

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КРАСНИЦЬКА

Дар'я Андріївна

УДК 577.112.7:616

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ РОДИНИ НОМЕОВОХ У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ ЗА
УМОВ ГІПОКСІЇ ТА ПРИГНІЧЕННЯ IRE1**

091 – біологія

09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії

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

_____ /Красницька Д.А./

Науковий керівник: Олександр МІНЧЕНКО, доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Красницька Д.А. Експресія генів родини Nucleobox у клітинах гліоми за умов гіпоксії та пригнічення IRE1. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Дисертація присвячена дослідженню ролі стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів, що кодують ключові транскрипційні фактори родини Nucleobox, які контролюють процеси проліферації як у нормі, так і за пухлинного росту. Експресію цих генів вивчали у клітинах гліоми лінії U87 за умов пригнічення функціональної активності IRE1/ERN1, основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, а також за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози.

Актуальність цієї теми пов'язана з тим, що онкологічні хвороби посідають друге місце у світі за рівнем захворюваності і смертності, причому ці показники постійно зростають за фактичної відсутності ефективних підходів до лікування. Гліобластома (астроцитом IV ступеня) є найбільш злоякісною і досить поширеною первинною пухлиною головного мозку з агресивним фенотипом, яка тяжко піддається терапії та характеризується короткою тривалістю життя пацієнтів. Саме тому пошук нових підходів до розкриття молекулярних основ патогенезу цих злоякісних пухлин є вкрай необхідним для покращення існуючих і створення нових перспективних стратегій протипухлинної терапії.

Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин шляхом перепрограмування геному у бік активації ангиогенезу, посиленого забезпечення пухлини поживними речовинами, резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії, то детальне

вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих ефектів буде сприяти кращому розумінню молекулярних механізмів росту злоякісних пухлин та пошуку нових підходів боротьби з ними.

Одним з найбільш можливих механізмів перепрограмування геному у пухлинних клітинах за умов стресу ендоплазматичного ретикулума є зміни в експресії ключових транскрипційних факторів, що контролюють інтенсивність численних метаболічних процесів у клітинах пухлин і організму в цілому. В цьому плані важливу роль відіграють також транскрипційні фактори родини *Notch*, причому більшість з них задіяні у рості пухлин і є мішенями для боротьби зі злоякісним ростом.

Важливим моментом цієї роботи було вияснити роль IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів цих транскрипційних факторів, у тому числі і роль ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей цього сигнального протеїну в реалізації його впливу на експресію генів. Окремим завданням роботи було дослідити дію гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на рівень експресії ключових транскрипційних факторів родини *Notch* у клітинах гліоми в залежності від пригнічення IRE1, що має протипухлинний ефект і знижує проліферативний потенціал клітин гліобластоми.

В ході виконання роботи були використанні такі сучасні методи біохімії та молекулярної біології, як культивування стабільно трансфікованих клітин гліобластоми з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 та клітин без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної), виділення РНК, визначення концентрації та спектральних характеристик отриманих препаратів РНК за допомогою наноспектрофотометра, синтез комплементарних ДНК шляхом зворотної транскрипції, а також методи кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі для визначення рівня експресії мРНК досліджених

транскрипційних факторів і мікроРНК, сайленсінг мРНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Для з'ясування ролі сигнального протеїну ERN1 та його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) нами було досліджено експресію генів таких транскрипційних факторів родини Homeobox як ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2), SPAG4 (sperm associated antigen 4), NKX3-1 (NK3 homeobox 1), MEIS1 (Meis homeobox 1), MEIS2, MEIS3; LHX1 (LIM homeobox 1), LHX2, LHX6, TGIF1 (TGFB induced factor homeobox 1), PAX6 (Paired box 6), PBX3 (PBX homeobox 3), PRRX1 (Paired related homeobox 1) і PBXIP1/HPIP (PBX homeobox interacting protein 1 / Hematopoietic PBX-interacting protein). Для в'яснення механізмів залежності рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox від глутаміну було досліджено експресію гена SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5), який кодує синтез переносника глутаміну та деяких інших амінокислот.

З метою вивчення молекулярних механізмів залежності експресії генів родини Homeobox від стресу ендоплазматичного ретикулума і зокрема його сигнального шляху IRE1/ERN1 у клітинах гліобластоми були проведені дослідження на клітинах з пригніченими ензиматичними активностями (протеїнкіназа та ендорибонуклеаза) IRE1 та за умов інгібування лише ендорибонуклеази цього сигнального протеїну.

Проведеними дослідженнями була виявлена залежність експресії генів родини Homeobox у клітинах гліоми від функціонування IRE1 і можливий внесок цих генів до антипроліферативного ефекту пригнічення IRE1, а також роль протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей цього сигнального протеїну в опосередкованій стресом ендоплазматичного ретикулума регуляції експресії генів родини Homeobox. Була досліджена чутливість експресії генів родини Homeobox до умов гіпоксії та дефіциту глутаміну в залежності від функціональної активності IRE1.

Отримані результати продемонстрували роль IRE1 сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії генів родини *Homeobox*, які контролюють проліферацію пухлинних клітин, а також за умов гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози, що є важливими компонентами підтримання пухлинного росту. Було показано, що пригнічення обох ензиматичних активностей IRE1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у клітинах гліобластоми лінії U87MG змінювало рівень експресії усіх досліджених генів родини *Homeobox*, але по-різному, як по величині змін, так і по напрямку, що може бути обумовлено особливостями регуляції їх експресії сигнальним протеїном IRE1, а також їх функціональним значенням, особливо за умов репрограмування геному за участі сигнальних шляхів, асоційованих зі стресом ендоплазматичного ретикулума. Так, рівень експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6*, *PBXIP1*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2* і *MEIS1* зростає, а генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6*, *MEIS2* та *MEIS3* – істотно знижувався у клітинах гліобластоми за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну IRE1.

У той же час, за умов пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 для більшості досліджених генів родини *Homeobox* зміни в їх експресії були іншими як за величиною, так і напрямком. Разом з тим, рівень експресії генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6* та *MEIS3* у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1 і клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 істотно не відрізнявся за величиною, що свідчило про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Серед досліджених нами генів родини *Homeobox* були виявлені і такі, рівень експресії яких змінювався лише за умов пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 і не змінювався у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1. Ними виявилися гени *PBX3* і *PRRX1*, що вказує на опосередкованість виявлених змін в їх експресії

саме протеїнкіназною активністю сигнального протеїну ERN1. Рівень експресії інших генів цієї родини транскрипційних факторів змінювався по-різному у клітинах гліоми з різним типом пригнічення ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1, що свідчить про участь обох ензиматичних активностей ERN1 у цій регуляції, їх взаємодію через опосередковані ними сигнальні шляхи.

Методами біоінформатики було встановлено, що 3'-послідовності мРНК ZEB2 і PAX6 містять сайти зв'язування мікроРНК: miR-145-5p і miR-182-5p в мРНК ZEB2, а miR-19a-3p і miR-96-5p в мРНК PAX6, причому виявлені зміни в експресії цих мікроРНК є протилежно направленими до змін в експресії відповідних мРНК і можуть бути причетними до регуляції експресії мРНК ZEB2 і PAX6 на посттрансляційному рівні.

