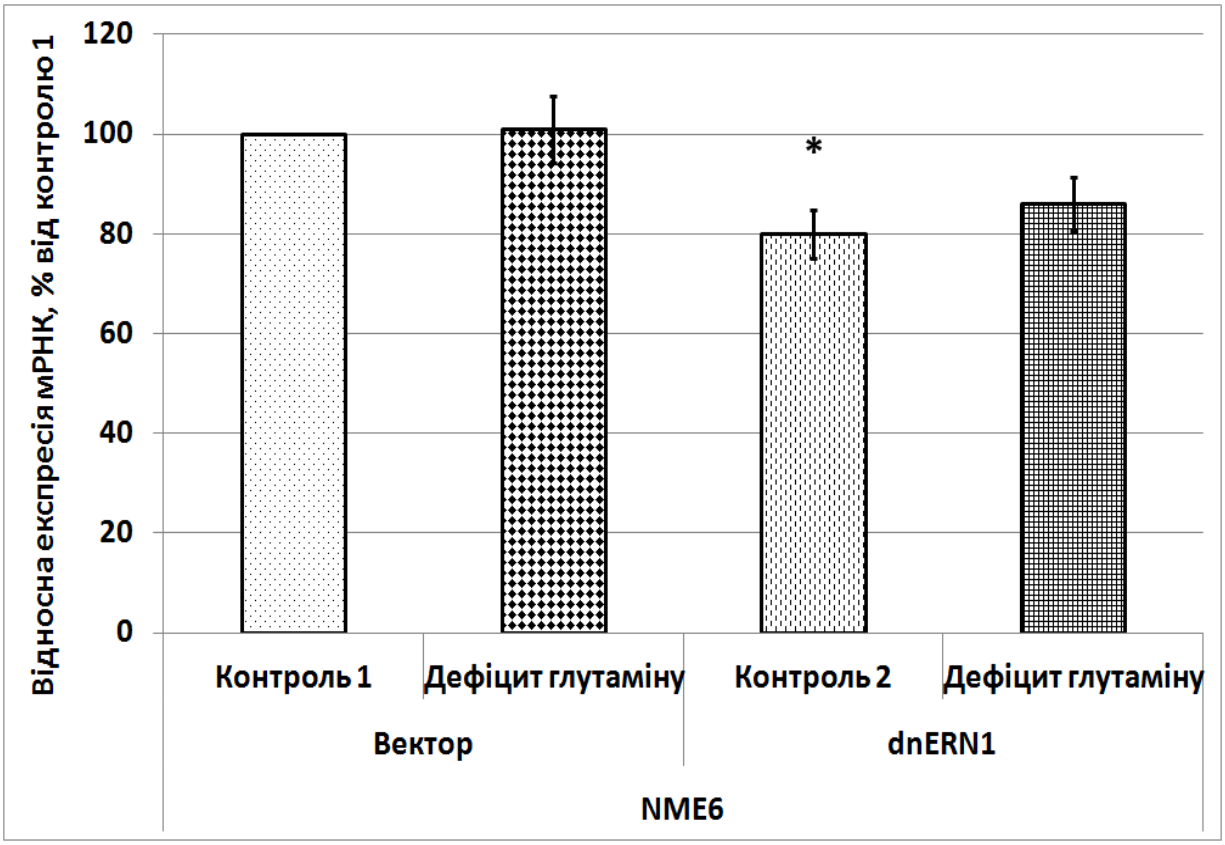


Рис. 3.5.7. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *NME6* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *NME6* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Досліджено, що за умов дефіциту глутаміну значно підвищує експресію мРНК гена *ZMAT3* в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 51%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 85%) (рис. 3.5.8).

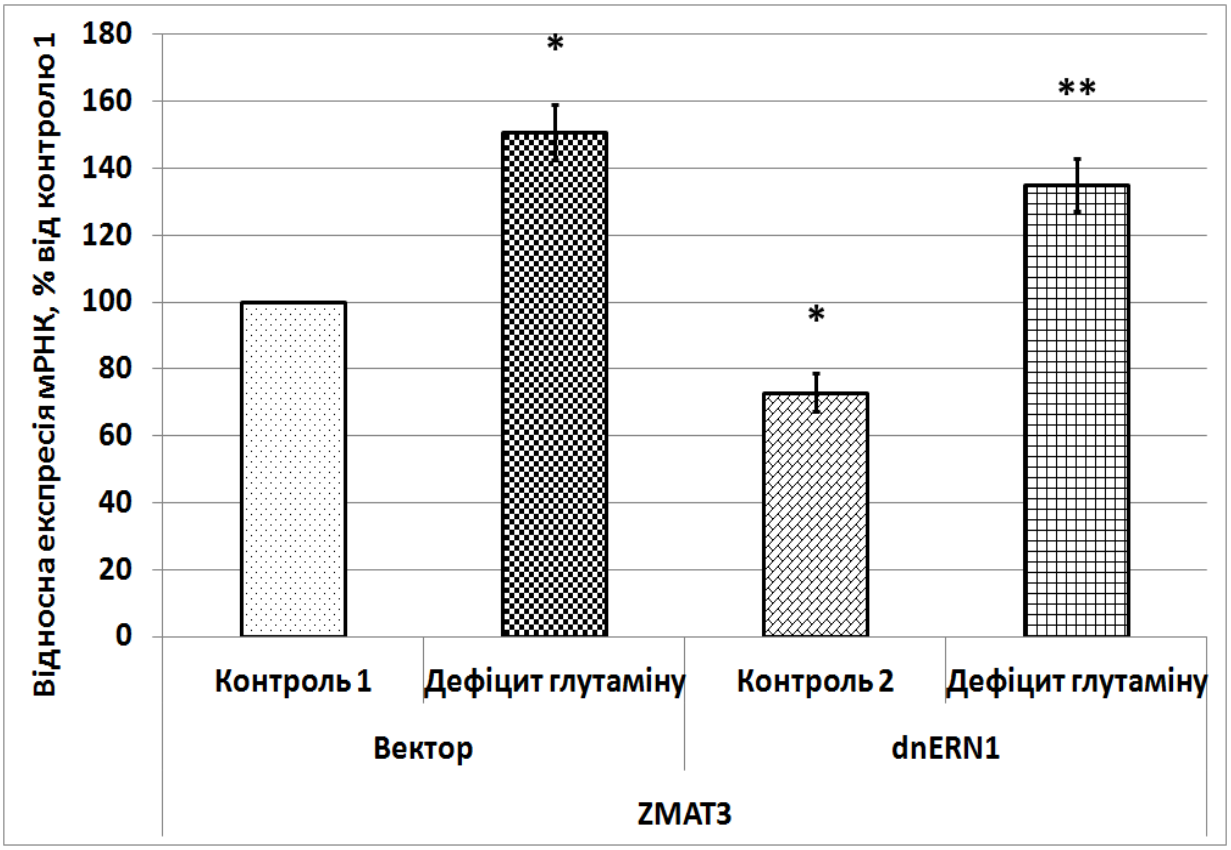


Рис. 3.5.8. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *ZMAT3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *ZMAT3* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *TOPORS* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі підвищується за умов дефіциту глутамину у контрольних клітинах (Вектор) (на 29%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *TOPORS* проявляє резистентність до стану дефіциту глутаміну (рис. 3.5.9).

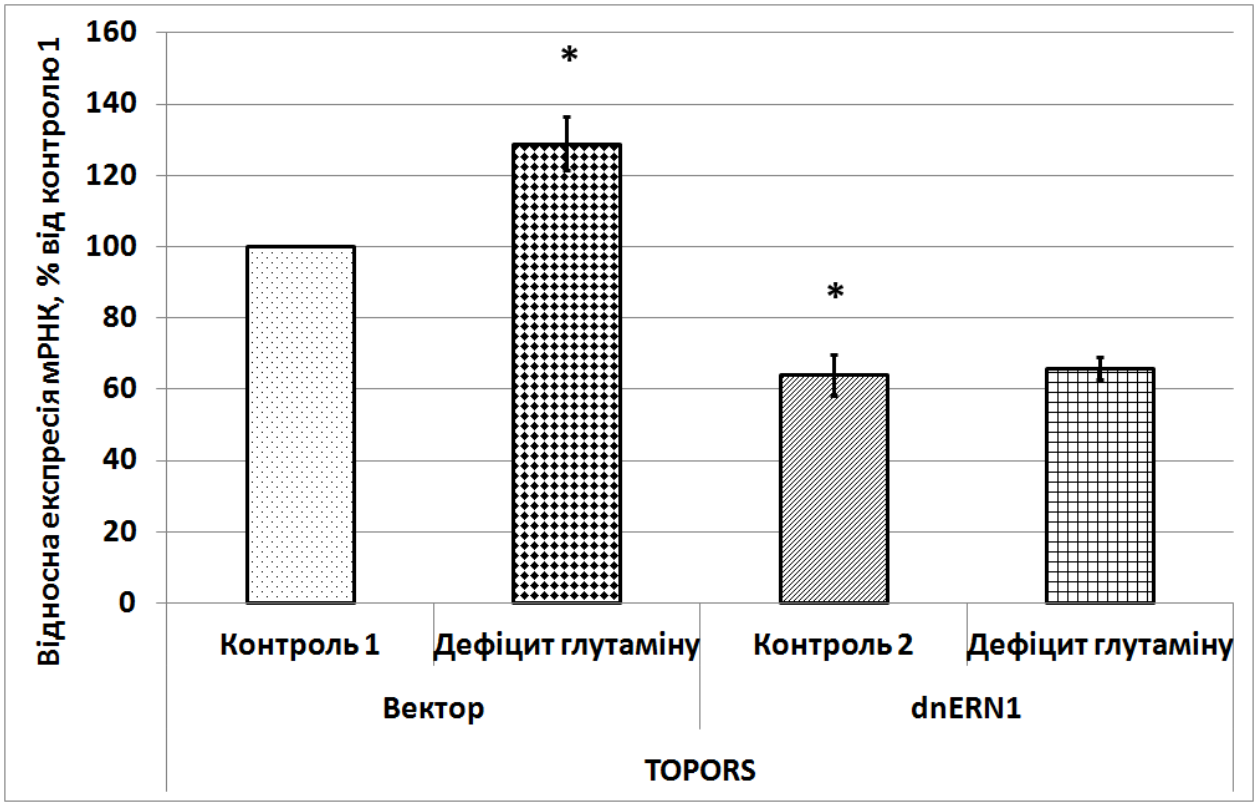


Рис. 3.5.9. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TOPORS* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TOPORS* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Досліджено, що за умов дефіциту глутаміну підвищує експресію мРНК гена *TP53BP1* в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 27%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією ERN1 (на 69%) (рис. 3.5.10).

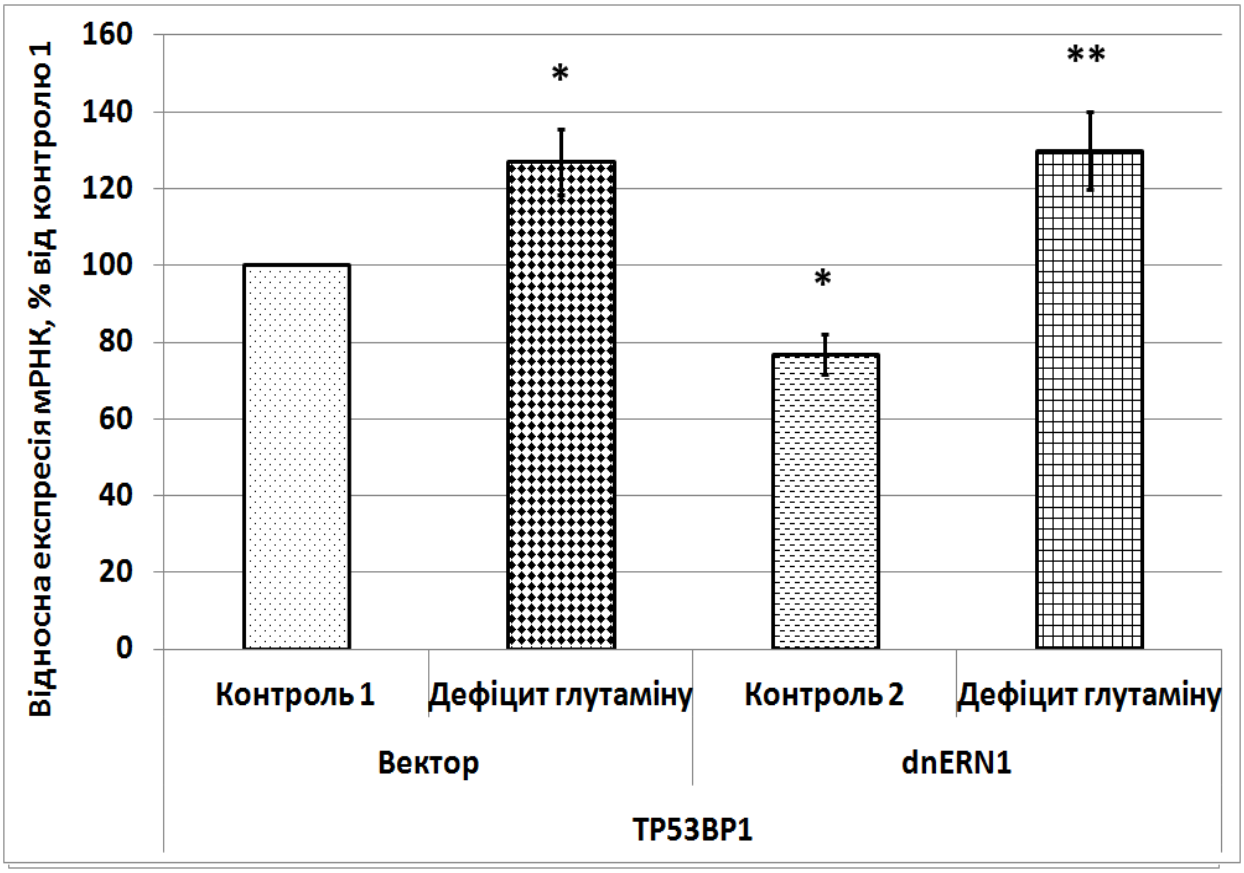


Рис. 3.5.10. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53BP1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53BP1* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *TP53BP2* за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі знижується за умов дефіциту глутамину у контрольних клітинах (Вектор) (на 15%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *TP53BP2* проявляє резистентність до стану дефіциту глутаміну (рис. 3.5.11).