Показано також, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії частини із них збільшується, особливо *SPAG4* і *ZEB2* генів, а інших генів – зменшується у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Разом з тим, у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною та протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1 чутливість до впливу гіпоксії переважно змінюється, що переконливо свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів цих транскрипційних факторів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Було також показано, що експресія більшості досліджених генів родини Nfe2b3 змінюється як за умов дефіциту глутаміну, так і глюкози, але по-різному, і що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 переважно модифікує їх ефект. Так, у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну знижується рівень експресії таких генів цієї родини транскрипційних

факторів: *LHX2*, *LHX6*, *MEIS2*, *PRRX1*, *PBX3* and *SPAG4*. Разом з тим, рівень експресії генів *LHX1*, *MEIS3*, *ZEB2*, *TGIF1*, *PBXIP1*, *PAX6* та *NKX3-1* підвищується у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну. Встановлено також, що чутливість деяких генів транскрипційних факторів родини Homeobox до дефіциту глутаміну змінюється у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1. Так, чутливість таких генів транскрипційних факторів як *PBXIP1*, *NKX3-1* та *PAX6* до дефіциту глутаміну повністю втрачається за умов пригнічення ERN1, а генів *ZEB2*, *LHX1* і *PBX3* – знижується. У той же час, чутливість гена *PBXIP1* до дефіциту глутаміну істотно збільшується у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями сигнального протеїну ERN1. Було також показано, що за умов дефіциту глюкози знижується рівень експресії генів таких транскрипційних факторів, як *PAX6*, *MEIS1* та *MEIS2* у контрольних клітинах гліобластоми. Разом з тим, експресія генів *PBX3* і *PBXIP1* у цих клітинах була резистентною до дефіциту глюкози. Встановлено також, що пригнічення ERN1 змінює чутливість генів транскрипційних факторів *PAX6*, *MEIS1*, *MEIS2*, *PBX3* та *PBXIP1* до дефіциту глюкози. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Наукова новизна цієї роботи полягає в тому, що вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і що виявлені зміни в експресії досліджених генів були геноспецифічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 в регуляції експресії генів *ZEB2*, *TGIF1*, *LHX6* та *MEIS3*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1, рівень експресії цих генів істотно не

відрізнявся. Це переконливо свідчить про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Вперше також показано, що саме протеїнкіназна активність ERN1 є ключовим регулятором експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 не впливало на рівень їхньої експресії.

Вперше також показано, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Homeobox є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Встановлено також, що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість переважної більшості генів родини Homeobox до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів цих транскрипційних факторів. Ці результати є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні гіпоксичної регуляції проонкогенного Homeobox гена *SPAG4* у клітинах гліобластоми, які продемонстрували різке зниження його чутливості до гіпоксії за умов пригнічення ERN1 і які вказують на можливу участь транскрипційного фактора SPAG4 у зниженні інтенсивності проліферації цих клітин за умов нокдауну ERN1.

Показано, що експресія більшості досліджених генів родини Homeobox є чутливою до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що пригнічення сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 переважно модифікує їхні ефекти. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

протеїнкіназної активності ERN1 у регуляції експресії генів, пригнічення якої може бути причетним до посиленої інвазивності клітин гліоми шляхом індукції експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК ZEB2 і PAX6 на посттрансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, що важливо для розробки нових підходів до терапії злоякісних пухлин.

Ключові слова: експресія генів, ядро, пригнічення IRE1, стрес ендоплазматичного ретикулума, РНК, АСТВ, ПЛР, гліома, пухлинні клітини, гени родини Nucleobox, транскрипція, гіпоксія, дефіцит глутаміну.

ANNOTATION

Krasnytska D.A. Expression of Homeobox family genes in glioma cells under hypoxia and IRE1 inhibition.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the study of the role of endoplasmic reticulum stress in regulating the expression of genes encoding key transcription factors of the Homeobox family, which control proliferation processes in normal and tumor growth. The expression of these genes was studied in glioma cells of the U87 line under the conditions of suppression of the functional activity of IRE1/ERN1, the main sensory and signaling protein of endoplasmic reticulum stress, as well as under conditions of hypoxia and glutamine and glucose deficiency.

The relevance of this topic is because oncological diseases rank second in the world in terms of morbidity and mortality, and these indicators are constantly increasing, and there is practically no effective treatment. Glioblastoma (grade IV astrocytoma) is the most malignant and fairly common primary brain tumor with aggressive behavior that is difficult to treat and characterized by a short life expectancy of patients. That is why the search for new approaches to reveal the molecular basis of the pathogenesis of these malignant tumors is necessary for improving existing and creating new promising strategies of anticancer therapy.

Since endoplasmic reticulum stress and hypoxia are essential factors in the intensive growth of malignant tumors by reprogramming the genome for angiogenesis, enhanced tumor supply with nutrients, resistance of tumor cells to various toxic substances, including the toxic effects of hypoxia, a detailed study of the regulatory mechanisms that underlying these processes will contribute to a better understanding

of the molecular mechanisms of the growth of malignant tumors and the search for new approaches to combating them.

One of the most possible mechanisms of genome reprogramming in tumor cells under endoplasmic reticulum stress conditions is changes in the expression of key transcription factors that control the intensity of numerous metabolic processes in tumor cells and the body as a whole. In this regard, transcription factors of the Homeobox family also play an important role, and most of them are involved in the growth of tumors and are targets for fighting malignant growth.

An important point of this work was to clarify the role of IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of gene expression of these transcription factors, including the role of endoribonuclease and protein kinase activities of this signaling protein in implementation of its influence on gene expression. A separate task of the work was to investigate the effect of hypoxia and glutamine and glucose deficiency on the expression level of key transcription factors of the Homeobox family in glioma cells depending on the inhibition of IRE1, which has an anti-tumor effect and reduces the proliferative potential of glioblastoma cells.

In the course of the work, such modern methods of biochemistry and molecular biology were used in the cultivation of stably transfected glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of ERN1 and cells without both enzymatic activities of this signaling protein (endoribonuclease and protein kinase), RNA isolation, determination of the concentration and spectral characteristics of the obtained drugs RNA using a nano-spectrophotometer, synthesis of complementary DNA by reverse transcription, as well as real-time quantitative polymerase chain reaction methods for determining the level of mRNA expression of the studied transcription factors and microRNAs, mRNA silencing, electrophoretic analysis of nucleic acids, methods of bioinformatics and statistical processing of results.

To find out the role of the signaling protein ERN1 and its enzymatic activities (endoribonuclease and protein kinase), we studied the gene expression of such

transcription factors of the Homeobox family as ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2), SPAG4 (sperm associated antigen 4), NKX3- 1 (NK3 homeobox 1), MEIS1 (Meis homeobox 1), MEIS2, MEIS3; LHX1 (LIM homeobox 1), LHX2, LHX6, TGIF1 (TGFB induced factor homeobox 1), PAX6 (Paired box 6), PBX3 (PBX homeobox 3), PRRX1 (Paired related homeobox 1) and PBXIP1/HPIP (PBX homeobox interacting protein 1 / Hematopoietic PBX-interacting protein).

To find out the mechanisms of the dependence of the level of expression of genes of transcription factors of the Homeobox family on glutamine, the expression of the SLC1A5 (solute carrier family 1 member 5) gene, which encodes the synthesis of the glutamine carrier and some other amino acids, was studied.

To study the molecular mechanisms of the dependence of Homeobox family gene expression on endoplasmic reticulum stress and in particular its IRE1/ERN1 signaling pathway in glioblastoma cells, studies were conducted on cells with suppressed enzymatic activities (protein kinase and endoribonuclease) of IRE1 and under conditions of inhibition of only the endoribonuclease of this signaling protein.

The conducted studies revealed the dependence of Homeobox gene expression in glioma cells on the functioning of IRE1 and the possible contribution of these genes to the anti-proliferative effect of IRE1 inhibition, as well as the role of protein kinase and endoribonuclease of this signaling protein in endoplasmic reticulum stress-mediated regulation of Homeobox gene expression. The sensitivity of the expression of Homeobox family genes to conditions of hypoxia and glutamine deficiency was investigated, depending on the functional activity of IRE1.

The obtained results demonstrated the role of the IRE1 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress in the regulation of the expression of genes of the Homeobox family, which control the proliferation of tumor cells, as well as under conditions of hypoxia and glutamine or glucose deficiency, which are important components of maintaining tumor growth. It was shown that inhibition of both enzymatic activities of IRE1 of the endoplasmic reticulum stress signaling protein in glioblastoma cells of the U87MG line changed the expression level of all studied genes

of the Homeobox family, but in different ways, both in the magnitude of the changes and the direction, which may be due to the peculiarities of their regulation expression of the signaling protein IRE1, as well as their functional significance, especially under conditions of genome reprogramming by endoplasmic reticulum stress signaling pathways. Thus, the expression level of PBX3, PRRX1, PAX6, PBXIP1, SPAG4, LHX1, LHX2, and MEIS1 genes increased, and the ZEB2, TGIF1, LHX6, MEIS2, and MEIS3 genes significantly decreased in glioblastoma cells under the conditions of suppression of both enzymatic activities of the IRE1 signaling protein.