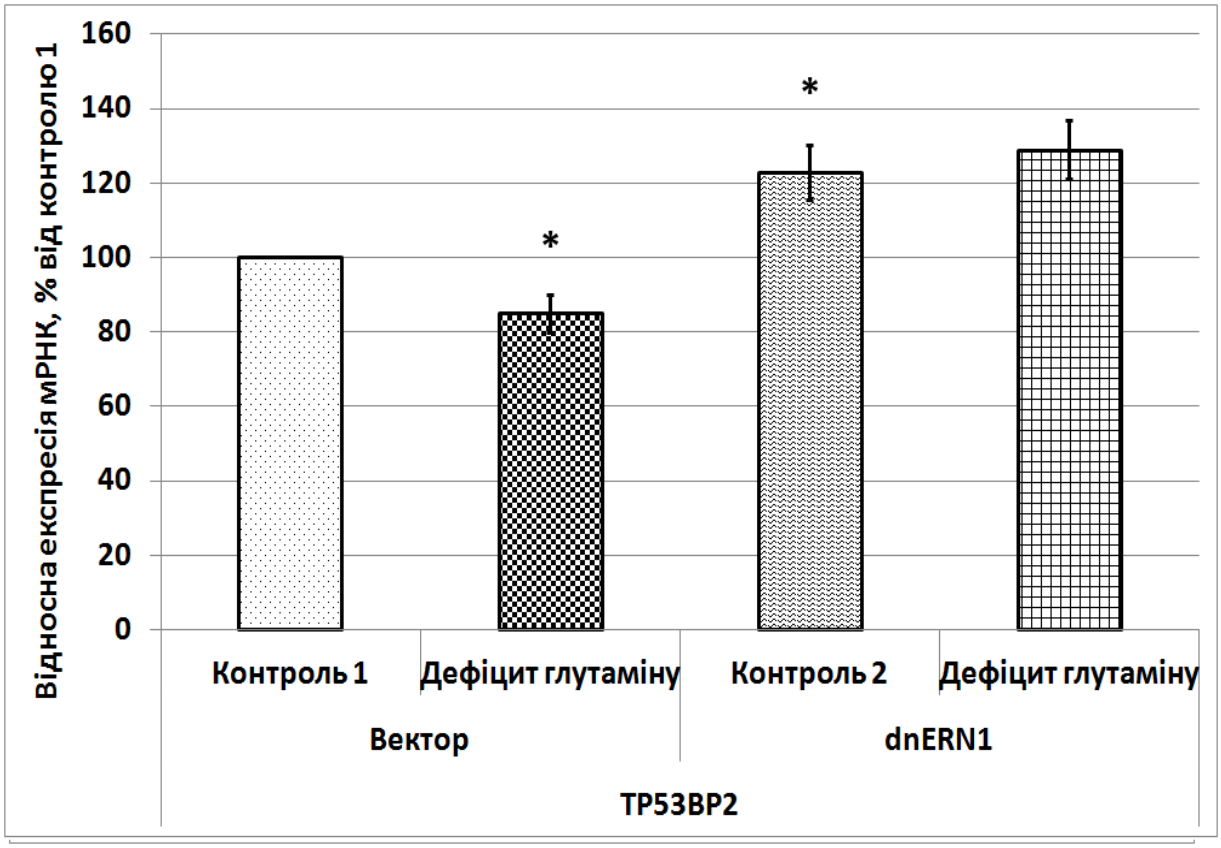


Рис. 3.5.11. Вплив дефіциту глутаміну на експресію мРНК *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53BP2* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

3.6. Експресія генів *TP53, USP7, MDM2, PERP, TOPORS, NME6, TP53BP1, TP53BP2,* та *ZMAT3* у клітинах гліоми за умови дефіциту глюкози в залежності від функції ензиму ERN1

Збільшення швидкості гліколізу є характерною рисою більшості злоякісних пухлин, при якому спостерігається збільшення активності основних ензимів гліколізу - гексокінази, фосфофруктокінази і піруваткінази. У пухлинах відбувається розпад вуглеводів до пірувату і перетворення його в лактат в присутності кисню. Характерна для багатьох пухлин підвищена секреція лактату отримала назву "ефект Варбурга". Переважний анаеробний гліколіз є наслідком швидкого зростання пухлини при слабкій забезпеченості мережею кровоносних судин. Оскільки встановлено, що чим менш диференційована пухлина і чим вище швидкість її росту, тим інтенсивніше протікає в ній анаеробний гліколіз і слабкіше окисне фосфорилювання. Аеробний гліколіз в пухлинних клітинах розглядається як механізм, який надає їм переважний захист від активних форм кисню, що утворюються при інтенсивній проліферації і в екстримально лужному позаклітковому мікрооточенні, а також дає можливість пухлинним клітинам проникати в навколишні нормальні тканини в несприятливих умовах мікрооточення. Це робить аеробний гліколіз важливою ознакою пухлини незалежно від природи тканини, з якої вона виникла, або її генетичних особливостей. За рахунок активації гліколізу виражено активуються процеси проліферації. Енергія, одержувана пухлинними клітинами від гліколізу, достатня для забезпечення синтезу нуклеїнових кислот. В даній роботі ми вивчили ефект дефіциту глюкози як моделі ішемії на експресію *TP53* та *TP53*-залежних генів за умов повного виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

Досліджено, що рівень мРНК гена *TP53* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі проявляє резистентність до стану дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *TP53* підвищується (на 17%) (рисунок 3.6.1).

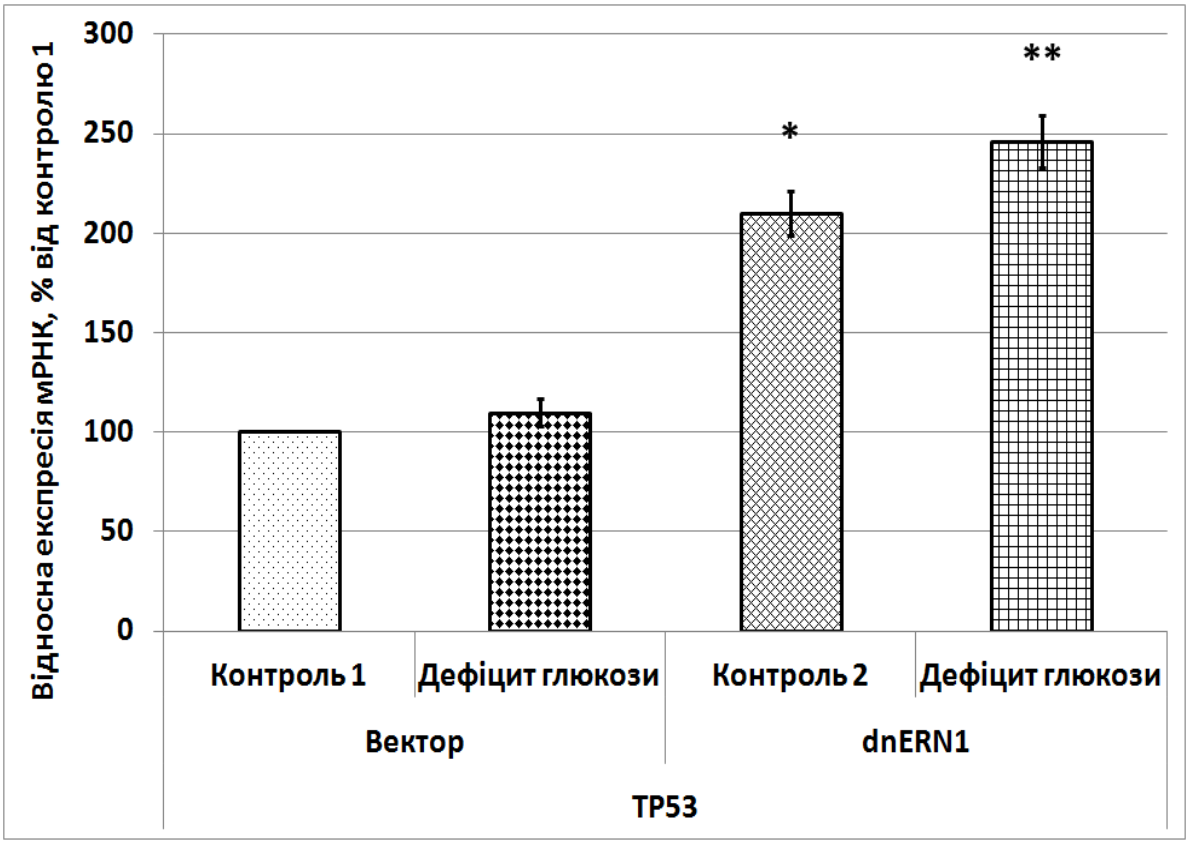


Рис. 3.6.1. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Досліджено, що рівень мРНК гена *MDM2* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі проявляє резистентність до стану дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *MDM2* підвищується у два рази (рис. 3.6.2).

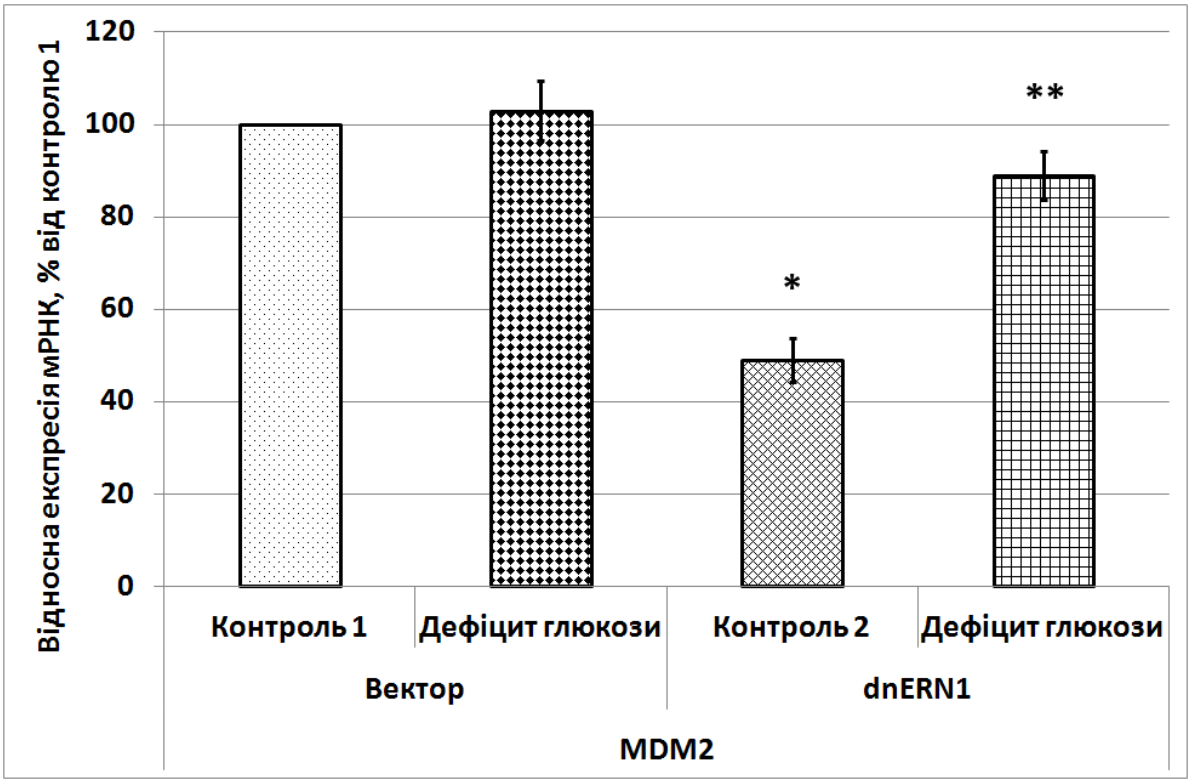


Рис. 3.6.2. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *MDM2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *MDM2* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *USP7* проявляють резистентність до стану дефіциту глюкози в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (рисунок 3.6.3).

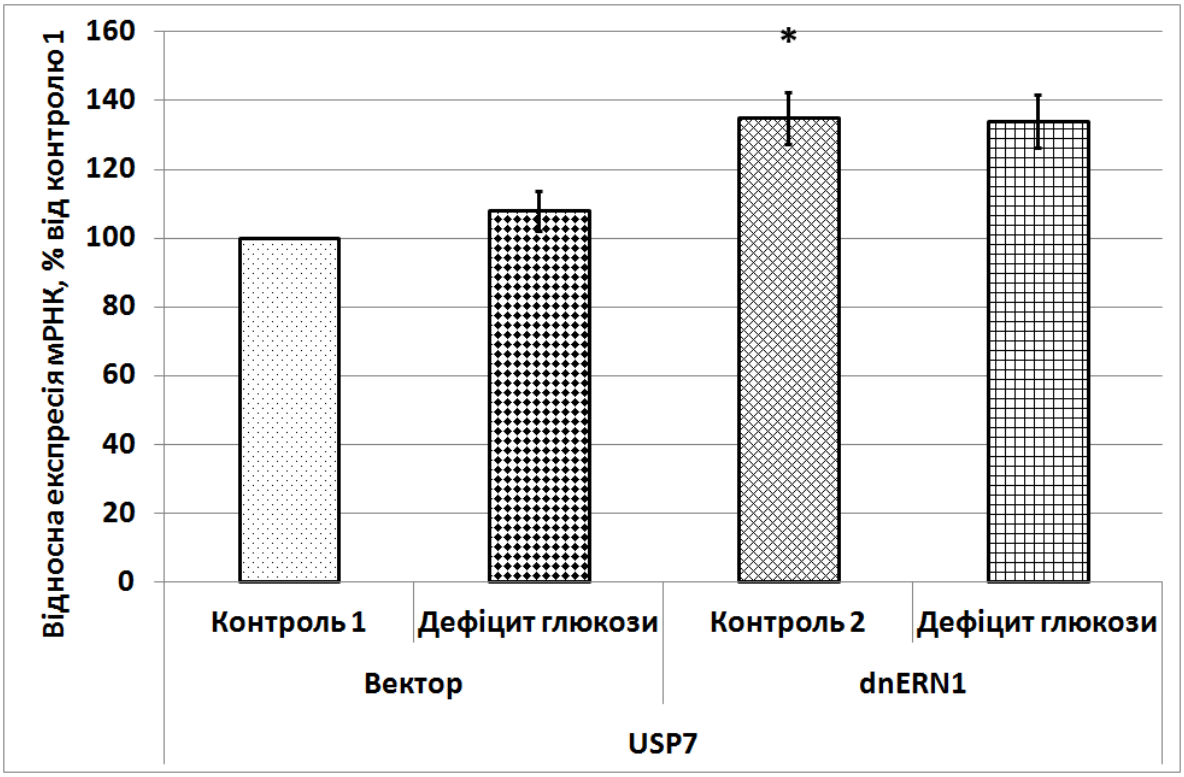


Рис. 3.6.3. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *USP7* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *USP7* нормалізували по експресії β-актину; n = 3. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Досліджено, що рівень мРНК гена *PERP* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі проявляє резистентність до стану дефіциту глюкози у контрольних клітинах гліоми лінії U87 (Вектор). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *PERP* знижується (на 31%) (рис. 3.6.4).

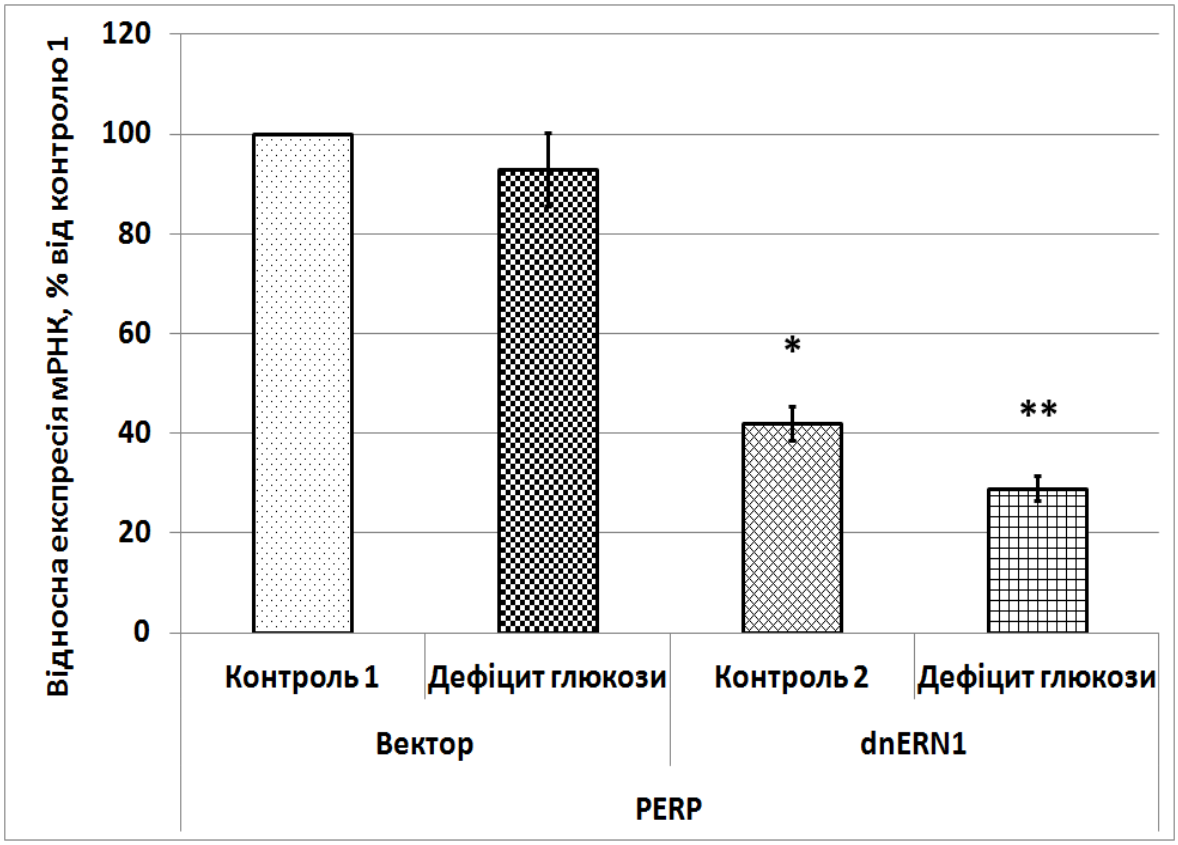


Рис. 3.6.4. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *PERP* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *PERP* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Досліджено, що за умов дефіциту глюкози підвищує експресію мРНК гена *TP53BP1* в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 45%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 82%) (рис. 3.6.5).