At the same time, under the suppression of only the endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1, for most of the studied genes of the Homeobox family, changes in their expression were different both in magnitude and direction of changes. However, the level of expression of ZEB2, TGIF1, LHX6, and MEIS3 genes in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein and cells without both enzymatic activities of ERN1 did not differ significantly in value, which indicated that the detected changes in the expression of these genes were mediated by endoribonuclease and not by the protein kinase activity of ERN1. Among the genes of the Homeobox family studied by us, there were also those whose expression level changed only under the conditions of inhibition of both enzymatic activities of ERN1 and did not change in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein. Thus, the detected changes in the expression of PBX3 and PRRX1 genes are mediated by the protein kinase activity of the ERN1 signaling protein. The level of expression of other genes of this family of transcription factors changed differently in glioma cells with different types of inhibition of the enzymatic activities of the ERN1 signaling protein, which indicates the involvement of both ERN1 enzymatic activities in this regulation, their interaction through signaling pathways mediated by them.

Using bioinformatics methods, it was established that the 3'-sequences of ZEB2 and PAX6 mRNA contain microRNA binding sites: miR-145-5p and miR-182-5p in ZEB2 mRNA, and miR-19a-3p and miR-96-5p in mRNA PAX6, and the detected

changes in the expression of these miRNAs are oppositely directed to changes in the expression of the corresponding mRNAs and may be involved in the regulation of ZEB2 and PAX6 mRNA expression at the post-translational level.

It was also shown that the expression of most genes of the Homeobox family transcription factors is sensitive to hypoxia, and the expression level of some of them increases, especially SPAG4 and ZEB2 genes, and other genes decrease in control glioblastoma cells transfected with an empty vector. At the same time, in cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1, the sensitivity to the influence of hypoxia mainly changes, which convincingly indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes of these transcription factors that we studied. These results are the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

It was also shown that the expression of most of the investigated genes of the homeobox family changes both under conditions of glutamine and glucose deficiency, but in different ways and that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1 mainly modifies their effect. Thus, in control glioblastoma cells transfected with an empty vector, under conditions of glutamine deficiency, the expression level of the following genes of this family of transcription factors decreases: LHX2, LHX6, MEIS2, PRRX1, PBX3, and SPAG4. However, the expression level of LHX1, MEIS3, ZEB2, TGIF1, PBXIP1, PAX6, and NKX3-1 genes is increased in control glioblastoma cells under conditions of glutamine deficiency.

It was also established that the sensitivity of some genes of transcription factors of the Homeobox family to glutamine deficiency changes in glioblastoma cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the signaling protein ERN1. Thus, the sensitivity of such transcription factor genes as PBXIP1, NKX3-1, and PAX6 to glutamine deficiency is completely lost under the suppression of ERN1, and the ZEB2, LHX1, and PBX3 genes are reduced. At the same time, the sensitivity of the PBXIP1 gene to glutamine deficiency is dramatically increased in glioblastoma

cells with suppressed endoribonuclease and protein kinase activities of the ERN1 signaling protein. It was also shown that under conditions of glucose deficiency, the gene expression level of such transcription factors as PAX6, MEIS1, and MEIS2 decreases in control glioblastoma cells. However, the expression of PBX3 and PBXIP1 genes in these cells was resistant to glucose deficiency. It was also established that suppression of ERN1 changes the sensitivity of genes of transcription factors PAX6, MEIS1, MEIS2, PBX3, and PBXIP1 to glucose deficiency. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The scientific novelty of this work is that, for the first time, pronounced changes in the expression level of genes of transcription factors of the homeobox family were detected in the culture of glioblastoma cells of the U87MG line under the conditions of suppression of IRE1/ERN1, the main signaling pathway of endoplasmic reticulum stress, and that the detected changes in the expression of the studied genes were gene-specific and depended on the type of ERN1 knockdown. The obtained results demonstrated the important role of endoribonuclease ERN1 in the regulation of ZEB2, TGIF1, LHX6, and MEIS3 gene expression, since both in glioma cells with suppressed endoribonuclease activity of the signaling protein ERN1 and in cells without both enzymatic activities of ERN1, the expression level of these genes did not differ significantly in magnitude. This strongly indicates that the identified changes in the expression of these genes are mediated by the endoribonuclease, and not the protein kinase activity of ERN1. It was also shown for the first time that the ERN1 protein kinase is a key regulator of PBX3, PRRX1, PAX6, and PBXIP1 gene expression, as suppression of only the endoribonuclease activity of the ERN1 signaling protein did not affect their expression level.

It is also shown for the first time that the expression of most genes of the Homeobox family transcription factors is sensitive to hypoxia, and the level of expression of these genes changes differently both in the magnitude of the effect and in the direction of changes in control glioblastoma cells transfected with an empty

vector. It was also established that inhibition of the endoribonuclease and protein kinase activities of the ERN1 signaling protein changes the sensitivity of the vast majority of genes of the Homeobox family to hypoxia, and this indicates the ERN1-dependent control of hypoxic regulation of the expression level of most of the genes of these transcription factors that we studied. These results are the basis for revealing the mechanisms of resistance of tumor cells to the toxic effects of hypoxia under endoplasmic reticulum stress conditions.

Fundamentally new results were obtained when studying the hypoxic regulation of the pro-oncogenic homeobox gene SPAG4 in glioblastoma cells, which demonstrated a sharp decrease in its sensitivity to hypoxia under conditions of ERN1 suppression and which indicates the possible participation of the SPAG4 transcription factor in reducing the intensity of proliferation of these cells under conditions of ERN1 knockdown.

It was shown that the expression of most of the studied genes of the homeobox family is sensitive to both glutamine and glucose deficiency and that inhibition of the endoplasmic reticulum stress signaling pathway ERN1 preferentially modifies their effects. These results indicate an ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to glucose and glutamine supply.

The practical significance of the obtained results lies in revealing the role of protein kinase ERN1 in the regulation of gene expression, the suppression of which may be involved in increased invasiveness of glioma cells by inducing the expression of PBX3, PRRX1, PAX6 and PBXIP1 genes, as well as in the identification of microRNAs that control the expression of ZEB2 and PAX6 mRNA at the post-translational level and may be potential targets for inhibition of glioblastoma cell proliferation. The ERN1-dependent nature of the sensitivity of glioblastoma cells to hypoxia that we discovered is the basis for revealing the mechanisms of tumor cell resistance to the toxic effects of hypoxia under conditions of endoplasmic reticulum stress, which is important for the development of new approaches to the therapy of malignant tumors.

Keywords: gene expression, nucleus, genome, IRE1 inhibition, endoplasmic reticulum stress, RNA, ACTB, PCR, glioma, tumor cells, Homeobox family genes, hypoxia, glutamine deprivation, glucose deprivation.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Bezrodny B.H., Minchenko D.O. The impact of glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2022, 56 (1): 38-47. doi:10.2478/enr-2022-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS3, SPAG4, LHX1 та LHX6, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS3*. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Дмитро Мінченко, Галина Козинкевич та Борис Безродний приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

2. **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Oksiom N.S., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on *PBX3*, *PBXIP1*, *PAX6*, *MEIS1*, and *MEIS2* gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2023, 57 (1): 37-47. doi:10.2478/enr-2023-0005. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, TBXIP1, TBX3, PAX6 і MEIS2, обробка даних та участь у написанні статті*). Анастасія Чередниченко, Наталія Оксіом і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS2*. Дарія Цимбал, Юлія Вілецька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр

Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

Scopus i PubMed

3. Minchenko D.O., **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Hoian S.L., Minchenko O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia. 2023, 1:1-10. doi:10.59657/jedr.brs.23.004. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів TGIF1, ZEB2, PRRX1 та SLC1A5, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *NKX3-1*, *PRRX1* та *SLC1A5*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

4. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Halkin O.V., Rudnytska O.V., Hoian S.L., Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. Endocr Reg. 2024, 58(1): 47-56. doi:10.2478/enr-2024-0006. (*Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів MEIS1, MEIS2, MEIS3, LHX6 і SPAG4, обробка даних та участь у написанні статті*). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *MEIS3* та *LHX6*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Олег Галкін приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

5. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Minchenko D.O., Viletska Y.M., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on homeobox gene expressions in ERN1 knockdown glioma cells. FEBS-IUBMB-ENABLE 1st Int. Mol. Biosciences PhD and Postdoc Conference, 16-18 Nov, 2022, The Institute of Biomedicine of Seville, Spain, 2022: 118.

6. **Krasnytska D.A.**, Minchenko D.O., Khita O.O., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on the expression of homeobox genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 6-9, 2022, Prague, Czech Republic: 133.