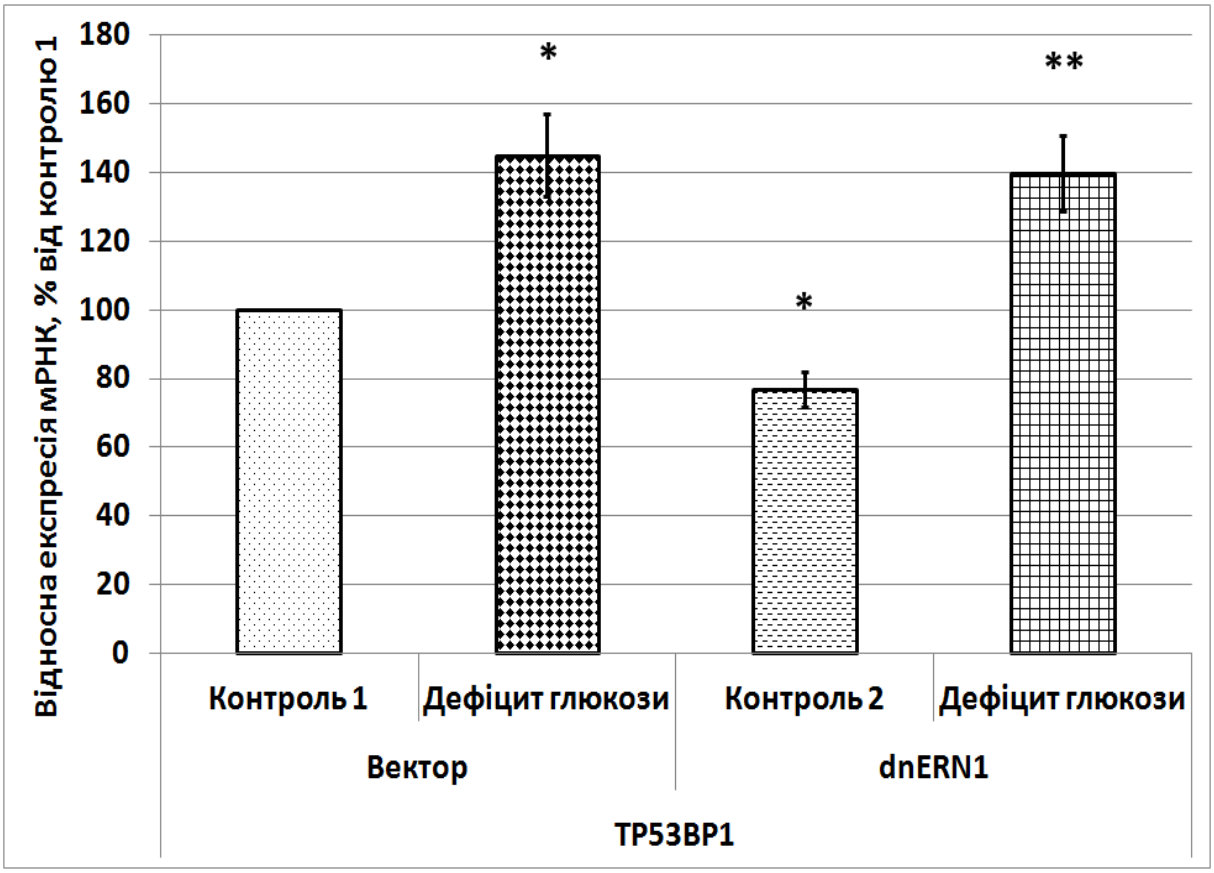


Рис. 3.6.5. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53BP1* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53BP1* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *TP53BP2* підвищені за умов дефіциту глюкози в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 27%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 24%) (рис. 3.6.6).

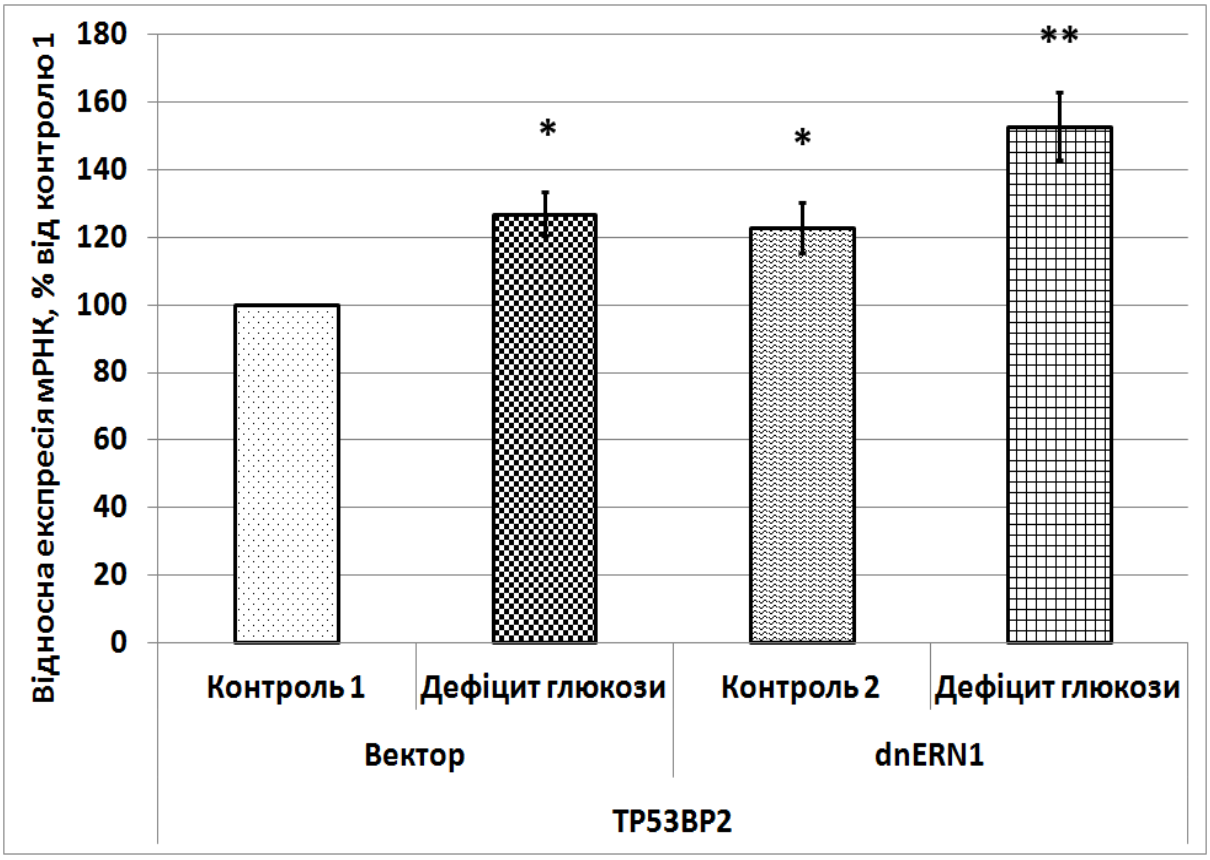


Рис. 3.6.6. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TP53BP2* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TP53BP2* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

За даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі було встановлено, що рівні експресії мРНК *NME6* знижені за умов дефіциту глюкози в обох типах клітин гліоми лінії U87: трансфекованих вектором pcDNA3.1 (на 28%) та трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 (на 15%) (рис. 3.6.9).

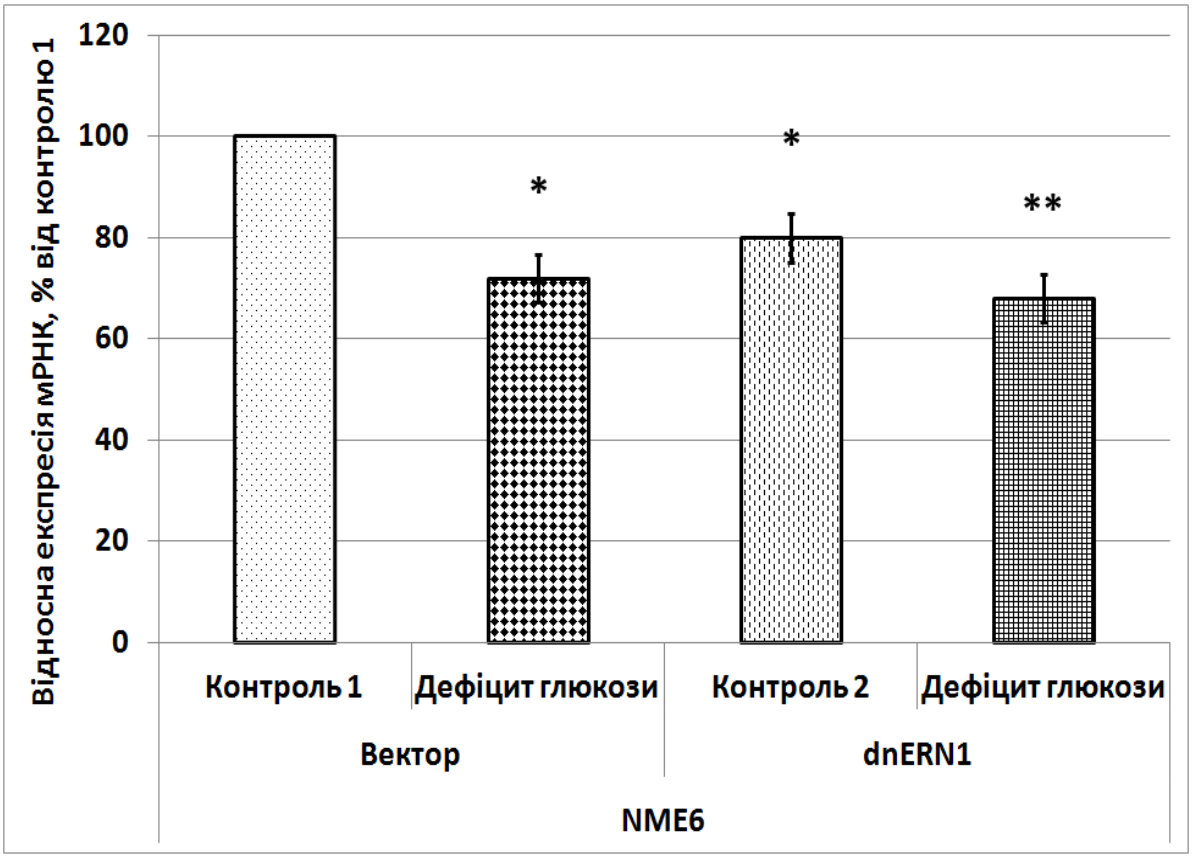


Рис. 3.6.9. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *NME6* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *NME6* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень мРНК гена *ZMAT3* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі підвищується за умов дефіциту глюкози у контрольних клітинах (Вектор) (на 13%). Однак, за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) експресія мРНК гена *ZMAT3* проявляє резистентність до стану дефіциту глюкози (рис. 3.6.10).

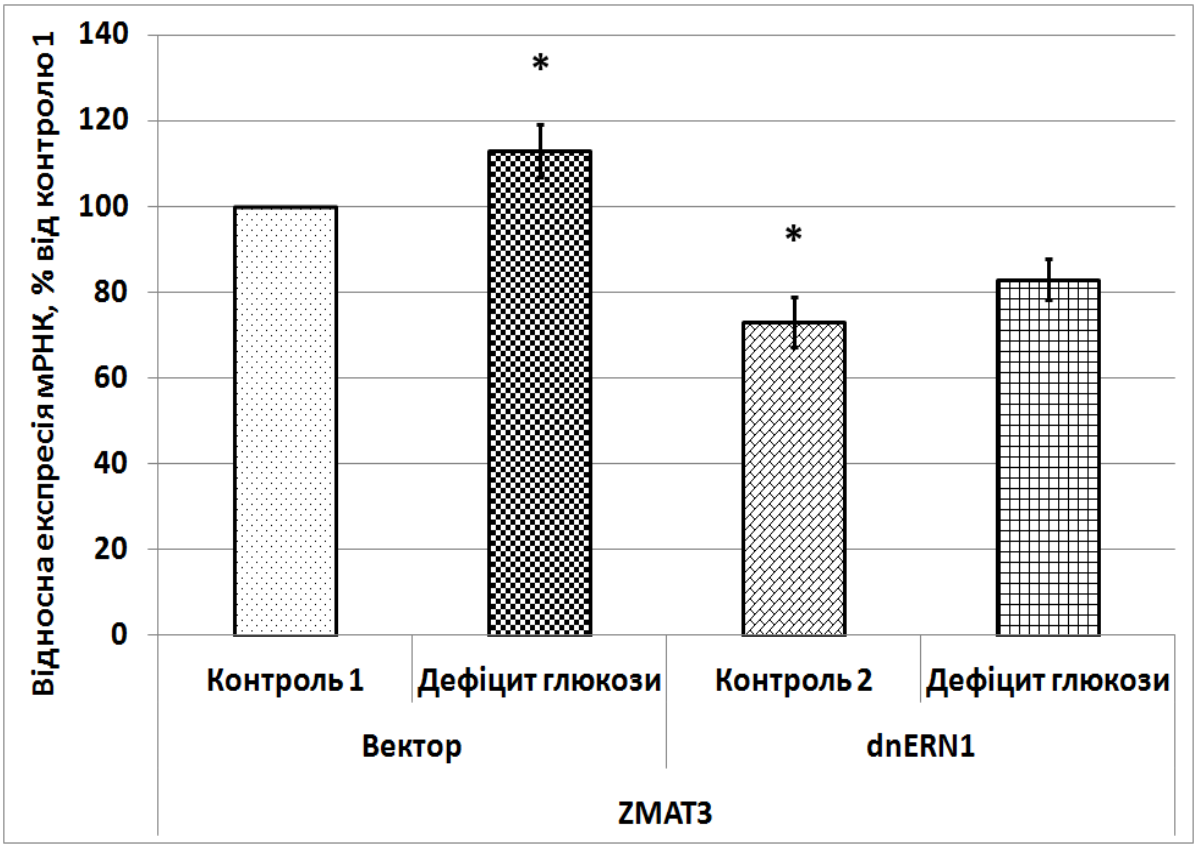


Рис. 3.6.10. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *ZMAT3* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *ZMAT3* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Встановлено, що рівень мРНК гена *TOPORS* за даними кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі знижується за умов дефіциту глюкози у обох типах клітин: у контрольних клітинах (Вектор) (на 20%) та за умови пригнічення активності сенсорно-сигнального ензиму ERN1 експресія мРНК гена *TOPORS* знижується майже у три рази (рис. 3.6.11).