7. **Красницька Д.**, Слюсар М., Галкін О., Мінченко О. Залежна від стресу ендоплазматичного ретикулума регуляція експресії генів транскрипційних факторів родини Номеобох у клітинах гліоми. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 33-34.

8. Minchenko D.O., Khita O.O., Sliusar M.Y., **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Cherednychenko A.A., Khikhlo Y., Minchenko O.H. Hydrocortisone modifies the impact of tunicamycin, thapsigargin, and hypoxia on the expression of ATF3 and other transcription factors in normal human astrocytes and U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 73.

9. **Krasnytska D.A.**, Sliusar M.Y., Minchenko O.H. ERN1 inhibition modifies the hypoxic regulation of the expression of homeobox genes in U87MG glioblastoma cells. Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2024, BIMCO Journal, Chernivtsi, 2024: 110.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	31
1.1. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції метаболізму та процесів проліферації в нормі та за пухлинного росту	31
1.2. ERN1 сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума та його роль у рості злоякісних пухлин	34
1.3. Роль гіпоксії в рості злоякісних пухлин і механізми гіпоксичної регуляції експресії генів	40
1.4. Значення метаболізму глутаміну та глюкози у контролі проліферації пухлинних клітин	43
1.5. Транскрипційні фактори родини Nucleobox	44
1.6. Механізми регуляції експресії генів родини Nucleobox	49
1.7. Механізми перепрограмування геному у клітинах злоякісних пухлин	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Матеріали та умови проведення експериментів	52
2.2. Методи досліджень	53
2.2.1. Виділення РНК із клітин гліобластоми.....	53
2.2.2. Синтез комплементарних ДНК зворотною транскриптазою	55
2.2.3. Визначення експресії мРНК методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі	55
2.2.4. Визначення експресії мікроРНК методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі	58
2.2.5. Сайленсінг мРНК	59
2.2.6. Вестерн-блот аналіз протеїнів	59
2.2.7. Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів родини Nucleobox	60

2.2.8. Біоінформаційний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК родини Nemox 60	60
2.3. Аналіз результатів та їх статистична обробка..... 60	60
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 62	62
3.1. Експресія генів родини Nemox у клітинах гліобластоми з пригніченою функцією сигнального протеїну IRE1 62	62
3.2. Вплив гіпоксії на експресію генів родини Nemox у клітинах гліобластоми з пригніченим IRE1 74	74
3.3. Експресія генів родини Nemox у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну та глюкози в залежності від сигнального протеїну IRE1 ... 90	90
3.4. Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів транскрипційних факторів родини Nemox..... 105	105
3.5. Біоінформаційний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК ZEB2 і PAX6 та експресія мікроРНК у клітинах гліобластоми з пригніченим IRE1..... 109	109
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 113	113
4.1. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції експресії генів родини Nemox 113	113
4.2. Механізми гіпоксичної регуляції експресії генів родини Nemox 117	117
4.3. Особливості експресії генів родини Nemox у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну та глюкози..... 120	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... 126	126
Додаток 1 150	150

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ATF6	– activating transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6)
ERAD	– endoplasmic reticulum associated degradation (деградація, асоційована ендоплазматичним ретикулумом)
dnIRE1	– dominant negative IRE1 (генетично модифікований варіант сигнального ензиму IRE1 без протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності) та сублінія клітин гліоми лінії U87, що його експресує
HIF	– hypoxia inducible factor (фактор, що індукується гіпоксією)
IRE1/ERN1	– inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ензим, залежний від інозитулу 1 / сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1)
PERK	– PRK-like endoplasmic reticulum kinase (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума)
XBP1	– X-box binding protein 1 (протеїн 1, що зв'язується з X-боксом)
UPR	– unfolded protein response (відповідь на не згорнуті протеїни)
ЕР	– ендоплазматичний ретикулум;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція

ВСТУП

Актуальність теми. Вивчення біохімічних та молекулярних механізмів регуляції різних патологічних станів організму на рівні експресії генів є надзвичайно важливим напрямком сьогодення, оскільки розкриває молекулярні основи розвитку патологічних процесів та їх ускладнень і сприяє розробці нових підходів до лікування і профілактики різноманітних захворювань, включаючи онкологічні. Онкопатологія посідає друге місце за рівнем захворюваності і смертності в світі, причому ці показники постійно зростають, а ефективного лікування практично немає.

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

Характерною рисою пухлинних клітин, в тому числі і гліомних, є тотальне перепрограмування метаболізму, спрямоване на забезпечення біоенергетичних

та біосинтетичних потреб [5, 6]. Більше того, клітини пухлин перебувають під постійним впливом внутрішньоклітинних (нестабільність геному, підвищене метаболічне навантаження або експресія онкогенів) та позаклітинних стресових чинників (гіпоксія, оксидативний стрес або дефіцит поживних речовин), що призводить до порушення протеостазу [7]. Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) є спеціалізованим компартментом, що контролює біогенез секреторних і трансмембранних протеїнів та є особливо чутливим до змін клітинного гомеостазу. Накопичення незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума призводить до активації систем стресу ЕР та запуску адаптивних внутрішньоклітинних реакцій, відомих під назвою «відповідь на неправильно згорнуті протеїни» [7, 8].

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

Оскільки стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин шляхом перепрограмування геному для ангіогенезу, посиленого забезпечення пухлини поживними речовинами, резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії, то детальне вивчення регуляторних механізмів, що лежать в основі цих процесів буде сприяти кращому розумінню молекулярних механізмів росту злоякісних пухлин та пошуку нових підходів боротьби з ними.

Одним з найбільш можливих механізмів перепрограмування геному у пухлинних клітинах за умов стресу ендоплазматичного ретикулума є зміни в експресії ключових транскрипційних факторів, що контролюють інтенсивність протікання численних процесів метаболізму у пухлинах. У цьому плані важливу роль відіграють також транскрипційні фактори родини Nfe2b3, більшість з яких задіяні у рості пухлин і є мішенями для боротьби з пухлинами.

Сенсорний протеїн IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1, ензим, залежний від інозитулу 1 / сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1) володіє кіназною та ендорибонуклеазною активностями (EC: 2.7.11.1 та 3.1.26.-) і запускає найбільш консервативний сигнальний шлях стресу ER. Оскільки конститутивна активація сенсорно-сигнальних шляхів стресу ER є необхідним фактором для виживання пухлинних клітин, а пригнічення IRE1-залежних сигнальних каскадів призводить до зниження проліферації клітин гліоми, то на сьогоднішній день інгібітори сенсорно-сигнального протеїну IRE1 розглядаються як потенційні протипухлинні препарати, а молекулярні механізми, за якими IRE1 здійснює контроль над процесами проліферації клітин гліоми привертають особливу увагу [14-17].

Саме тому, для з'ясування ролі сигнального протеїну ERN1 та його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) нами було досліджено вплив пригнічення ERN1 на експресію генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3, а також чутливість експресії цих генів до гіпоксії та дефіциту глутаміну або глюкози в залежності від ERN1.

Мета і завдання роботи

Мета роботи: дослідити вплив гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози на експресію генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми U87MG в залежності від функціональної активності IRE1.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

1. Дослідити вплив пригнічення IRE1 у клітинах гліобластоми на рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3.

2. Вивчити рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми за умов гіпоксії в залежності від пригнічення сигнального протеїну IRE1.

3. Дослідити вплив дефіциту глутаміну на експресію генів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми в залежності від пригнічення сигнального протеїну IRE1.

4. Вивчити вплив пригнічення IRE1 на експресію генів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози.

5. Провести біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів родини Nfe2b3 на сайти зв'язування HIF і XBP1s та 3'-нетранслюємих ділянок мРНК цих транскрипційних факторів на наявність сайтів зв'язування мікроРНК. Дослідити вплив пригнічення IRE1 на експресію мікроРНК.

Об'єкт дослідження: молекулярні механізми регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 та деяких мікроРНК за умов пригнічення IRE1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, а також гіпоксії, дефіциту глутаміну і глюкози.

Предмет дослідження: рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 та деяких мікроРНК у клітин гліобластоми U87MG в залежності від пригнічення IRE1, гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози.

Методи дослідження. У ході виконання роботи були використанні такі сучасні методи біохімії та молекулярної біології як культивування стабільно трансфікованих клітин гліобластоми з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 та клітин без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної), виділення РНК, визначення концентрації та спектральних характеристик отриманих препаратів РНК за допомогою нано-спектрофотометра, синтез комплементарних ДНК шляхом зворотної транскрипції, а також методи кількісної полімеразної

ланцюгової реакції у реальному часі для визначення рівня експресії мРНК досліджених транскрипційних факторів і мікроРНК, сайленсінг мРНК, електрофоретичний аналіз нуклеїнових кислот, методи біоінформатики та статистичної обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше були виявлені виражені зміни рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і що виявлені зміни в експресії досліджених генів були гено-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Отримані результати продемонстрували важливу роль ендорибонуклеази ERN1 в регуляції експресії генів *ZEB2* та *TGIF1*, оскільки як у клітинах гліоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1, так і у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 рівень експресії цих генів істотно не відрізнявся за величиною. Це переконливо свідчить про опосередкованість виявлених змін в експресії цих генів саме ендорибонуклеазною, а не протеїнкіназною активністю ERN1. Вперше також показано, що саме протеїнкіназа ERN1 є ключовим регулятором експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, оскільки пригнічення лише ендорибонуклеазної активності сигнального протеїну ERN1 не впливало на рівень їх експресії.

Вперше також показано, що експресія більшості генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 є чутливою до гіпоксії, причому рівень експресії цих генів змінюється по-різному як за величиною ефекту, так і за напрямком змін у контрольних, трансфікованих порожнім вектором, клітинах гліобластоми. Встановлено також, що пригнічення ендорибонуклеазної та протеїнкіназної активностей сигнального протеїну ERN1 змінює чутливість переважної більшості генів родини Nfe2b3 до гіпоксії, а це свідчить про залежний від ERN1 контроль гіпоксичної регуляції рівня експресії більшості досліджених нами генів цих транскрипційних факторів. Ці результати є підґрунтям для

розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума.

Принципово нові результати були отримані при вивченні гіпоксичної регуляції про-онкогенного гена *SPAG4* у клітинах гліобластоми, які продемонстрували різке зниження його чутливості до гіпоксії за умов пригнічення ERN1 і які вказують на можливу участь транскрипційного фактора SPAG4 у зниженні інтенсивності проліферації цих клітин за умов нокдауну ERN1. Показано, що експресія більшості досліджених генів родини Nucleobox є чутливою до дефіциту як глутаміну, так і глюкози, і що пригнічення сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1 переважно модифікує їх ефекти. Ці результати вказують на ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до забезпечення їх глюкозою та глутаміном.

Практичне значення отриманих результатів полягає у виявленні ролі протеїна ERN1 у регуляції експресії генів, пригнічення якої може бути причетним до посиленої інвазивності клітин гліоми шляхом індукції експресії генів *PBX3*, *PRRX1*, *PAX6* і *PBXIP1*, а також в ідентифікації мікроРНК, які контролюють експресію мРНК ZEB2 і PAX6 на пост-трансляційному рівні і можуть бути потенційними мішенями для пригнічення проліферації клітин гліобластоми. Виявлений нами ERN1-залежний характер чутливості клітин гліобластоми до гіпоксії є підґрунтям для розкриття механізмів резистентності пухлинних клітин до токсичних ефектів гіпоксії за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, що важливо для розробки нових підходів до терапії злоякісних пухлин.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота – завершене дослідження, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2020 – 2024 рр. Дисертанткою було самостійно здійснено аналіз даних літератури за темою роботи, виконано експериментальні дослідження по вивченню рівня експресії генів транскрипційних факторів родини Nucleobox у культурі клітин

гліобластоми лінії U87MG за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума, і його залежності від типу нокдауну ERN1. Авторкою були проведені дослідження по виявленню можливої ролі ERN1 сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума у дії гіпоксії та дефіциту глюкози і глутаміну на експресію генів родини Nucleobox, а також здійснено статистичну обробку отриманих результатів та їх узагальнення. Окремі дослідження по визначенню рівня експресії певних генів проводилися за участі аспірантки Мирослави Слюсар і доктора філософії, н.с. Олени Хіти. Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукового керівника, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України Олександра Мінченка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано протягом 2020–2024 рр. у відділі молекулярної біології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України у рамках проведення планових досліджень за бюджетними темами: “Молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в репрограмуванні геному клітин гліоми”, № ДР 0121U100662 (2021–2025 рр.) та “Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів”, № ДР 0117U002624 (2017–2021 рр.).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях: FEBS-IUBMB-ENABLE 1st Int. Mol. Biosciences PhD and Postdoc Conference, 16-18 November, 2022, The Institute of Biomedicine of Seville, Spain, 2022; 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 6-9, 2022, Prague, Czech Republic; 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023, BRIC, Bordeaux University, Talence, France, 2023; та 6-та Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 2022.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 9 робіт, з них 4 статті в іноземних фахових наукових виданнях, три з яких представлені в базах Scopus і PubMed, та 5 тез доповідей у матеріалах закордонних та міжнародних наукових конференцій і конгресі.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 152 сторінках друкованого тексту, складається зі анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів досліджень, їх обговорення, висновків та списку використаних літературних джерел, що включає 165 посилань. Робота містить 47 рисунків та 6 таблиць.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Стрес ендоплазматичного ретикулума та гіпоксія є надзвичайно важливими факторами інтенсивного росту злоякісних пухлин шляхом перепрограмування геному для посиленого забезпечення пухлини поживними речовинами, а також для розвитку резистентності пухлинних клітин до різних токсичних речовин, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії, а також до дефіциту глюкози та глутаміну. Відомо, що пригнічення стресу ендоплазматичного ретикулума, як і дефіцит глюкози та глутаміну знижують інтенсивність росту пухлин і зменшують резистентність пухлинних клітин до лікарських препаратів і токсичних ефектів гіпоксії [7, 10, 14-17].

Важливу роль у перепрограмуванні геному в пухлинних клітинах за умов стресу ендоплазматичного ретикулума відіграють ключові транскрипційні фактори, оскільки вони контролюють інтенсивність протікання численних метаболічних процесів як у нормі, так і у клітинах пухлин та організмі в цілому. І в цьому плані особливу роль відіграють транскрипційні фактори родини *Notch*, більшість із яких задіяні у контролі росту пухлин і є мішенями для боротьби зі злоякісним ростом. Разом з тим, молекулярні механізми взаємодії сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума залишаються практично не вивченими.

1.1. Роль стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції метаболізму та процесів проліферації в нормі та за пухлинного росту

Ендоплазматичний ретикулум є універсальною та мультифункціональною клітинною органелою. Він бере свій початок у зовнішній ядерній оболонці, поширюється на збірку згорнутих дископодібних везикул, з яких мережа трубок, з'єднаних між собою переходами, виходить у цитоплазму. Таким чином ендоплазматичний ретикулум утворює закриту поверхню, яка відокремлює люмінальний простір від цитоплазматичного простору [17]. Така

компартменталізація сприяє перебігу модифікаційних реакцій протеїнів, що не відбуваються в цитозолі [18]. Важливо відзначити, що компартменталізація означає, що деякі модифікації, які не відбуваються в цитозолі, такі як глікозилування та утворення дисульфідних зв'язків, можуть відбутися лише в ендоплазматичному ретикулумі. Це важливо для підвищення стабільності протеїнів, що секретуються, перед їх виходом у позаклітинне середовище [19].

Ендоплазматичний ретикулум є ключовою органелою для процесів біосинтезу значної кількості протеїнів, їх правильного згортання та дозрівання, а також для біосинтезу та транспорту сполук ліпідної природи, таких як холестерол, фосфоліпіди та стероїди. Окрім того, ендоплазматичний ретикулум містить внутрішньоклітинний запас кальцію, який є медіатором багатьох реакцій клітини. Процес згортання протеїнів є дуже чутливим до змін середовища ендоплазматичного ретикулума, а також до його перенавантаження новосинтезованими протеїнами. За умов стресу клітини збільшується ризик неправильного згортання протеїнів та порушення гомеостазу. У відповідь на стрес ЕР клітини запускають адаптивний сигнальний шлях, що називається «реакція на незгорнуті протеїни» (unfolded protein response) [14]. Важливо відмітити, що UPR спрямована на відновлення гомеостазу ендоплазматичного ретикулума і адаптації клітини до дії зовнішнього чинника, або її смерть через систему апоптозу, безпосередньо асоційовану з ендоплазматичним ретикулумом. Тривалий фізіологічний та патологічний стрес ендоплазматичного ретикулума спричиняє клітинну інтоксикацію, що веде до тяжких захворювань, таких як цукровий діабет, ішемія, метаболічні та нейро-дегенеративні захворювання.