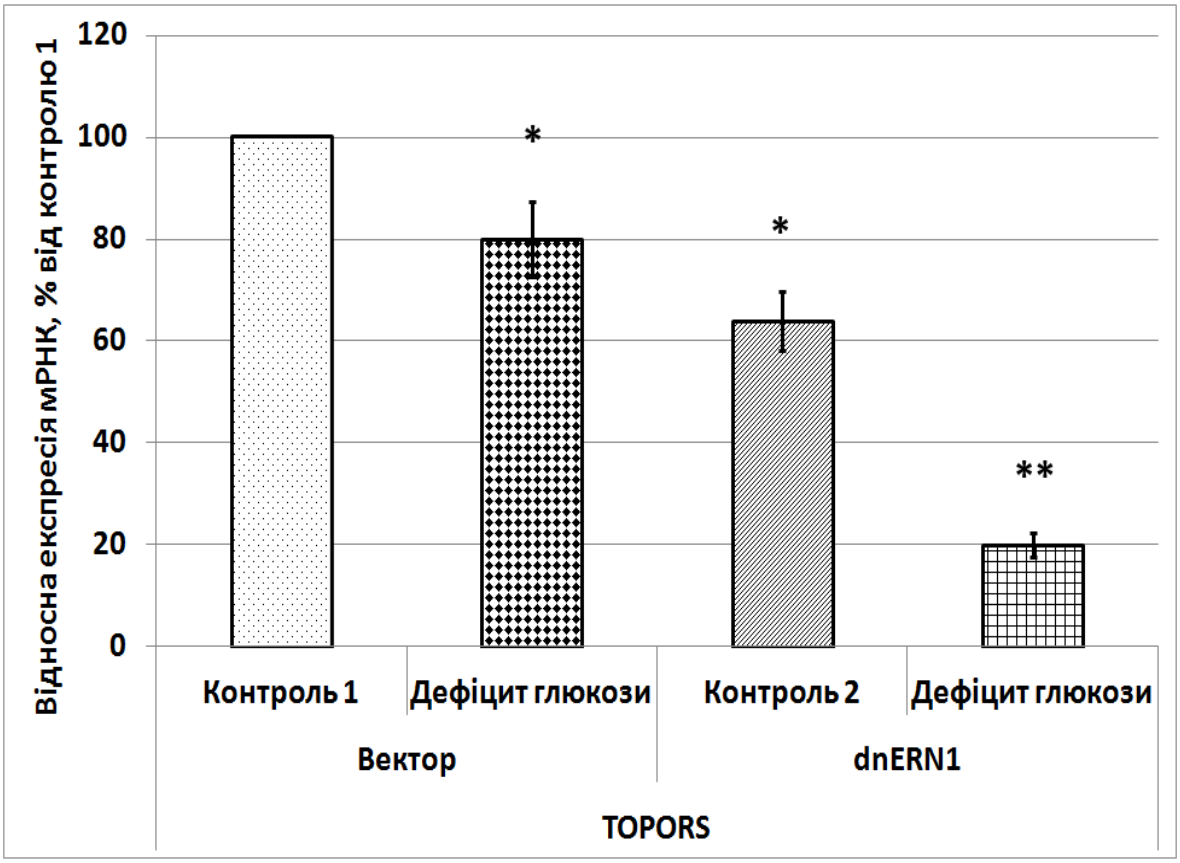


Рис. 3.6.11. Вплив дефіциту глюкози на експресію мРНК *TOPORS* у клітинах гліоми лінії U87, трансфекованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфекованих домінант-негативною конструкцією dnERN1 у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Величину експресії мРНК *TOPORS* нормалізували по експресії β-актину; n = 4. Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnERN1; * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 1, ** – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

РОЗДІЛ 4.
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Гліомні клітини це клітини які виникли в результаті злоякісного переродження астроцитів головного мозку та характеризуються дуже високою агресивністю. За рахунок швидкої проліферації клітин створюється дефіцит поживних речовин, що призводить до змін в мікрооточенні навколо пухлини та створюються умови ацидозу і гіпоксії, тому пухлинні клітини в таких важких умовах повинні змінити свій метаболізм для виживання та подальшого свого розвитку. Цей вид злоякісних пухлин проявляє високу резистентність до хіміотерапії та має поганий прогноз при застосуванні променевої терапії та методів хірургічного видалення. На сьогоднішній день до кінця не з'ясовано які саме молекулярні механізми лежать в основі такої агресивної поведінки клітин гліоми. У зв'язку з цим на даний момент немає ефективних протоколів лікування і, на жаль, тривалість життя хворих з даним захворюванням відповідає приблизно двом рокам з моменту підтвердження діагнозу. В даній роботі були використані як модель гліомні клітини лінії U87 та дві її сублінії.

Як вже відомо, злоякісні пухлини використовують стрес ендоплазматичного ретикулума та ішемію для виживання та активації процесів проліферації [1-4]. Стрес ендоплазматичного ретикулума є відповіддю клітини на незгорнуті чи неправильно згорнуті протеїни. Існує три основні шляхи цієї відповіді, кожен з яких активує трансмембранну молекулу, локалізовану в ендоплазматичному ретикулумі: PERK, ERN1 та ATF6 [5], серед яких ERN1 є найважливішим. Раніше було показано, що повне блокування сенсорно - сигнального ензиму ERN1 призводить до пригнічення росту пухлин. [6-10].

В цій роботі було досліджено як виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 впливає на ріст клітин гліоми лінії U87, і встановлено, що повне виключення ензиму призводить до пригнічення проліферації клітин гліоми лінії U87, що узгоджується з отриманими раніше даними щодо пригнічення росту пухлин. Також було досліджено як буде впливати виключення лише однієї

ендорибонуклеазної активності ERN1 на ріст клітин гліоми лінії U87. Дослідження показало, що пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1 має більш сильний вплив на швидкість проліферації клітин гліоми лінії U87, ніж блокування обох його активностей. До прояву такого ефекту ERN1 повинні бути залучені гени, які контролюють ріст і проліферацію клітин. Зокрема, дуже відомим геном, який несе дані функції, є ген-супресор пухлин *TP53*.

4.1. Роль ERN1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії гена TP53

Протеїн TP53 координує різні клітинні функції шляхом регуляції експресії генів-мішеней, тим самим викликає зупинку клітинного циклу та апоптоз [43, 44, 222, 223]. TP53 активується у відповідь на стресові чинники, які призводять до генетичних порушень: розриви ДНК [224, 225] недолік пулу нуклеотидів [226], руйнування мікротрубочок [227], відсутність сегрегації хромосом в мітозі [228] або її невірне завершення, яке веде до утворення мікроядер [227] тощо. При цьому сенсорами пошкоджень ДНК є, очевидно, ДНК-протеїнкіназа та / або протеїн ATM (Ataxia-Teleangioectasia Mutated), що мають здатність, з одного боку, розпізнавати вільні кінці ДНК, а з іншого, - фосфорилювати TP53 по Ser-15, перешкоджаючи тим самим його зв'язуванню з протеїном MDM2, подальшому транспорту з ядра і деградації [224, 229]. Одним із наслідків активації TP53 є зміна експресії регульованих їм генів, зокрема, таких як BAX та BCL2, що контролюють апоптоз, і p21WAF1 та GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage-induced), експресія яких призводить до зупинки клітинного циклу [225, 226, 230]. В результаті клітина, в якій вже виникли або тільки можуть виникнути генетичні зміни, гине в результаті індукції апоптозу або зупиняється в G1- або G2-, а іноді в S-фазі клітинного циклу.

Зважаючи на важливу роль TP53 для контролю клітинного циклу, нами було перевірено як змінюється його експресія при виключені ERN1. Результати наших досліджень продемонстрували, що пригнічення функції гена ERN1 в клітинах гліоми U87 підвищує як рівень мРНК, так і рівень протеїну TP53. Таким чином, зміна експресії гена *TP53* може бути залучена до пригнічення росту клітин, що спостерігалось при виключенні сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в культурі клітин гліоми лінії U87.

Було встановлено, що впродовж клітинного циклу рівень TP53 контролюється різноманітними факторами, зокрема MDM2, PERP та USP7. Було проведене дослідження для з'ясування як саме буде впливати виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 на експресію даних генів, а також якою активністю ERN1 будуть обумовлені ці зміни: кіназною чи ендорибонуклеазною.

Було досліджено як саме змінюється експресія мРНК TP53-залежних генів за умови повного виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума. Отримані результати показали зниження рівня експресії мРНК *MDM2*, що відповідає підвищеному рівню експресії мРНК *TP53*, оскільки *MDM2* є негативним регулятором *TP53* та ініціює його деградацію. Також було встановлено зниження рівня експресії мРНК гена *PERP*, який задіяний в розвитку апоптозу та є ефекторним геном для *TP53*. Для гена *USP7* в даному досліджені було показано підвищення рівня його експресії, що узгоджується з функцією цього гена, адже він відповідає за деубіквітинування TP53 і таким чином індукує залежний від *TP53* апоптоз та пригнічує ріст пухлини. Вплив виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 на експресію досліджуваних генів схематично представлено на рис. 4.1.1.

Отже, зміни в експресії цих генів призводять до підвищення рівня експресії та стабілізації протеїну TP53 і, таким чином, сприяють пригніченню росту пухлинних клітин при виключенні сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

Далі було досліджено як змінюється експресія генів *MDM2*, *PERP* і *USP7* за умови пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сенсорно -

сигнального ензиму ERN1. Отримані результати показують, що рівень експресії *MDM2* і *USP7* генів істотно не змінюється в клітинах гліоми з пригніченою тільки ендорибонуклеазною активністю сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в порівнянні з контрольними клітинами гліоми.

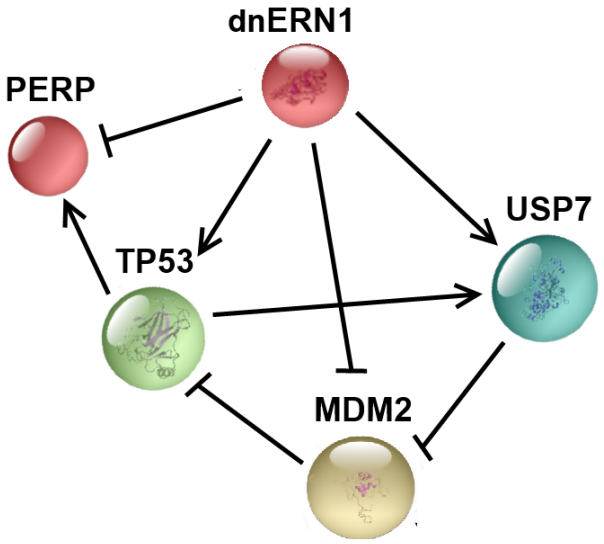


Рис. 4.1.1. Експресія генів *TP53*, *MDM2*, *PERP* і *USP7* за умови виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

Таким чином, зміни в рівні експресії генів *MDM2* і *USP7* в клітинах гліоми з блокованими обома ензиматичними активностями ERN1, можливо, опосередковані саме активністю кінази ERN1. У той же час, блокування активності ендорибонуклеази ERN1 в клітинах гліоми значно підвищує експресію гена *PERP*, а повне виключення ERN1 (обидві ферментативні активності) призводить до пригнічення експресії цього гена. Цілком можливо, що обидві ензиматичні активності ERN1 вносять свій вклад в регуляцію експресії гена *PERP*.

Результати цього дослідження чітко показали, що експресія генів, які кодують *MDM2*, *USP7* і *PERP*, є залежною від сенсорно - сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума і корелює з супресією пухлинного росту. Крім того, експресія генів *MDM2* і *USP7* залежить від кіназної активності

ензиму ERN, а експресія гена *PERP* контролюється обома активностями цього ензиму.

Для того щоб побачити як буде впливати стрес ендоплазматичного ретикулума на експресію *TP53, MDM2*, *USP7* і *PERP* за умови виключення тільки ендорибонуклеазної активності ензиму ERN1 був використаний тунікаміцин.

4.2. Роль TP53-залежних протеїнів у регуляції експресії та біологічної активності TP53 у клітинах гліоми за умови пригнічення сигнального ензиму ERN1

Було досліджено зміни в експресії гена *TP53* та залежних від нього протеїнів USP7, MDM2, PERP у клітинах гліоми лінії U87 трансфекованих dnrERN1 за умови додавання тунікаміцину. Тунікаміцин це антибіотик, який є інгібітором глікозилювання протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі, він блокує утворення доліхол-пірофосфат-N-ацетил-глюкозаміну (GlcNAc-P-P-Dol) — першого етапу доліхол-залежного шляху глікозилювання, що призводить до зупинки клітинного циклу під час фази G1 [231, 232]. В результаті цього виникає стрес ендоплазматичного ретикулума.

При індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином в гліомних клітинах з dnrERN1 спостерігали значне підвищення експресії *TP53*, обумовлене реакцією клітини на стресовий чинник. Але при цьому спостерігали невелике підвищення експресії *MDM2*, негативного регулятора TP53. Це може бути пояснено існуванням негативного зворотнього зв’язку між TP53 та MDM2. MDM2 блокує транскрипційну активність TP53, сприяє його експорту з ядра та стимулює його деградацію [107, 108, 111], але MDM2 також є і транскрипційною мішенню TP53, таким чином утворюючи негативний зворотній зв'язок [112-114]. Невелике зниження експресії USP7, убіквітин-специфічної протеази (USP), яка відноситься до родини цистеїнових протеаз, що є важливим членом сімейства деубіквітинуючих ензимів (DUB). Було

встановлено, що USP7, також відома як герпес-асоційована USP (HAUSP), відіграє важливе значення в розвитку пухлин, оскільки впливає на стабільність супресора пухлин TP53. USP7 відповідає за деубіквітинування TP53 та індукує залежний від TP53 апоптоз і тим самим сприяє пригніченню росту пухлини, також може сприяти підвищенню експресії *MDM2*. Так як USP7 має більш високу афінність зв'язування з MDM2, тим самим викликаючи стабілізацію MDM2 шляхом зниження його аутоубіквітинування і подальшої індукції деградації TP53. Таким чином, передбачається, що інгібування USP7 дестабілізує MDM2 і стабілізує TP53. Було повідомлено і про додаткові субстрат USP7, зокрема, класпін, FOXO4, PTEN, UHRF1. USP7 здатен здійснювать як TP53-залежний, так і TP53-незалежний ефект на контроль проліферації клітин і апоптоз. Цікаво відзначити, що регуляція деяких генів-супресорів пухлин, в тому числі TP53, PTEN, RB1, BRCA1 і UHRF1, порушується, або ж спостерігаються їх мутації при раку яєчників. Фактичні дані свідчать про те, що всі ці протеїни можуть регулюватися USP7. Більш того, деубіквітанзна активність HAUSP була спочатку ідентифікована при деубіквітинуванні TP53, але більш пізні дослідження показали, що Mdm2 і MdmX також є субстратами для HAUSP. HAUSP спочатку була ідентифікована як клітинний фактор, який звязується з регуляторним протеїном ICP0 вірусу простого герпесу типу 1 (HSV-1). Відкриття того факту, що вірус герпес-асоційованої убіквітин-специфічної протеази (HAUSP) може зв'язуватися і стабілізувати TP53 додає ще рівень регуляції шляху убіквітинування TP53 і є одним з індикаторів того, що DUBs володіють субстратною специфічністю. При наявності HAUSP, рівні TP53 стабілізуються в мірі достатній, щоб викликати зупинку росту клітин і апоптоз. Ця проста лінійна модель була порушена з відкриттям того, що транзієнтне міРНК-опосередковане зменшення або повне видалення HAUSP шляхом соматичного нокауту в HCT116 клітинах призводить до суттєвої стабілізації TP53, що суперечить запропонованій ролі HAUSP в стабілізації TP53. Одночасно з цим, було встановлено, що HAUSP взаємодіє з Mdm2 і володіє сильною деубіквітиназною активністю по

відношенню до протеїна, що веде до його стабілізації. Ці дані свідчать про те, що HAUSP-опосередковане деубіквітинування Mdm2 необхідне для підтримання достатнього рівня цього протеїна для, щоб він міг діяти в якості лігази Е3 для TP53. Якщо рівні HAUSP зменшуються до точки, де Mdm2 дестабілізується, пул Mdm2, доступний для убіквітинування TP53, стає недостатнім для деградації протеїна, і він стабілізується.

Для гена *PERP*, який задіяний в розвитку апоптозу і є ефектором для *TP53,* ми спостерігали зниження його експресії за умови виключення ERN1 при індукції стресу тунікаміцином.

При дослідженні експресії мРНК *RBL1*, який приймає участь в контролі клітинного циклу, проліферації, апоптозі та диференціації, було показано різке підвищення даного гена майже у два рази за умови виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в порівнянні з контролем. Між TP53 та *RBL1* є функціональний зв'язок, що призводить до підвищення експресії *TP53* [233]

Протеїн ретинобластоми p107 регулює пул попередників нейронів як в мозку організма, що розвивається, так і в дорослому мозку. Rb-подібні протеїни пригнічують ріст клітин завдяки інгібуванню переходу клітин з G1 до S фази клітинного циклу шляхом взаємодії, так званих, кишенькових регіонів цих протеїнів з E2F факторами транскрипції, здійснюючи на них негативний вплив. Протеїни родини Rb регулюються фосфорилюванням, і гіпофосфорильовані протеїни ретинобластоми зв'язуються з факторами E2Fs, пригнічуючи транскрипцію. Фосфорилювання циклін-залежними кіназами в нормальних клітинах призводить до вивільнення зв’язаних E2Fs факторів в залежний від клітинного циклу спосіб. Щонайменше, вісім E2F транскрипційних факторів, що експресуються в клітинах ссавців, були згруповані як активатори або репресори транскрипції.

Подальші функціональні дослідження показали, що втрата P107 при відсутності pRb призводить до зниження TP53-залежних проапоптичних сигналів за рахунок модуляції P63 і P73 ізоформ.

Важливий шлях, що ініціюється TP53, призводить до негативної регуляції великої кількості генів, які кодують протеїни, необхідні для переходу клітини до мітозу і перебігу цього процесу. P21 / waf1, транскрипційна мішень TP53, кодує протеїн, який пригнічує множинні CDKs, що веде до дефосфорилювання протеїнів родини Rb. В своїй слабко фосфорильованій формі, Rb протеїни зв'язуються з членами родини E2F, які, в свою чергу, зв'язуються зі специфічними промоторними елементами. Rb / E2F комплекси є потужними репресорами транскрипції і опосередковують негативну регуляцію генів, необхідних для фаз G2 і M, у відповідь на передачу сигналів від TP53. Коли E2F протеїни не зв’язні з Rb, вони можуть активувати транскрипцію багатьох генів, які пригнічуються під впливом комплексу Rb / E2F. Гени-мішені Rb / E2F мають важливе значення як для G1 / S, так і для G2 / M переходів клітинного циклу.