Молекулярні механізми системи контролю якості згортання протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі є досить важливими для подолання стресу ЕР. Клітини долають цей стрес шляхом швидкого і точного зменшення кількості неправильно згорнутих протеїнів за рахунок загального пригнічення процесів трансляції, протеосомальної деградації протеїнів та аутофагії, а також вибіркової

деградації певних мРНК [14]. У разі сильного стресу ЕР клітина перемикається із режиму виживання до апоптозу, до загибелі клітини [14, 17].

Канонічна відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулула представлена трьома трансмембранними сенсорами: активуючим транскрипційним фактором ATF6 (activating transcription factor 6), протеїном 1, чутливим до інозитулу IRE1/ERN1 (inositol-requiring enzyme 1 / endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) та PRK-подібною кіназою ендоплазматичного ретикулула PERK (PRK-like endoplasmic reticulum kinase). У неактивному стані люменальні домени цих протеїнів утворюють стабільний комплекс з резидентним шапероном ендоплазматичного ретикулула Hsp70 (HSPA5), що також відомий як протеїн 78, що регулюється глюкозою (GRP78) або зв'язуючий протеїн імуноглобуліну BiP. Протеїн BiP має анти-апоптотичну роль, задіяний у регуляції кальцієвого гомеостазу у клітині і сприяє правильному згортанню протеїнів шляхом націлювання неправильно згорнутих протеїнів для опосередкованої ERAD деградації або сприяння правильному рефолдингу та транслокації [20]. Накопичення неправильно згорнутих або незгорнутих протеїнів сприяє оборотній дисоціації шаперону BiP від люменальних доменів PERK, IRE1 та ATF6. Після вивільнення від BiP, сенсорно-сигнальні протеїни PERK та IRE1 утворюють гомодимери та аутофосфорилуються, запускаючи активацію UPR, у той час як звільнений ATF6 експортується в апарат Гольджі для утворення його активної форми як транскрипційного фактора [21].

Сенсорно-сигнальний шлях PERK відповідає за блокування основної трансляції неправильно згорнутих протеїнів під час стресу ендоплазматичного ретикулула. Він представлений протеїнкіназою ендоплазматичного ретикулула, яка подібна до PRK-кінази (double stranded RNA-activated protein kinase). Активована PERK фосфорилує серин 51 у факторі ініціації еукаріотичної трансляції 2A (eIF2a) [22]. Фактор eIF2a є субодиницею гетеротримера eIF2 [23], який регулює перший етап ініціації синтезу протеїнів шляхом сприяння зв'язуванню ініціаторної тРНК з 40S рибосомною субодиницею [24].

Фосфорилування фактора eIF2 α за допомогою PERK пригнічує активність фактора ініціації еукаріотичної трансляції 2B (eIF2B) і, таким чином, знижує синтез протеїнів [25]. Одночасно PERK індукує синтез транскрипційного фактора ATF4, який посилює експресію низки UPR-залежних генів, а також антиоксидантні та оксидант-детоксуючі ензими, такі як глутатіон-S-трансфераза і гемоксигеназа-1, необхідні для захисту клітин від оксидативного стресу [26].

Сенсорно-сигнальний шлях ATF6 являє собою транскрипційний фактор, який контролює експресію генів, що індукуються стресом ендоплазматичного ретикулума. Він представлений двома ізоформами ATF6 α та ATF6 β , що кодуються генами *ATF6A* та *ATF6B*, відповідно. Після дисоціації від шаперону BiP, фактор транскрипції ATF6 транспортується в апарат Гольджі, де розщеплюється сайт-специфічними протеазами MBTPS1 та MBTPS2 з утворенням ATF6f, що є активною формою цього транскрипційного фактора. ATF6f транслокується до ядра, де активує транскрипцію таргетних генів, які кодують шаперони ендоплазматичного ретикулума і компоненти системи ERAD (ER-асоційована деградація протеїнів) [27]. Знайдено сайти зв'язування транскрипційного фактора ATF6 на промоторі гена транскрипційного фактора E2F3, що відіграє надзвичайно важливу роль у контролі клітинного циклу та дії пухлинних супресорів. ATF6 також здатний зв'язувати транскрипційний фактор CREB, який пригнічує глюконеогенез у печінці [28].

1.2. ERN1 сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума та його роль у рості злоякісних пухлин

Сенсорно-сигнальний шлях IRE1 – найбільш еволюційно консервативний сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, який реагує на неправильне згортання протеїнів, сприяючи усуненню стресу, або направляє клітини на знищення шляхом апоптозу у випадку надто сильного стресу, що робить його ключовим регулятором процесів життя та смерті клітин. У людини

існує два паралоги IRE1 (IRE1a та IRE1b), що кодуються генами *ERN1* та *ERN2* (сигналювання від ендоплазматичного ретикулула до ядра 1 і 2). Протеїн IRE1 являє собою протеїн, цитозольний домен якого володіє двома ензиматичними активностями – Ser/Thr-кіназною та ендорибонуклеазною. Під час стресу ЕР під впливом незгорнутих протеїнів відбувається дисоціація цього сигнального протеїну від шаперона BiP, що призводить до аутофосфорилування його протеїнкіназною активністю, димеризації та активації ендорибонуклеазної активності [14]. Основна функція ендорибонуклеазної активності ERN1 полягає у вирізанні короткого фрагмента з кодуєчої частини пре-мРНК транскрипційного фактора XBP1, у результаті чого утворюється вкорочений альтернативний сплайс-варіант мРНК XBP1 (XBP1s), який кодує синтез більшого за розміром транскрипційного фактора зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця внаслідок порушення рамки зчитування. Саме цей альтернативний сплайс-варіант і є відповідальним за регуляцію експресії декількох сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також деградації незгорнутих протеїнів [29].

Крім того, під впливом XBP1 індукується транскрипція генів, що кодують систему ERAD, що забезпечує деградацію незгорнутих протеїнів. Важлива роль у ході цієї деградації належить убіквітин-протеасомній системі клітини. Не згорнуті і неправильно згорнуті протеїни ковалентно зв'язуються з молекулою малого протеїну убіквітину і потім піддаються протеолізу в протеасомному комплексі [19].

ЕР-резидентний шаперон ERdj5 виявляє активність редуктази, розщеплює дисульфідні зв'язки неправильно складених білків, і прискорює діяльність ERAD завдяки асоціації з EDEM1 (ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1) та BiP для деградації неправильно згорнутих глікопротеїнів [30]. Здатність ендонуклеази IRE1 до деградації мРНК деяких секреторних білків називається RIDD (регульованим IRE1-залежним розпадом РНК). Аналіз активності *in vitro* IRE1 дикого типу (WT) та мутантної форми IRE1 призвів до

відкриття широкого спектру субстратів цього сигнального протеїну [31]. Було також показано, що IRE1 може вибірково розщеплювати певні мікроРНК за умов стресу ЕР і відновлювати трансляцію про-апоптичної каспази 2 [32]. Було встановлено, що ERN1-залежна деградація мРНК стосується переважно протеїнів із сигнальним пептидом або трансмембранним доменом, які транслуються на мембранах ЕР [33]. Таким чином припускають, що RIDD регулює ємність мембран ендоплазматичного ретикулула.

Численними дослідженнями було встановлено, що інгібування сигнального шляху ERN1 пригнічує проліферацію клітин гліоми і ріст пухлини у мозку мишей та на курячих ембріонах, а також посилює чутливість до хіміотерапії [15-17, 34-40]. На рис. 1.2.1 представлені дані, що демонструють значне зниження інтенсивності проліферації клітин гліобластоми з пригніченим ERN1, причому це зниження було більш вираженим у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазою ERN1, а у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 цей ефект був суттєво меншим. Разом з тим, пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 призводило до значного посилення інвазивності клітин гліобластоми, що вказувало на важливу роль протеїнкінази сигнального протеїну ERN1 у протидії міграційній активності клітин і їх інвазії [16].