У той же час, експресія генів, що кодують *CSNK2,* була різною для генів окремих її субодиниць. Так, експресія мРНК *CSNK2A1* та *CSNK2A2,* які відповідають за фосфорилювання TP53, знижувалась. Хоча, фосфорилювання TP53 цими субодиницями CSNK2 може сприяти його активації, у той же час, воно призводить і до блокування кіназної активності більш сильного активатора TP53 – протеїнкінази С.[234]. Експресія ж мРНК *CSNK2B,* яка зв’язується з олігомеризаційним доменом TP53 і впливає на ДНК-зв’язуючу активність TP53 [235], навпаки, підвищувалась. Загалом, такі зміни в експресії субодиниць *CSNK2* також можуть робити внесок в підвищення експресії TP53.

При дослідженні експресії гена *TP53BP1*, основною функцією якого є участь у відповіді на пошкодження ДНК, за умов виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 спостерігається його зниження в порівнянні з контролем, що може бути пов’язане з роллю цього протеїну. [236]. Однак, для гена *TP53BP2* спостерігається підвищення його експресії в клітинах з пригніченою активністю сенсорно - сигнального ензиму ERN1 [12, 13]. Підвищення експресії цього гена сприяє більш високому рівню TP53 та збільшує його активність [222, 237, 238, 239]. TP53BP2 є членом ASPP

(апоптоз-стимулюючий протеїн TP53) сімейства TP53-взаємодіючих протеїнів, які необхідні для індукції TP53-опосередкованого апоптозу [240]. Протеїн TP53BP2 сприяє зв’язуванню з ДНК і трансактивації протеїнів сімейства TP53 на промоторах проапоптотичних генів. Таким чином, підвищення експресії гена *TP53BP2* може бути пов'язане з пригніченням проліферації клітин і зменшенням росту гліоми.

У той же час, експресія генів *NME6, TOPORS* і *ZMAT3* пригнічується в клітинах гліоми з виключеним сенсорно - сигнального ензиму ERN1 і це також може вносити внесок до пригнічення росту пухлин [12, 13]. *NME6* є інгібітором TP53-індукованого апоптозу і його пригнічення повинне посилювати апоптотичну функцію TP53. Крім того, NME6 є еволюційно консервативним ензимом, що бере участь у багатьох біологічних процесах, таких як метастазування, проліферація, диференціювання, розвиток, везикулярний транспорт та апоптоз у хребетних, але молекулярні механізми цих процесів досі в значній мірі невідомі. Родина NME, що ще має назву NDPK або Nm23, була названа в честь ідентифікації нового гена, пов'язаного з низьким метастатичним потенціалом. Нуклеозид дифосфат (NDP)-кіназна активність знайдена в різноманітних організмах від бактерій до людини. В організмі людини існують десять генів NME, які були розділені на дві групи в залежності від їх амінокислотної послідовності. Ці дві групи походять з генної дуплікації одного гена-попередника NDPK, яка, ймовірно, відбулася до або під час поширення багатоклітинних. В організмі людини гени NME беруть участь в найрізноманітніших фізіологічних або патологічних клітинних процесах, включаючи розвиток, метастазування, циліарні функції, диференціювання і проліферацію клітин як на тканинному, так і субклітинному рівнях[241, 242].

TOPORS функціонує як E3 сумо-1-протеїнлігаза і бере участь в рості клітин, проліферації та апоптозі, які регулюють стабільність TP53 через убіквітин-залежну деградацію [243], причому його активність контролюється POLO1 (POLO-like kinase 1) [129], експресія якої за умови пригнічення функції сенсорно-сигнального ензима ERN1 знижується майже в двічі. Що узгоджується

з літературними даними. Hyun S.-Y. та співавтори зазначають, що процес відновлення пошкодженнь ДНК, який відбувається під час зупинки клітинного циклу у контрольній точці, особливо при переході з фази G2 до M, вимагає активності Plk1, яка має суттєве значення для ініціації мітозу. Коли клітинний цикл відновлюється, реактивована Plk1 безпосередньо взаємодіє з послідовністю специфічного ДНК-зв'язуючого домену в складі p53, який у відповідь пригнічує власну транскрипційну активність, а також свою проапоптотичну функцію. Крім того, Plk1 опосередковано приймає участь у знижені фосфорилювання серину 15 p53, що порушує його взаємодію з MDM2, а також веде до зниження активності p53 і посилення його MDM2-опосередкованої деградації. Ця взаємодія між MDM2 і p53 також стимулюється за допомогою фосфорилювання серину 260 MDM2 під дією Plk1. Крім того, Plk1 фосфорилює серин 718 Topors, який має убіквітин- та і SUMO-1 Е3-лігазну активність і сприяє деградації p53 шляхом стимулювання взаємодії між Topors і p53. Також, Plk1 індукує експорт p53 з ядра під час зупинки клітинного циклу за допомогою активації GSTE1 (протеїн 1, що експресується під час G2 і S фаз) [129]. Ці дані демонструють, що підтримання балансу Plk1 і p53 захищає клітини від різних стресів і сприяє подоланню зупинок клітинного циклу. TOPORS індукує сумоїлування TP53, а також багатьох інших клітинних протеїнів [244]. Таким чином, пригнічення TOPORS в клітинах гліоми шляхом виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 може збільшити транскрипційну активність TP53, яка інгібується цим фактором, і може робити внесок до пригнічення росту клітин гліоми з пригніченою функцією ERN1 [12, 13].

Зниження майже вдвічі експресії мРНК POLO1, яка може викликати деградацію TP53 через MDM2-шлях та активувати Cdc25C фосфатазу, що здатна дефосфорилювати TP53 і спричиняти його деградацію [245], за умови пригнічення функції ERN1 також може сприяти активації TP53.

Виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми також призводить до зменшення експресії гена *ZMAT3*, але молекулярні

механізми цього співвідношення, поки не з'ясовані. Існують дані, що *ZMAT3* бере участь в TP53-залежному шляху регуляції росту через регуляцію експресії *TP53* і його транслокації до ядра, а також в регуляції РНК-опосередкованого сайленсингу генів. Wig1 (wild-type p53-induced gene 1 (ген 1, що індукується диким типом p53); офіційна назва гена - ZMAT3) кодує протеїн Cys2 His 2-типу цинкового пальця, що містить трои цинкові пальці (ZFs) і сигнал ядерної локалізації (NLS). Wig1 був ідентифікований як p53-залежний ген і є високо консервативним протеїном, що зустрічається в усіх організмах від риб до людей. Найбільша консервативність спостерігається в структурі ZFs. Wig1 взаємодіє з гетерогенним ядерним рибонуклеопротеїном (hnRNP) A2/B1 і RNA геліказою A (RHA) через dsRNA зв'язування і регулює p53 mRNA стабільність шляхом захисту від деаденілювання [242, 246, 247].

Отже, результати цього дослідження чітко показали, що експресія генів *NME6, TOPORS, ZMAT3, TP53BP1* та *TP53BP2*, є залежною від сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного ретикулума і корелює з супресією пухлинного росту. Вплив виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 на експресію досліджуваних генів схематично представлено на рис. 4.3.1.

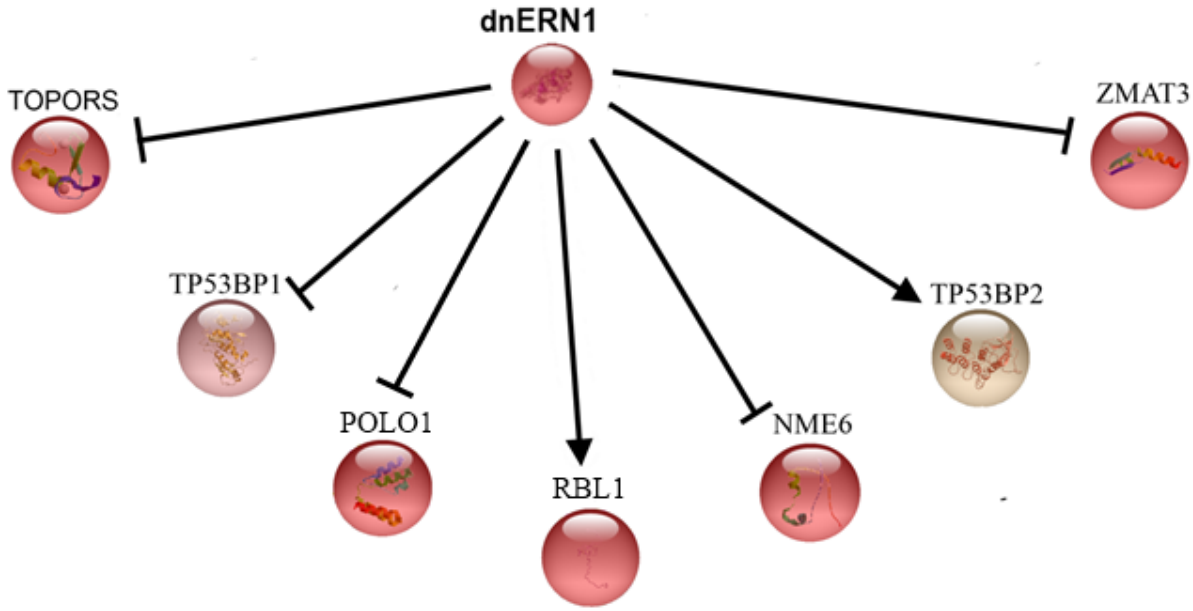


Рис.4.3.1 Вплив виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 (dnERN1) на експресію генів *POLO1, RBL1, NME6, TOPORS, ZMAT3, TP53BP1* і *TP53BP2*.

Наступним етапом було проведене дослідження з даними генами з використанням стресового фактора, який є невід'ємною умовою росту пухлин – гіпоксією.

4.3 Гіпоксична регуляція експресії TP53-залежних генів за умови пригнічення функціональної активності сигнального ензиму ERN1

Гіпоксія є потужним індуктором стресу ендоплазматичного ретикулума, що є причиною порушення його гомеостазу та нормального функціонування. Прийнято вважати оксигенацію, при якій в тканині міститься більше 10% кисню - фізіологічною, близько 0,5% - помірною та близько 0,1% - поганою, що відповідає сильно вираженій або тяжкій гіпоксії. За цього стану відбувається акумулювання незгорнутих чи помилково згорнутих протеїнів в просвіті ендоплазматичного ретикулума. Стрес ендоплазматичного ретикулума забезпечує зміни в метаболізмі клітин, що направлені на активацію ростових та прозапальних процесів, активує ангіогенез, а також толерантність до гіпоксії. Клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума відома як відповідь на незгорнуті протеїни та спрямована на відновлення нормального функціонування ендоплазматичного ретикулума за рахунок активації трансмембранних молекул, локалізованих в ендоплазматичному ретикулумі, серед яких найголовнішим є сенсорно - сигнальний ензим ERN1.

Дослідження показали, що гіпоксія неоднаково впливає на рівень експресії *TP53* та залежних від нього генів за умови пригнічення сенсорно - сигнального ензиму ERN1. Експресія генів *TP53, USP7* та *ZMAT3* зменшується за умов гіпоксії тільки в контрольних клітинах гліоми, але за умови виключення функції ензиму ERN1 дані гени проявляють чітку резистентність до умов гіпоксії. Стан гіпоксії є більш значущим для генів *MDM2* і *PERP*, так як спостерігалось підвищення їх експресії в обох типах клітин. Таким чином,

можемо сказати, що ефект гіпоксії на експресію генів *MDM2* і *PERP* залежить як від активності ERN1, так і від інших факторів[10, 14].

Було встановлено, що індуковані гіпоксією зміни в експресії генів за умови виключення функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1 призводять до збільшення експресії гена *TP53BP1* та надекспресії генів *TP53BP2* а також зниження експресії генів *RBL1*, *TOPORS*, *CSNK2B* і *NME6*. Отримані дані підсумовані в таблиці 4.3.1.

Таблиця 4.3.1.

Вплив гіпоксії на експресію *TP53* та залежних від нього генів за умов виключення ензиму ERN1

Умови досліду / Гени	dnERN1 vs контроль	Гіпоксії vs контроль	гіпоксія з dnERN1 vs dnERN1
TP53	↑	↓	—
MDM2	↓	↑	↑
USP7	↑	↓	—
PERP	↓↓	↑	↑
RBL1	↑	↓	↓
TP53BP1	↓	—	↑
TP53BP2	↑	↑	↑↑
POLO1	↓	↓	—
TOPORS	↓	↓	↓↓
NME6	↓	↓	↓↓
ZMAT3	↓	↓	—
CSNK2A1	↓	—	—
CSNK2A2	↓	↑	—
CSNK2B	↑	↓	↓

Отже, чітко простежується, що сенсорно - сигнальний ензим ERN1 бере участь в гіпоксичній регуляції експресії TP53-залежних генів. Також було виявлено, що гіпоксія призводить до стабілізації та підвищення активності TP53 та має більший ефект на експресію вище згадуваних генів в клітинах з dnERN1, ніж в контрольних клітинах, що добре корелює із зменшенням клітинної проліферації в клітинах з dnERN1.

Отримані нами дані вказують на те, що гіпоксія проявляє пропухлинний ефект, а інгібування сенсорно - сигнального ензиму ERN1 підвищує експресію не лише мРНК TP53, а і його активаторів (TP53BP1, USP7, TP53BP2 та CSNK2B), що узгоджується із пригніченням росту пухлини. Таким чином, стрес ендоплазматичного ретикулума і гіпоксія є необхідними компонентами злоякісного росту пухлин та існують складні відносини між наявністю гіпоксії і регуляцією шляхів клітинної загибелі [214, 248, 249, 250], які вимагають подальшого дослідження.

4.4. Роль дефіциту глутаміну та глюкози в регуляції експресії TP53-залежних генів за умови пригнічення функції сигнального ензиму ERN1

У цьому дослідженні було проаналізовано експресію *TP53* та залежних від нього генів в клітинах гліоми лінії U87 при стані гострого дефіциту глутаміну за умов виключення функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1, і показано, що дефіцит глутаміну впливає на експресію найбільш вивчених TP53-залежних генів і що ці зміни в експресії залежали від функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

Було встановлено, що ген *TP53* реагує на стан гострого дефіциту глутаміну підвищенням своєї експресії. Також спостерігалось підвищення експресії гена MDM2 – негативного регулятора TP53, що може бути обумовлене існуванням негативного зворотнього зв’язку між цими генами. Експресія генів *USP7*, *PERP*, *NME6* та *TP53BP2* не змінювалася за стану

дефіциту глутаміну за умови пригнічення сенсорно - сигнального ензиму ERN1, що вказує на їх резистентність до цих умов.

Експресія генів *TOPORS*, *TP53BP1* і *ZMAT3* збільшується за стану дефіциту глутаміну в контрольних клітинах гліоми, але пригнічення функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1 модифікує експресію цих генів: експресія *TP53BP1* і *ZMAT3* значно підвищується, а ген *TOPORS* стає резистентним до стану дефіциту глутаміну.

Цілком можливо, що дефіцит глутаміну може збільшувати вплив виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 на стабільність TP53 і його транскрипційну активність шляхом зміни експресії генів *TP53BP1* і *ZMAT3*, ініціюючи таким чином TP53-залежне пригнічення росту клітин і апоптоз.

Таблиця 4.4.1.

Вплив дефіциту глутаміну на експресію *TP53* та залежних від нього генів за умов виключення ензиму ERN1

Умови досліду / Гени	dnERN1 vs контроль	Дефіцит глутаміну vs контроль	Дефіцит глутаміну з dnERN1 vs dnERN1
TP53	↑	↑	↑↑
MDM2	↓	↑↑	↑↑
USP7	↑	↓	–
PERP	↓↓	–	–
TP53BP1	↓	↑	↑↑
TP53BP2	↑	↓	–
TOPORS	↓	↑	–
NME6	↓	–	–
ZMAT3	↓	↑	↑↑

Більше того, виключення сенсорно - сигнального ензиму ERN1 підсилює вплив дефіциту глутаміну на експресію генів *TP53*, *MDM2*, *TP53BP1*, *ZMAT3*, але нівелює його вплив на експресію генів *USP7*, *TP53BP2* та *TOPORS*. Дефіцит глутаміну не впливає на експресію генів *PERP* та *NME6* в обох типах досліджуваних клітин (табл. 4.4.1).