В експериментах на курячих ембріонах було показано, що із суспензії клітини гліобластоми, які були вирощені в культуральному середовищі і перенесені на ембріони курчат, за декілька днів виростає тверда пухлина з проросшими в неї судинами (рис. 1.2.2). Але коли на такі ембріони наносили клітини гліобластоми з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (без обох ензиматичних активностей ERN1; dnERN1), то пухлина також виростає, але значно меншого розміру і зниженим ангіогенезом, що наглядно продемонстровано на рис. 1.2.2.

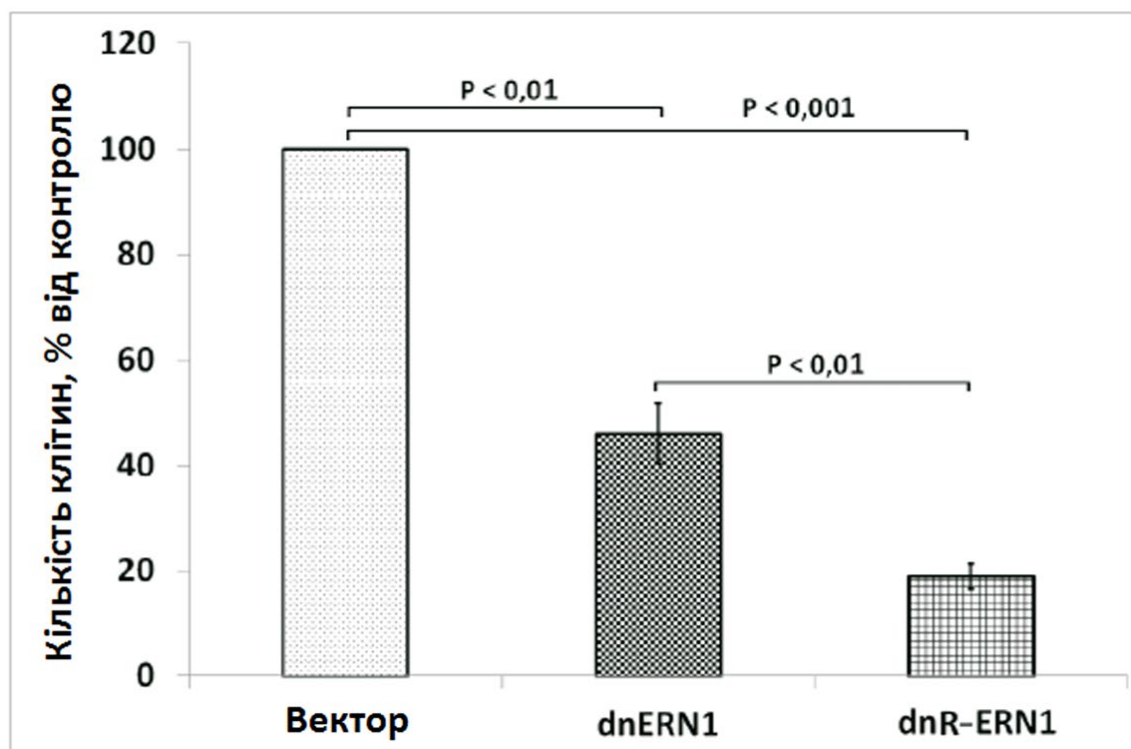


Рис. 1.2.1. Залежність інтенсивності проліферації клітин гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 (протеїнкінази та ендорибонуклеази; dnERN1) і у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnR-ERN1) [35].

В експериментах на мишах було також показано виражений вплив блокади сигнального протеїну ERN1 на об'єм пухлин і їх васкуляризацію (рис. 1.2.3). Так, пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей ERN1 зменшує об'єм пухлин, що вирости в мозку мишей із суспензії клітин гліобластоми, майже у п'ять разів у порівнянні з контрольними клітинами гліобластоми, а кількість судин у них у два з половиною разів менша, а це свідчить про залежність від ERN1 як проліферативних процесів, так і ангіогенезу.

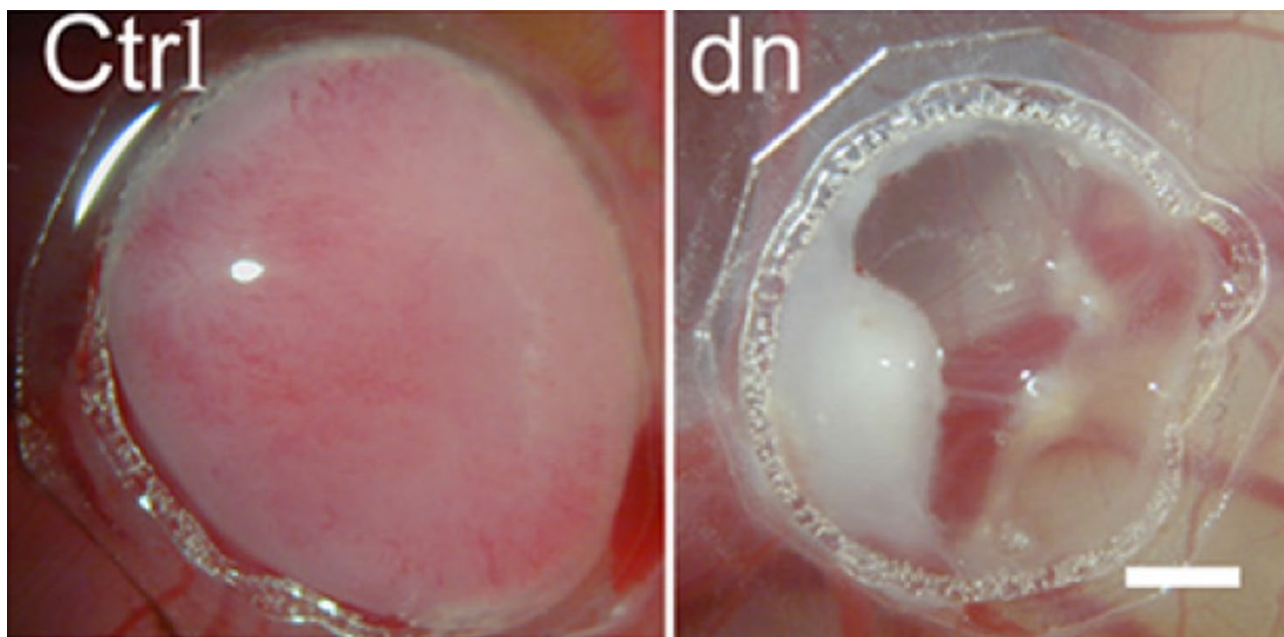


Рис. 1.2.2. Ріст пухлини із суспензії клітини гліобластоми, які були вирощені в культуральному середовищі, на ембріони курчат, 4 дні. Ctrl – контрольні клітини гліобластоми, трансфіковані вектором pcDNA3.1, а dn – клітини гліобластоми, трансфіковані генетичною конструкцією dnERN1 для пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 (протеїнкіназної та ендорибонуклеазної) [15].

Більше того, пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей ERN1 виражено змінює рівень експресії великої кількості генів, зокрема і генів, що контролюють міграцію та інвазію, про-онкогенів та пухлинно-супресорних генів [16]. Було показано, що саме ендорибонуклеаза сигнального протеїну ERN1 контролює експресію про-онкогена епірегуліну і що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1, як і однієї ендорибонуклеазної активності цього протеїну, різко знижують рівень експресії епірегуліну і це корелює зі зниженим проліферативним потенціалом цих клітин гліобластоми [15]. Крім того, було продемонстровано, що внесення в культуру клітин гліобластоми з пригніченими протеїнкіназною та ендорибонуклеазною активностями ERN1 рекомбінантного епірегуліну посилює проліферацію цих клітин.