В наступному дослідженні було показано, що за умови дефіциту глюкози експресія гена *TP53* істотно не змінюється в контрольних клітинах гліоми, але індукується в клітинах з пригніченою функцією сенсорно - сигнального ензиму ERN1. Таким чином, збільшення експресії гена *TP53* може внести свій вклад в пригнічення росту клітин гліоми за умови пригнічення функціональної активності ERN1 через TP53-залежний шлях регуляції росту [239, 251]. За умови пригнічення активності ERN1 при дефіциті глюкози експресія гена *MDM2* показує невелике підвищення.

Показано також, що дефіцит глюкози у середовищі спричиняє зниження рівня експресії генів PERP, NME6 та TOPORS за умов дефіциту глюкози та пригнічення функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1. У той же час, рівень експресії генів USP7 та ZMAT3 не змінювався за умов дефіциту глюкози та пригнічення сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

Дослідження рівня експресії гена TP53BP1 показало його збільшення за умов дефіциту глюкози, однак, цей ефект був набагато сильніший у клітинах з пригніченою функцією сенсорно - сигнального ензиму ERN1. В той же час експресія гена TP53BP2 за цих умов підвищується в обох типах клітин гліоми.

Таблиця 4.4.2.

Вплив дефіциту глюкози на експресію *TP53* та залежних від нього генів за умов виключення ензиму ERN1

Умови досліду / Гени	dnERN1 vs контроль	Дефіцит глюкози vs контроль	Дефіцит глюкози з dnERN1 vs dnERN1
TP53	↑	–	↑
MDM2	↓	–	↑
USP7	↑	–	–
PERP	↓↓	–	↓
TP53BP1	↓	↑	↑↑
TP53BP2	↑	↑	↑
TOPORS	↓	↓	↓↓
NME6	↓	↓	↓
ZMAT3	↓	↑	–

Таким чином, експресія генів, які кодують TP53 та пов'язані з ним фактори (табл. 4.4.2), переважно залежить від дефіциту глюкози стресу ендоплазматичного ретикулуму, оскільки виявлені зміни корелюють з пригніченням росту пухлинних клітин при виключенні сенсорно - сигнального ензиму ERN1.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Результати даної роботи переконливо свідчать про виражений вплив сенсорно-сигнального ензиму ERN1 на експресію генів *TP53*, *MDM2*, *TP53BP1*, *ZMAT3*, *USP7*, *POLO1*, *CSNK2*, *RBL1*, *TP53BP2*, *TOPORS*, *PERP* та *NME6* за умов гіпоксії, дефіциту глюкози та глутаміну.

Пухлинні клітини в організмі весь час знаходяться в умовах стресу, а клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума дозволяє підтримувати функціональний стан та швидкий ріст пухлини. Ключову роль у процесі відповіді клітини на стрес ендоплазматичного ретикулума відіграє сенсорно - сигнальний ензим ERN1, який контролює експресію сотень генів різних регуляторних факторів, в тому числі й тих, що відповідають за пригнічення клітинного поділу та активацію апоптозу.

Таким чином, клітинна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного швидкого поділу, тому вплив на сигнальні шляхи клітинної відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума та виявлення потенційних генів-мішеней, можуть бути використані в якості стратегії для розробки нових протипухлинних ліків.

В цій роботі ми показали, що пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сенсорно - сигнального ензиму ERN1 має більш сильний вплив на швидкість проліферації клітин гліоми лінії U87, ніж блокування обох його активностей.

Результати наших досліджень продемонстрували, що пригнічення функції сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в клітинах гліоми U87 підвищує як рівень мРНК, так і рівень протеїну TP53, і зміна експресії гена *TP53* може бути залучена до пригнічення росту клітин, що спостерігалось при виключенні ERN1 в культурі клітин гліоми лінії U87.

Було встановлено, що експресія генів, які кодують *MDM2*, *USP7* і *PERP*, є залежною від сенсорно - сигнального ензиму ERN1 стресу ендоплазматичного

ретикулума і корелює з супресією пухлинного росту. Крім того, експресія генів *MDM2* і *USP7* залежить від кіназної активності ензиму ERN1, а експресія гена *PERP* контролюється обома активностями цього ензиму.

Також показано збереження чутливості експресії генів *TP53*, *USP7*, *MDM2* та *PERP* до дії тунікаміцину, індуктора стресу ендоплазматичного ретикулума, за умов виключення лише ендорибонуклеазної активності.

Результати проведених досліджень продемонстрували, що пригнічення функції гена *ERN1* в клітинах гліоми U87 підвищує рівень мРНК *TP53*, *USP7*, *TP53BP2* та пригнічує усі інші досліджувані гени. Показано, що зміна експресії даних генів може бути залучена до пригнічення росту пухлинних клітин, що спостерігалось при виключенні сенсорно - сигнального ензиму ERN1 у культурі клітин гліоми лінії U87.

Таким чином, було виявлено залежність змін у рівнях експресії мРНК *TP53*, *MDM2*, *TP53BP1*, *ZMAT3*, *POLO1*, *RBL1*, *CSNK2*, *POLO1*, *USP7*, *TP53BP2*, *TOPORS*, *PERP* та *NME6* за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози, що імітують ефекти ішемії, від функціональної активності ERN1, основного сенсорно-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулуму.

ВИСНОВКИ

Робота присвячена дослідженню ролі сенсорно - сигнального ензиму ERN1 в регуляції експресії гена TP53 та пов’язаних з ним протеїнів, які контролюють процеси апоптозу та проліферації, у клітинах гліоми лінії U87 за умов гіпоксії та дефіциту глюкози або глутаміну, що є надзвичайно важливим напрямком медико-біологічних досліджень і може сприяти виявленню перспективних генів-мішеней для розробки нових способів створення анти-пухлинних препаратів.

Наукове завдання вирішено шляхом експериментального дослідження експресії генів TP53, MDM2, TP53BP1, ZMAT3, RBL1, CSNK2, USP7, TP53BP2, TOPORS, PERP та NME6 за умов гіпоксії і дефіциту глутаміну або глюкози, що імітують ефекти ішемії, у клітинах гліоми з пригніченою функціональною активністю ензиму ERN1.

1. Встановлено, що експресія генів TP53, USP7, TP53BP2 і RBL1 посилюється, а MDM2, PERP, POLO1, TOPORS, TP53BP1, NME6 і ZMAT3 знижується у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функції ERN1.

2. Показано, що виключення лише ендорибонуклеазної активності ERN1 збільшує рівень експресії гена PERP та істотно не змінює рівень експресії генів TP53, MDM2 і USP7, але експресія всіх цих генів зберігає чутливість до індукції стресу ендоплазматичного ретикулума тунікаміцином.

3. Встановлено, що гіпоксія знижує рівень експресії генів TP53, USP7, RBL1, POLO1 та TOPORS і збільшує MDM2, PERP, TP53BP1, TP53BP2 та CSNK2B у клітинах гліоми, причому ефект гіпоксії на експресію більшості генів залежить від функції сигнального ензиму ERN1.

4. Показано, що рівень експресії генів TP53, MDM2, TOPORS, TP53BP1 та ZMAT3 збільшується у контрольних клітинах гліоми за умови дефіциту глутаміну у середовищі, а рівень USP7 і TP53BP2, при цьому, знижується. Виключення функції ензиму ERN1 істотно посилює ефект нестачі глутаміну на

експресію генів TP53, MDM2, TP53BP1 та ZMAT3, істотно не впливаючи на інші гени.

5. Встановлено, що дефіцит глюкози активує експресію генів ZMAT3, TP53BP1 і TP53BP2 та пригнічує NME6 і TOPORS, не впливаючи істотно на експресію генів TP53, MDM2, USP7 та PERP, але пригнічення ERN1 індукує чутливість експресії генів TP53, MDM2 та PERP до дефіциту глюкози.

Отримані результати розширюють уявлення про роль ERN1-сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії про-апоптотичних генів і процесів проліферації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wang S. The impact of the unfolded protein response on human disease / S. Wang, R. J. Kaufman // J. Cell Biol. – 2012. – Vol. 197, N 7. – P. 857 – 867.
2. Manié S. N. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update / S. N. Manié, J. Lebeau, E. Chevet // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2014. – Vol. 307, N 10. – P. 901 – 907.
3. Pluquet O. Watching the clock: endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer / O. Pluquet, N. Dejeans, E. Chevet // Ann. Med. – 2014. – Vol. 46, N 4. – P. 233 – 243.
4. Lee J. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases / J. Lee, U. Ozcan // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289, N 3. – P. 1203 – 1211.
5. Wu J. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response / J. Wu, R. J. Kaufman // Cell Death Differ. – 2006 – Vol. 13, N 3. – P. 374 – 384.
6. Backer M. V. Targeting the unfolded protein response in cancer therapy / M. V. Backer, J. M. Backer, P. Chinnaiyan // Methods Enzymol. – 2011. – Vol. 491. – P. 37 – 56.
7. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth / M. Bi, C. Naczki, M. Koritzinsky [et al.] // EMBO J. – 2005. – Vol. 24, N 19. – P. 3470 – 3481.
8. Thorpe J. A. IRE1alpha controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1 / J. A. Thorpe, S. R. Schwarze // Cell Stress Chaperones. – 2010. – Vol. 15, N 5. – P. 497 – 508.
9. Acute L-glutamine deprivation compromises VEGF-a upregulation in A549/8 human carcinoma cells / B. Drogat, M. Bouchecareilh, S. North [et al.] // J. Cell Physiol. – 2007. – Vol. 212, N 2. – P. 463 – 472.
10. Koumenis C. E. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression / C. E. Koumenis // Curr. Mol. Med. – 2006. – Vol. 6, N 1. – P. 55 – 69.

11. Мінченко О. Г. Стрес ендоплазматичного ретикулума, його сенсорно-сигнальні системи та роль у регуляції експресії генів за злоякісного росту і гіпоксії / О. Г. Мінченко, А. П. Харькова, Т. В. Бакалець, І. В. Кривдюк // Укр. біохім. ж. – 2013. – Т. 85, N 5. – С. 5 – 16.

12. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma / G. Auf, A. Jabouille, S. Guerit [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, N 35. – P. 15553 – 15558.

13. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo / B. Drogat, P. Auguste, D. T. Nguyen [et al.] // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67, N 14. – P. 6700 – 6707.

14. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown / D. O. Minchenko, K. I. Kubajchuk, O. O. Ratushna [et al.] // Adv. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 2, N 2. – P. 198 – 206.

15. Чумаков П. М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П. М. Чумаков // Успехи биол. химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3 – 52.

16. Lane D. P. Cancer. p53, guardian of the genome / D. P. Lane // Nature. – 1992. – Vol. 358, N 6381. – P. 15 – 16.

17. Riley T. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – Vol. 9, N 5. – P. 402 – 412.

18. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas / J. D. Oliner, K. W. Kinzler, P. S. Meltze, [et al.] // Nature. – 1992. – Vol. 358, N 6381. – P. 80 – 83.

19. Berger A. H. A continuum model for tumour suppression / A. H. Berger, A. G. Knudson, P. P. Pandolfi // Nature. – 2011. – Vol. 476, N 7359. – P. 163–169.

20. Biochemical functions of oncogenes / S. I. Rayter, K. K. Iwata, R. W. Michitsch [et al.] In: Oncogenes (Ed. By D.M. Glover, B.D. Hames), Oxford // University Press - New York – 1989. – Vol. 268, N 1. – P. 23 – 66.

21. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways / The Cancer Genome Atlas Research Network // Nature. – 2008. – Vol. 455, N 7438. – P. 1061 – 1068.

22. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer / The Cancer Genome Atlas Research Network // Nature. – 2012. – Vol. 487, N 7407. – P. 330 – 337.

23. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma / The Cancer Genome Atlas Research Network // Nature. – 2011. – Vol. 474, N 7353. – P. 609 – 615.

24. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 / R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom [et al.] // Cancer Cell. – 2010. – Vol. 17, N 1. – P. 98 – 110.

25. Identification of tumor suppressors and oncogenes from genomic and epigenetic features in ovarian cancer / K.O. Wrzeszczynski, V. Varadan, J. Byrnes, [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 12. – P. e28503.

26. Forbes S. A. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer / S. A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. D945 – D950.

27. Sherr C. J. Principles of Tumor Suppression / C. J. Sherr // Cell. – 2004. – Vol. 116, N 2. – P. 235 – 246.

28. Баранова А. В. Гены-супрессоры опухолевого роста / А. В. Баранова, Н. К. Янковский // Молекулярная биология. – 1998. – Т. 32, N 2. – С. 206 – 218.

29. Knudson A. G, JR. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma / A. G. Knudson, JR. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1971. – Vol. 68, No. 4. – P. 820 – 823.

30. Chial H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer / H. Chial // Nature Education. – 2008. – Vol. 1, N 1. – P. 33.

31. Shlien A. Copy number variations and cancer susceptibility / A. Shlien, D. Malkin // Curr. Opin. Oncol. – 2010. – Vol. 22, N 1. – P. 55 – 63.

32. Ting A. H. The cancer epigenome–components and functional correlates / A. H. Ting, K. M. McGarvey, S. B. Baylin // Genes Dev. – 2006. – Vol. 20, N 23. – P. 3215 – 3231.

33. Chen C. Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors / C. Z. Chen // New Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353, N 17. – P. 1768 – 1771.

34. Hammond S. M. MicroRNAs as tumor suppressors / S. M. Hammond // Nat. Genet. – 2007. – Vol. 39, N 5. – P. 582 – 583.

35. Zhang B. H. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors / B. H. Zhang, X. P Pan, G. P. Cobb, T. A. Anderson // Dev. Biol. – 2007. – Vol. 302, N 1. – P. 1 – 12.

36. Prensner J. R. The emergence of lncRNAs in cancer biology / J. R. Prensner, A. M Chinnaiyan // Cancer Discov. – 2011. – Vol. 1, N 5. – P. 391 – 407.

37. Croce C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer / C. M. Croce // Nat. Rev. Genet. – 2009. – Vol. 10, N 10. – P. 704 – 714.

38. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells / Y. Shimono, M. Zabala, R. W. Cho [et al.] // Cell. – 2009. – Vol. 138, N 3. – P. 592 – 603.

39. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes / G.L. Dalgliesh, K Furge, C Greenman [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 463, N 7279. – P. 360 – 363.

40. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer / G. van Haaften, G. L. Dalgliesh, H. Davies [et al.] // Nat. Genet. – 2009. – Vol. 41, N 5. – P. 521 – 523.

41. Payne S. R. Tumor suppressor genetics / S. R. Payne, C. J. Kemp // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26, N 12. – P. 2031 – 2045.

42. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility / A. Alimonti, A. Carracedo, J. G. Clohessy, [et al.] // Nat. Genet. – 2010. – Vol. 42, N 5. – P. 454 – 458.

43. Mills K. D. Tumor suppression: Putting p53 in context / K. D. Mills // Cell. Cycle. – 2013. – Vol. – 12, N 22. – P. 3461 – 3462.

44. Golubovskaya V. M. Targeting the p53 pathway / V. M. Golubovskaya, W. G. Cance // Surg. Oncol. Clin. N. Am. – 2013. – Vol. 22, N 4. – P. 747 – 764.

45. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a / M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, [et al.] // Cell. – 1997. – Vol. 88, N 5. – P. 593 – 602.

46. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein / G. I. Evan, A. H. Wyllie, C. S. Gilbert, [et al] // Cell. – 1992. – Vol. 69, N 1. – P. 119 – 128.

47. Smith A. E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40 / A. E. Smith, R. Smith, E. Paucha // Cell. – 1979. – Vol. 18, N 2. – P. 335 – 346.

48. Kress M. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum / M. Kress, E. May, R. Cassingena, P. May // Journal of Virology. – 1979. – Vol. 31, N 2. – P. 472 – 483.

49. Lane D. P. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells / D. P. Lane, L. V. Crawford // Nature. – 1979. – Vol. 278, N 5701 – P. 261 – 263.

50. Linzer D. I. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells / D. I. Linzer, A. J. Levine // Cell. – 1979. – Vol. 17, N 1. – P. 43 – 52.

51. Melero J. A. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells / J. A. Melero, D. T. Stitt, W. F. Mangel, R. B. Carroll // Virology. – 1979. – Vol. 93, N 2. – P. 466 – 480.

52. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse / A. B. DeLeo, G. Jay, E. Appella [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76, N 5. – P. 2420 – 2424.

53. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells / D. Eliyahu, A. Raz, P. Gruss [et al.] // Nature. – 1984. – Vol. 312, N 5995. – P. 646 – 649.

54. Jenkins J. R. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53 / J. R. Jenkins, K. Rudge, G. A.Currie // Nature. – 1984. – Vol.312, N5995. – P. 651 – 654.

55. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation / L. F. Parada, H. Land, R. A. Weinberg [et al.] // Nature. – 1984. – Vol. 312, N 5995. P. 649 – 651.

56. Eliyahu D. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic / D. Eliyahu, D. Michalovitz, M. Oren // Nature. – 1985. – Vol. 316, N 6024. – P. 158 – 160.

57. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas / S. J. Baker, E. R. Fearon, J. M. Nigro [et al.] // Science. – 1989. – Vol. 244, N 4901. – P. 217 – 221.

58. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms / D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong [et al.] // Science. – 1990. – Vol. 250, N 4985. – P. 1233 – 1238.

59. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome / S. Srivastava, Z. Q. Zou, K. Pirollo [et al.] // Nature. – 1990. – Vol. 348, N 6303. – P. 747 – 749.

60. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours / L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle [et al.] // Nature. – 1992. – Vol. 356, N 6366. – P. 215 – 221.

61. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes / S. W. Lowe, E. M. Schmitt, S. W. Smith [et al.] // Nature. – 1993. – Vol. 362, N 6423. – P. 847 – 849.

62. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes/ A. Petitjean, M. I. Achatz, A. L. Borresen-Dale [et al.] // Oncogene. – 2007. – Vol. 26, N 15. – P. 2157 – 2165.

61. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene / G. Matlashewski, P. Lamb, D. Pim, [et al.] // EMBO J. – 1984. – Vol. 3, N 13. – P. 3257 – 3262.

64. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13 / M. Isobe, B. S. Emanuel, D. Givol, [et al.] // Nature. – 1986. – Vol. 320, N 6057. – P. 84 – 85.

65. May P. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein / P. May, E. May // Oncogene. – 1999. – Vol. 18, N 53. – P. 7621 – 7636.

66. Courtois S. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms / S. Courtois, C. C. de Fromentel, P. Hainaut // Oncogene. – 2004. – Vol. 23, N 3. – P. 631 – 638.

67. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity / J. C. Bourdon, K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, [et al.] // Genes & Development. – 2005. – Vol. 19, N 18. – P. 2122 – 2137.

68. Mills A. A. p53: link to the past, bridge to the future / A. A. Mills // Genes & Development. – 2005. – Vol. 19, N 18. – P. 2091 – 2099.

69. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint / G. Rohaly, J. Chemnitz, S. Dehde, [et al.] // Cell. – 2005. – Vol. 122, N 1. – P. 21 – 32.

70. Mills A. A. p63: Oncogene or tumor suppressor? / A.A. Mills // Current Opinion in Genetics & Development. – 2006. – Vol. 16, N 1. – P. 38 – 44.

71. Moll U. M. p63 and p73: roles in development and tumor formation / U. M. Moll, N. Slade // Molecular Cancer Research. – 2004. – Vol. 2, N 7. – P. 371 – 386.

72. Malaguarnera R. p53 family proteins in thyroid cancer / R. Malaguarnera, V. Vella, R. Vigneri, F. Frasca // Endocrine-Related Cancer. – 2007. – Vol. 14, N 1. – P. 43 – 60.

73. Reich N. C. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells / N. C. Reich, A. J. Levine // Nature. – 1984. – Vol. 308, N 5955. – P. 199 – 201.

74. Ginsberg D. Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene / D. Ginsberg, M. Oren, M. Yaniv, J Piette // Oncogene. – 1990. – Vol. 5, N 9. – P. 1285 – 1290.

75. c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif / D. Reisman, N. B. Elkind, B. Roy, [et al.] // Cell Growth Differ. – 1993. – Vol. 4, N 2. – P. 57 – 65.

76. Tuck S. P. Characterization of the human p53 gene promoter / S. P. Tuck, L. Crawford // Mol. Cell. Biol. – 1989. – Vol. 9, N 5. – P. 2163 – 2172.

77. Deffie A. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription / A. Deffie, H. Wu, V. Reinke, G. Logano // Mol. Cell. Biol. – 1993. – Vol. 13, N 6. – P. 3415 – 3423.

78. Reisman D. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene / Reisman D, Rotter V // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol. 21, N 2. – P. 345 – 350.

79. Roy B. Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors / B. Roy, J. Beamon, E. Baliant, D. Reisman // Mol. Cell. Biol. – 1994. – Vol. 14, N 12. – P. 7805 – 7815.

80. Stuart E. T. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression / E. T. Stuart, R. Haffner, M. Oren, P. Gruss // EMBO J. – 1995. – Vol. 14, N 22. – P. 5638 – 5645.

81. Furlong E. M. YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity / E. M. Furlong, T. Rein, F. Martin // Mol. Cell. Biol. – 1996. – Vol. 16, N 10. – P. 5933 – 5945.

82. Lee M. Transcription of the rat p53 gene is mediated by factor binding to two recognition motifs of NF1-like protein / M. Lee, H. Song, S. Park, J. Park // Biol. Chem. – 1998. – Vol. 379, N 11. – P. 1333 – 1340.

83. Levine A. J. The first 30 years of p53: growing ever more complex / A. J. Levine, M. Oren // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9, N 10. – P. 749 – 758.

84. Zhang. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy / Zhang, H. Wang // Curr. Pharm. Des. – 2000. – Vol. 6, N 4. – P. 393 – 416.

85. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression / C. Venot, M. Maratrat, C. Dureuil, [et al.] // EMBO J. – 1998. – Vol. 17, N 16. – P. 4668 – 4679.

86. LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity / S. Larsen, T. Yokochi, E. Isogai, [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010. – Vol. 392, N 3. – P. 252 – 257.

87. Melino G. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. / G. Melino, X. Lu, M. Gasco, T. Crook, R. A. Knight // Trends Biochem. Sci. – 2003. – Vol. 28, N 12. – P. 663 – 670.

88. Belyi V. A. One billion years of p53/p63/p73 evolution / V. A. Belyi, A. J. Levine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, N 42. – P. 17609 – 17610.

89. Harms K. L. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant / K. L. Harms, X. Chen // Mol. Cell. Biol. – 2005. – Vol. 25, N 5. – P. 2014 – 2030.

90. Brandt T. Conservation of DNA-binding specificity and oligomerisation properties within the p53 family / T. Brandt, M. Petrovich, A. C. Joerger, D. B. Veprintsev // BMC Genomics. – 2009. – Vol. 10. – P. 628.

91. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53 / T. S. Davison, C. Vagner, M. Kaghad, [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 26. – P. 18709 – 18714.

92. A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism / Z. Serber, H. C. Lai, A. Yang, [et al.] // Mol. Cell Biol. – 2002. – Vol. 22, N 24. – P. 8601 – 8611.

93. Liu G. The C-terminal sterile alpha motif and the extreme C-terminus regulate the transcriptional activity of the alpha isoform of p73 / G. Liu, X. Chen // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280, N 20. – P. 20111 – 20119.

94. Khoury M. P. The isoforms of the p53 protein / M. P. Khoury, J. C. Bourdon // Cold Spring Harbor Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. a000927.

95. Harms K. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors / K. Harms, S. Nozell, X. Chen // Cell Mol. Life Sci. – 2004. – Vol. 61, N 7. – P. 822 – 842.

96. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein / M. Oren // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 51. – P. 36031 – 36034.

97. Vousden K. H. Live or let die: the cell's response to p53 / K. H. Vousden, X. Lu // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – Vol. 2, N 8. – P. 594 – 604.

98. Bode A. M. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis / A. M. Bode, Z. Dong // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – Vol. 4, N 10. – P. 793 – 805.

99. Vogelstein B. Surfing the p53 network / B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine // Nature. – 2000. – Vol. 408, N 6810. – P. 307 – 310.

100. Appella E. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses / E. Appella, C. W. Anderson // Eur. J. Biochem. – 2001. – Vol. 268, N 10. – P. 2764 – 2772.

101. Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications / Y. Xu // Cell Death Differ. – 2003. – Vol. 10, N 4. – P. 400 – 403.

102. Brooks C. L. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation / C. L. Brooks, W. Gu // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2003. – Vol. 15, N 2. – P. 164 – 171.

103. Tang Y. Acetylation is indispensable for p53 activation / Y. Tang, W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, W. Gu // Cell. – 2008. – Vol. 133, N 4. – P. 612 – 626.

104. Levine A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division / A. J. Levine // Cell. – 1997. – Vol. 88, N 3. – P. 323 – 331.

105. Maltzman W. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells / W. Maltzman, L. Czyzyk // Mol. Cell. Biol. – 1984. – Vol. 4, N 9. – P. 1689 – 1694.

106. Maheswaran S. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis / S. Maheswaran, C. Englert, P. Bennett, G. Heinrich, D. A. Haber // Genes Dev. – 1995. – Vol. 9, N 17. – P. 2143 – 2156.

107. Haupt Y. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 / Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren // Nature. – 1997. – Vol. 387, N 6630. – P. 296 – 299.

108. Kubbutat M. H. Regulation of p53 stability by Mdm2 / M. H. Kubbutat, S. N. Jones, K. H. Vousden // Nature. – 1997. – Vol. 387, N 6630. – P. 299 – 303.

109. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells / S. Y. Fuchs, V. Adler, T. Buschmann, [et al.] // Genes Dev. – 1998. – Vol. 12, N 17. – P. 2658 – 2663.

110. Oliner J. D. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas / J. D. Oliner, K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George, B. Vogelstein // Nature. – 1992. – Vol. 358, N 6381. – P. 80 – 83.

111. Honda R. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53 / R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda // FEBS Letters. – 1997. – Vol. 420, N 1. – P. 25 – 27.

112. Momand J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation / J. Momand, G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, A. J. Levine // Cell. – 1992. – Vol. 69, N 7. – P. 1237 – 1245.

113. Picksley S. M. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? / S. M. Picksley, D. P. Lane // Bioessays. – 1993. – Vol. 15, N 10. – P. 689 – 690.

114. Moll U. M. The MDM2-p53 Interaction / U. M. Moll, O. Petrenko // Mol. Cancer Res. – 2003. – Vol. 1, N 14. – P. 1001 – 1008.

115. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2 / A. Shvarts, W. T. Steegenga, N. Riteco, [et al.] // EMBO J. – 1996. – Vol. 15, N 19. – P. 5349 – 5357.

116. Wang X. Mdm2 and MdmX partner to regulate p53 / X. Wang, X. Jiang // FEBS Lett. – 2012. – Vol. 586, N 10. – P. 1390 – 1396.

117. Marine J. C. Mdmx and Mdm2: brothers in arms? / J. C. Marine, A. G. Jochemsen // Cell Cycle. – 2004. – Vol. 3, N 7. – P. 900 – 904.

118. Marine J. C. Mdmx as an essential regulator of p53 activity / J. C. Marine, A. G. Jochemsen // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – Vol. 331, N 3. – P. 750 – 760.

119. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73 / M. Zdzalik, K. Pustelny, S. Kedracka-Krok, [et al.] // Cell Cycle. – 2010. – Vol. 9, N 22. – P. 4584 – 4591.

120. Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity / D. Danovi, E. Meulmeester, D. Pasini, [et al.] // Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 24, N 13. – P. 5835 – 5843.

121. Kruse J. P. Modes of p53 regulation / J. P. Kruse, W. Gu // Cell. – 2009. – Vol. 137, N 4. – P. 609 – 622.

122. Vousden K. H. Blinded by the light: The growing complexity of p53 / K. H. Vousden, C. Prives // Cell. – 2009. – Vol. 137, N3. – P. 413 – 431.

123. Marine J. C. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond / J. C. Marine, G. Lozano // Cell Death Differ. – 2010. – Vol. 17, N 1. – P. 93 – 102.

124. p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions / M. M. Candeias, L. Malbert-Colas, D. J. Powell, [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2008. – Vol. 10, N 9. – P. 1098 – 1105.

125. Takagi M. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin / M.Takagi, M. J. Absalon, K. G. McLure, M. B. Kastan // Cell. – 2005. – Vol. 123, N 1. – P. 49 – 63.

126. Wang C.H. A shRNA functional screen reveals Nme6 and Nme7 are crucial for embryonic stem cell renewal / C.H. Wang, N. Ma, Y.T. Lin [et al.] // Stem Cells. – 2012. – Vol. 30, N 10. – P. 2199 – 2211.

127. TP53BP1 suppresses tumor growth and promotes susceptibility to apoptosis of ovarian cancer cells through modulation of the Akt pathway / S. Hong, X. Li, Y. Zhao [et al.] // Oncol. Rep. – 2012. – Vol. 27, N 4. – P. 1251 – 1257.

128. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis // F. He, L. Mo, X.Y. Zheng [et al.] // Cancer Res. 2009. – Vol. 69, N 24. – P. 9413 – 9421.

129. Hyun S.-Y. Polo-like kinase-1 in DNA damage response / Hyun S.-Y., Hwan H.-In., Jang Y.-J. // BMB Rep. – 2014. – Vol. 47, N 5. – P. 249 – 255.

130. Hessenauer A. CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response / A. Hessenauer, C.C. Schneider, C. Gotz, M. Montenarh // Cell. Signal. – 2011. – Vol. 23. – P. 145 – 151.

131. Wang CH, Ma N, Lin YT, et al. A shRNA functional screen reveals Nme6 and Nme7 are crucial for embryonic stem cell renewal. Stem Cells 2012; 30: 2199-211.

132. Desvignes T, Pontarotti P, Fauvel C, Bobe J. Nme protein family evolutionary history, a vertebrate perspective. BMC Evol Biol 2009; 9: 256.].

133. Noon AT, Goodarzi AA. 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. DNA Repair (Amst) 2011; 10:1071-6.

134. Li S, Shi G, Yuan H, et al. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP. Oncol Rep 2012; 28: 133-140.

135. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. Cell 2008; 134: 451-60.

136. J Cell Physiol. 2013 Mar;228(3):525-35. doi: 10.1002/jcp.24170. Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. Indovina P1, Marcelli E, Casini N, Rizzo V, Giordano A.

137. J Neurochem. 2015 Jun;133(6):828-43. doi: 10.1111/jnc.13083. Epub 2015 Mar 25. The intracellular domain of L1CAM binds to casein kinase 2α and is neuroprotective via inhibition of the tumor suppressors PTEN and p53. Wang Y1, Schachner M1.

138. Hessenauer, A., Schneider, C.C., Gotz, C. and Montenarh, M. (2011) CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response. Cellular Signalling, 23, 145-151.

139. Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration / R. Bravo, V. Parra, D. Gatica, [et al.] // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2013. – Vol. 301. – P. 215 – 290.

140. Oikawa D. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1 / D. Oikawa, Y. Kimata, K. Kohno // J. Cell. Sci. – 2007. – Vol. 120, N 9. – P. 1681 – 1688.

141. Glimcher L. H. XBP1: the last two decades / L. H. Glimcher // Ann. Rheum. Dis. – 2010. – Vol. 69, N 1. – P. i67 – i71.

142. Hollien J. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response / J. Hollien, J. S. Weissman // Science. – 2006. – Vol. 313, N 5783. – P. 104 – 107.

143. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 / F. Urano, X. Wang, A. Bertolotti, [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 287, N 5453. – P. 664 – 666.

144. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta / T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 403, N 6765. – P. 98 – 103.

145. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage / E. Bobrovnikova-Marjon, C. Grigoriadou, D. Pytel, [et al.] // Oncogene. – 2010. – Vol. 29, N 27. – P. 3881 – 3895.

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

147. Rutkowski D. T. A trip to the ER: coping with stress / D. T. Rutkowski, R. J. Kaufman // Trends Cell. Biol. – 2004. – Vol. 14, N 1. – P. 20 – 28.

148. Lee A. H, Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1 / A. H. Lee, E. F. Scapa, D. E. Cohen, L. H. Glimcher // Science. – 2008. – Vol. 320, N 5882. – P. 1492 – 1496.

149. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators / D. T. Rutkowski, J. Wu, S. H. Back, [et al.] // Dev Cell. – 2008. – Vol. 15, N 6. – P. 829 – 840.

150. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice / H. L. Kammoun, H. Chabanon, I. Hainault, [et al.] // J. Clin Invest. – 2009. – Vol. 119, N 5. – P. 1201 – 1215.

151. PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. / E. Bobrovnikova-Marjon, G. Hatzivassiliou, C. Grigoriadou, [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – Vol. 105, N 42. – P. 16314 – 16319.

152. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes / U. Ozcan, Q. Cao, E. Yilmaz, [et al.] // Science – 2004. – Vol. 306, N 5695. – P. 457 – 461.

153. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity / S. Fu, L. Yang, P. Li, [et al.] // Nature – 2011. – Vol. 473, N 7348. – P. 528 – 531.

154. Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease / G. S. Hotamisligil // Cell – 2010. – Vol. 140, N 6. – P. 900 – 917.

155. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress / K. Yamamoto, K. Takahara, S. Oyadomari, [et al.] // Mol. Biol. Cell – 2010. – Vol. 21, N 17. – P. 2975 – 2986.

156. The unfolded protein response transducer IRE1α prevents ER stress-induced hepatic steatosis / K. Zhang, S. Wang, J. Malhotra, [et al.] // EMBO J. – 2011. – Vol. 30, N 7. – P. 1357 – 1375.

157. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin / C. Vecchi, G. Montosi, K. Zhang, [et al.] // Science – 2009. – Vol. 325, N 5942. – P. 877 – 880.

158. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction / Y. Zhou, J. Lee, C. M. Reno, [et al.] // Nature Med. – 2011. – Vol. 17, N 3. – P. 356 – 365.

159. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1 / A. M. Reimold, A. Etkin, I. Clauss, [et al.] // Genes Dev. – 2000. – Vol.14, N 2. – P. 152 – 157.

160. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1 / N. N. Iwakoshi, A. H. Lee, P. Vallabhajosyula, [et al.] // Nature Immunol. – 2003. – Vol. 4, N 4. – P. 321 – 329.

161. Lee A. H. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands / A. H. Lee, G. C. Chu, N. N. Iwakoshi, L. H. Glimcher, // EMBO J. – 2005. – Vol. 24, N 24. 4368 – 4380.

162. Iwawaki T. IRE1α disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase of blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level / T. Iwawaki, R. Akai, K. Kohno, // PLoS One – 2010. – Vol. 5, N 9. – P. e13052.

163. XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum / W. J. Huh, E. Esen, J. H. Geahlen, [et al.] // Gastroenterology – 2010. – Vol. 139, N 6. 2038 – 2049.

164. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk–/– mice reveals a role for translational control in secretory cell survival / H. P. Harding, H. Zeng, Y. Zhang, [et al.] // Mol. Cell – 2001. – Vol. 7, N 6. – P. 1153 – 1163.

165. Wang Y. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis / Y. Wang, L. Vera, W. H. Fischer, M. Montminy, // Nature – 2009. – Vol. 460, N 7254. – P. 534–537.

166. Surviving endoplasmic reticulum stress is coupled to altered chondrocyte differentiation and function / K. Y. Tsang, D. Chan, D. Cheslett, [et al.] // PLoS Biol. – 2007. – Vol. 5, N 3. – P. e44.

167. Kanehisa M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets / M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, M. Tanabe // Nucleic Acids Res. – 2012. – Vol. 40. – P. D109 – D114.

168. Dang C. V. Oncogenic alterations of metabolism / C. V. Dang, G. L. Semenza // Trends in biochemical sciences – 1999. – Vol. 24, N 2. – P. 68 – 72.

169. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH / J. Chiche, K. Ilc, J. Laferrière, [et al.] // Cancer research – 2009. – Vol. 69, N 1. – P. 358 – 368.

170. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice / P. Sonveaux, F. Végran, T. Schroeder, [et al.] // J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 118, N 12. – P. 3930 – 3942.

171. Hockel M. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects / M. Hockel, P. Vaupel // J. Natl. Cancer Inst. – 2001. – Vol. 93, N 4. – P. 266 – 276.

172. Ratcliffe P. J. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression / P. J. Ratcliffe, J. F. O'Rourke, P. H. Maxwell, C. W. Pugh // J. Exp. Biol. – 1998. – Vol. 201, N 8. – P. 1153 – 1162.

173. Semenza G. L. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 106, N 6. – P. 809 – 812.

174. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth / P. H. Maxwell, G. U. Dachs,

J. M. Gleadle, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94, N 15. – P. 8104 – 8109.

175. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth / H. E. Ryan, M. Poloni, W. McNulty, [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60, N 15. – P. 4010 – 4015.

176. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis / P. Carmeliet, Y. Dor, J. M. Herbert, [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 394, N 6692. – P. 485 – 490.

177. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment / B. Blouw, H. Song, T. Tihan, [et al.] // Cancer Cell. – 2003. – Vol. 4, N 2. – P. 133 – 146.

178. Hochachka P. W. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack / P. W. Hochachka, L. T. Buck, C. J. Doll, S. C. Land // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93, N 18. – P. 9493 – 9498.

179. Gordan J. D. Hypoxia-inducible factors: Central regulators of the tumor phenotype / J. D. Gordan, M. C. Simon // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2007. – Vol. 17, N 1. – P. 71 – 77.

180. Jennifer S. I. Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT) Promotes Oxygen-independent Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1α by Modulating an Hsp90-dependent Regulatory Pathway / S. I. Jennifer, Yun-Jin Jung, Len Neckers // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 16. – P. 16128 – 16135.

181. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation / J. K. Brunelle, E. L. Bell, N. M. Quesada, [et al.] // Cell Metab. – 2005. – Vol. 1, N 6. – P. 409 – 414.

182. Semenza G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 / G. L. Semenza, P. H. Roth, H. M. Fang, G. L. Wang // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269, N 38. – P. 23757 – 23763.

183. Kim J. W. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / J. W. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, C. V. Dang // Cell Metab. – 2006. – Vol. 3, N 3. – P. 177 – 185.

184. Papandreou I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim, N. C. Denko // Cell. Metab. – 2006. – Vol. 3, N 3. – P. 187 – 197.

185. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: Possible links between cell metabolism and stabilization of HIF / P. Koivunen, M. Hirsila, A. M. Remes, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, N 7. – P. 4524 – 4532.

186. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability / J. S. Isaacs, Y. J. Jung, D. R. Mole, [et al.] // Cancer Cell. – 2005. – Vol. 8, N 2. – P. 143 – 153.

187. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-a prolyl hydroxylase / M. A. Selak, S. M. Armour, E. D. MacKenzie, [et al.] // Cancer Cell. – 2005. – Vol. 7, N 1. – P. 77 – 85.

188. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1 / B. H. Jiang, G. Jiang, J. Z. Zheng, [et al.] // Cell Growth Differ. – 2001. – Vol. 12, N 7. – P. 363 – 369.

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

190. Expression and hypoxia-responsiveness of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in the mammary gland malignant cell lines / Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ogura T. [et al.] //Acta Biochim. Pol. – 2005. – Vol. 52, N 4. – P. 881 – 888.

191. Експресія мРНК HIF-1, HIF-2 та VHL у різних лініях клітин при гіпоксії. / А. Ю. Бобарикіна, Д. О. Мінченко, І. Л. Опентанова, [та ін.] // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т. 78, N 2. – С. 62 – 72.

192. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in the lung tumor / O. H. Minchenko, T. Ogura, I. L. Opentanova, [et al.] // Укр. біохім. ж. – 2005. – Т. 77, N 6. – С. 46 – 50.

193. Harding H.P. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase / H.P. Harding, Y. Zhang, and D. Ron // Nature. – 1999. – Vol. 397. P. 271–274.

194. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2a / C. Koumenis, C. Naczki, M. Koritzinsky, [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2002. – Vol. 22, N 21. – P. 7405 – 7416.

195. Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control / M. Koritzinsky, M. G. Magagnin, T. van den Beucken, [et al.] // EMBO J. – 2006. – Vol. 25, N 5. – P. 1114 – 1125.

196. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth / L. Liu, T. P. Cash, R. G. Jones, [et al.] // Mol. Cell. – 2006. – Vol. 21, N 4. – P. 521 – 531.

197. Browne G. J. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398 / G. J. Browne, S. G. Finn, C. G. Proud // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N13. – P. 12220 – 12231.

198. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status / T.G. Graeber, J.F. Peterson, M. Tsai, [et al.] // Mol. Cell Biol. – 1994. – Vol. 14, N 9. – P. 6264 – 6277.

199. 5′-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments / K. R. Laderoute, K. Amin, J. M. Calaoagan, [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 26, N 14. – P. 5336 – 5347.

200. Neelam S. Lenticular cytoprotection. Part 1: the role of hypoxia inducible factors-1α and -2α and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell

survival in hypoxia / S. Neelam, M. M. Brooks, P. R. Cammarata // Mol. Vis. – 2013. – Vol. 19. – P. 1 – 15.

201. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response / A. Bertolotti, Y. Zhang, L. M. Hendershot, [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2000. – Vol. 2, N 6. – P. 326 – 332.

202. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death / Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M. [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 10. – P. 6397 – 6404.

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

204. Fels D. R. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth / D. R. Fels, C. Koumenis // Cancer Biol. Therap. – 2006. – Vol 5, N 7. – P. 723 – 728.

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

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

207. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1□ and promotes autocrine growth through EGF receptor / G. Auf, A. Jabouille, M. Delugin, [et al.] // BMC Cancer. – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 597.

208. Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162, N 1. – P. 156-159.

209. Minchenko A. Regulation of endotelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: Role of hypoxia responsive element / A. Minchenko, J. Caro // Mol. Cell. Biochem. – 2000. – Vol. 208, N 1. – P. 53 – 62.

210. Armstead V. E. P-selectin is up-regulated in vital organs during murine traumatic shock / V. E. Armstead, A. G. Minchenko, B. Campbell, A. M. Lefer // FASEB J. – 1997. – Vol. 11, N 14. – P. 1271 – 1279.

211. Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via induction of VEGF, IL-8, COX-2 and ADAMTS-1 metalloprotease, implicating a novel role for lipid oxidation in progression and destabilization of atherosclerotic lesions / V. N. Bochkov, M. Philippova, O. Oskolkova, [et al.] // Circ. Res. – 2006. – Vol. 99, N 8. – P. 900 – 908.

212. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // М. Практика. – 1998. – с. 459.

213. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 / A. V. Korennykh, P. F. Egea, A. A. Korostelev, [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 457, N 7230. – P. 687 – 693.

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

215. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response / J. Zhou, C. Y. Liu, S. H. Back, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, N 39. – P. 14343 – 14348.

216. Eagle H. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid / H. Eagle, V.I. Oyama, M. Levy, C.L. Horton, R. Fleischman // J. Biol. Chem. – 1956. – Vol. 218, N 2. – P. 607-616.

217. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction / D.R. Wise, R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008 – Vol. 105, N 48. – P. 18782 – 18787.

218. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells / C. Pérez-Gómez, J.A. Campos-Sandoval, F.J. Alonso, [et al.] // Biochem. J. – 2005. – Vol. 386, N 3. – P. 535 – 542.

219. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis / R. J. De Berardinis, A. Mancuso, E. Daikhin, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, N 49. – P. 19345 – 19350.

220. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism / P. Gao, I. Tchernyshyov, T. C. Chang, [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 458, N 7239. – P. 762 – 765.

221. Griffiths M. The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens / M. Griffiths, D. Keast // Immunol. Cell. Biol. – 1990. – Vol. 68, N 6. – P. 405 – 408.

222. Shahbazi J. Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Enhances p53 Function and Represses Tumorigenesis / J. Shahbazi, R. Lock, T. Liu // Front. Genet. – 2013. – Vol. 4. – P. 80.

223. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells / D. A. Grotsky, I. Gonzalez-Suarez, A. Novell, [et al.] // J. Cell Biol. – 2013. – Vol. 200, N 2. – P. 187 – 202.

224. Giaccia A. J. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals / A. J. Giaccia, M. B. Kastan // Genes Dev. – 1998. – Vol. 12, N 19. – P. 2973 – 2983.

225. Ko L. J. p53: puzzle and paradigm / L. J. Ko, C. Prives // Genes Dev. – 1996. – Vol. 10, N 9. – P. 1054 – 1072.

226. A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides / M. L. Agarwal, A. Agarwal, W. R. Taylor, [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, N 25. – P. 14775 – 14780.

227. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation / A. A. Sablina, G. V. Ilyinskaya, S. N. Rubtsova, [et al.] // J. Cell Science. – 1998. – Vol. 111, N 7. – P. 977 – 984.

228. Lanni J. S. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption / J. S. Lanni, T. Jacks // Mol. Cell. Biol. – 1998. – Vol. 18, N 2. – P. 1055 – 1064.

229. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit / C. Prives // Cell. – 1998. – Vol. 95, N 1. – P. 5 – 8.

230. Amundson S. A. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress / S. A. Amundson, T. G. Myers, AJ. Jr. Fornace // Oncogene. – 1998. – Vol. 17, N 25. – P. 3287 – 3299.

231. Tkacz J. S. Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes / J. S. Tkacz, O. Lampen // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1975. – Vol. 65, N 1. – P. 248 – 257.

232. Struck D. K. Evidence for the participation of saccharide-lipids in the synthesis of the oligosaccharide chain of ovalbumin / D. K. Struck, W. J. Lennarz // J Biol Chem. – 1977. – Vol. 252, N 3. – P. 1007 - 1013.

233. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis / F. He, L. Mo, X.Y. Zheng, [et al.] // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, N 24. – P. 9413 - 9421.

234. Activation of the DNA-binding ability of latent p53 protein by protein kinase C is abolished by protein kinase CK2 / S. Pospisilova, V. Brazda, K. Kucharikova, [et al.] // Biochem. J. – 2004. – Vol. 378, N. 3. – P. 939–947.

235. Regulation of p53 mediated transactivation by the beta-subunit of protein kinase CK2 / N. Schuster, A. Prowald, E. Schneider, [et al.] // FEBS Lett. – 1999. – Vol. 447, N. 2. – P. 160–166.

236. Schultz L. B. P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks / L. B. Schultz, N. H. Chehab, A. Malikzay, T. D. Halazonetis // J Cell Biol. – 2000. – Vol. 151, N 7. – P. 1381 – 1390.

237. RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2 / D. Chen, J. Zhang, M. Li, [et al.] // EMBO Rep. – 2009. – Vol. 10, N 2. – P. 166 – 172.

238. Novak R. L. Adenoviral-mediated Rybp expression promotes tumor cell-specific apoptosis / R. L. Novak, A. C. Phillips // Cancer Gene. Ther. – 2008. – Vol. 15, N 11. – P. 713 – 722.

239. p53 and translation attenuation regulate distinct cell cycle checkpoints during ER stress / S. E. Thomas, E. Malzer, A. Ordonez, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, N 11. – P. 7606 – 7617.

240. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP / S. Li, G. Shi, H. Yuan, [et al.] // Oncol. Rep. – 2012. – Vol. 28, N 1. – P. 133 – 140.

241. Perina D. Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge Suberites domuncula / D. Perina, M. H. Bosnar, A. Mikoč, W. E. Müller, H. Cetković // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 2011. – Vol. 384, N 4. – P. 451 – 460.

242. Apostolidis P. A. Proposed megakaryocytic regulon of p53: the genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation / P. A. Apostolidis, S. Lindsey, W. M. Miller, E. T. Papoutsakis // Physiol. Genomics. – 2012. – Vol. 44, N 12. – P. 638 – 650.

243. Weger S. Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo / S. Weger, E. Hammer, R. Heilbronn // FEBS Lett. – 2005. – Vol. 579, N 22. – P. 5007 – 5012.

244. Shinbo Y. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3 / Y. Shinbo, T. Taira, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, H. Ariga // Int. J. Oncol. – 2005. – Vol. 26, N 3. – P. 641 – 648.

245. Polo-like kinase 1 regulates mitotic arrest after UV irradiation through dephosphorylation of p53 and inducing p53 degradation / J. Chen, G. Dai, Y.Q. Wang, [et al.] // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580, N 15. – P.3624-3630.

246. Wig1 prevents cellular senescence by regulating p21 mRNA decay through control of RISC recruitment / B. C. Kim, H. C. Lee, J. J. Lee, [et al.] // EMBO J. – 2012. – Vol. 31, N 22. – P. 4289 – 4303.

247. Mendez V. C. The p53-induced Wig-1 protein binds double-stranded RNAs with structural characteristics of siRNAs and miRNAs / V. C. Mendez, M. Prahl, K. G. Wiman // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580, N 18. – P. 4401 – 4408.

248. 246. Lenihan C. R. The impact of hypoxia on cell death pathways / C. R. Lenihan, C. T. Taylor // Biochem. Soc. Trans. – 2013. – Vol. 41, N 2. – P. 657 – 663.

249. Malhotra J. D. ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death / J. D. Malhotra, R. J. Kaufman // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – Vol. 3, N 9. – P. a004424.

250. Mimeault M. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells / M. Mimeault, S. K. Batra // J. Cell. Mol. Med. – 2013. – Vol. 17, N 1. – P. 30 – 54.

251. Dent P. Non-canonical p53 signaling to promote invasion / P. Dent // Cancer Biol. Ther. – 2013. – Vol. 14, N 10. – P. 879 – 880.