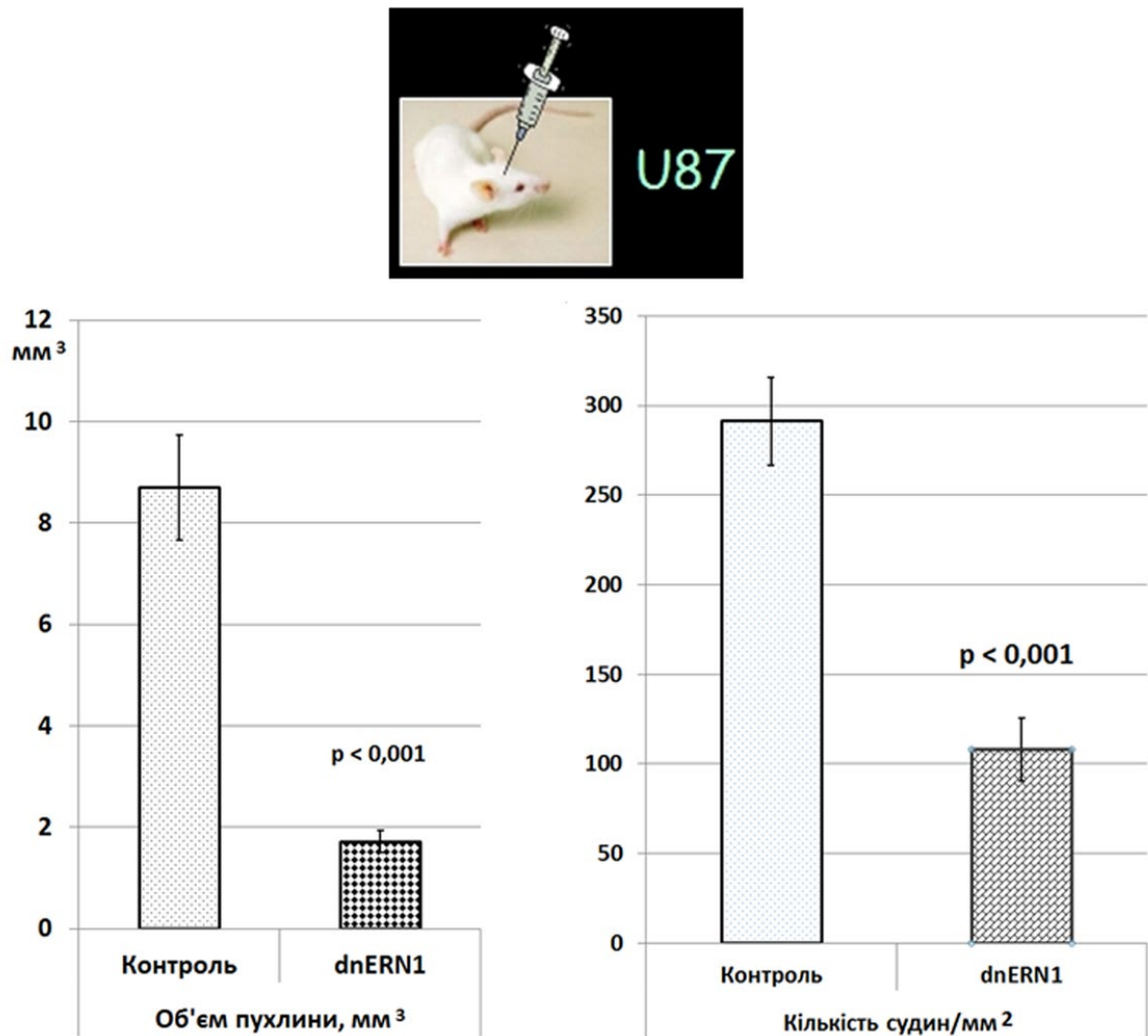


Рис. 1.2.3. Вплив блокади обох ензиматичних активностей ERN1 (протеїнкіназної та ендорибонуклеазної) на об'єм пухлин та кількість судин у них, що вирости в мозку мишей із суспензії контрольних клітини гліобластоми (Контроль) та клітин гліобластоми, трансфікованих генетичною конструкцією dnERN1, які були вирощені в культуральному середовищі (на основі даних Auf et al. [16]).

Пригнічення протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активностей ERN1 суттєво змінює також рівень експресії генів, відповідальних за проліферацію, апоптоз, ангіогенез та низку інших процесів [34, 36, 38-40].

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

Гіпоксія є комплексним фактором, що необхідний для росту пухлин шляхом активації адаптивних транскрипційних програм, які сприяють виживанню клітин, їх міграції та ангиогенезу пухлин. Клітини реагують на зміни у забезпеченні киснем через численні молекулярні та клітинні механізми, включаючи зміни в експресії генів через транскрипційні і пост-транскрипційні механізми. Гіпоксія асоційована із негативним прогнозом та поганою виживаністю пацієнтів частково через те, що низький рівень кисню знижує ефективність променевої терапії, яка вбиває пухлинні клітини шляхом утворення активних форм кисню [41]. Слід зазначити, що оксигенація не обов'язково є статичною в пухлинах, а натомість коливається в часі та ділянках пухлини від майже нормального рівня кисню до гіпоксії, що ймовірно є наслідком нестабільної та хаотичної організації неоваскуляризації пухлини.

Аналіз диференційної експресії генів у пухлинах показав підвищений рівень експресії HIF-чутливих генів або HRE (hypoxia Response Element)-зчеплених репортерних генів у перинекротичних (імовірно гіпоксичних) ділянках пухлини [41]. Чутливі до гіпоксії фактори (Hypoxia Inducible Factors) - це транскрипційні фактори, що є основними регуляторами клітинної відповіді на гіпоксію. Їх мішенями є гени, що регулюють ангиогенез, метаболізм глюкози та проліферацію клітин. Рядом досліджень було показано, що змінена експресія генів, чутливих до гіпоксії, асоційована із несприятливим клінічним прогнозом, стійкістю пухлин до терапії та рецидивами утворення пухлин [42, 43].

Транскрипційний фактор HIF складається із чутливої до кисню α -субодиниці та конститутивно експресованої β -субодиниці. За умов нормоксії субодиниця HIF α убиквітинується фактором Фон Гіппеля-Ліндау (VHL), і відповідно піддається протеасомальній деградації, але за гіпоксії взаємодія між HIF α та VHL порушується. У результаті HIF α димеризується із HIF β і зв'язується у промоторах генів, які регулюються гіпоксією, з нуклеотидною ділянкою, яка

реагує на гіпоксію (HRE) і має корову послідовність 5'-RCGTG-3'. Гетеродимерний комплекс HIF активує транскрипцію сотень генів, які модулюють проліферацію, виживання, рухливість та метаболізм пухлинних клітин. Відомо про три форми HIFа субодиниці: (HIF-1а, HIF-2а та HIF-3а). Багато солідних пухлин, у тому числі пухлини мозку, мають підвищений рівень експресії HIF-1а та/або HIF-2а субодиниць, окрім того спостерігається кореляція між експресією цих факторів та ступенем прогресування пухлини [44]. Останні дослідження говорять про надмірну експресією HIF-2а у стовбурових клітинах гліоми та колокалізацію HIF з іншими маркерами стовбурових клітин у зразках пухлин [45].

Мутації у генах, що відомі як супресори пухлин, p53 та PTEN, також змінюють регуляцію транскрипційних факторів HIF за умов гіпоксії. Надмірна експресія PTEN пригнічує гіпоксичне накопичення протеїну HIF-1а та активацію цільового гена HIF у клітинах гліобластоми. У дослідженнях Ravi et al. [46] було показано, що p53 сприяє MDM2-опосередкованому убіквітинуванию та деградації HIF-1а, а втрата p53 веде до ампліфікації транскрипційного фактора HIF-1а. Для прогресування гліоми, критично важливими є активуючі мутації (gain-of-function) ізоцитратдегідрогенази 1/2 (IDH), ключового ензиму циклу трикарбонових кислот. Гліоми з мутацією в IDH менше залежать від гліколізу та більше від окисного фосфорилування для виробництва енергії, ніж гліоми з IDH1 дикого типу і відповідно є більш адаптованими [47]. У гліомах з мутантною формою IDH1 (R132H), спостерігається підвищена транскрипційна активність HIF-1а, що призводить до посилення ангиогенезу.

Добре відомо, що активація HIF відіграє важливу роль у формуванні пухлини. Однак нещодавні дослідження показують, що картина є складнішою, оскільки є докази того, що HIF1-а та HIF2-а мають антагоністичний зв'язок [48, 49]. На відміну від вищезгаданих досліджень, які демонструють підвищений рівень експресії HIF1-а в гліомі з мутантною IDH1, інші дослідження виявили низькі рівні HIF1-а, відповідно активація HIF1-а у відповідь на гіпоксію є

меншою, що призводить до зменшеної експресії пов'язаних з HIF1-а генів і зсуву метаболізму пухлини з гліколітичного шляху на окисне фосфорилування [50]. Гіпотеза про те, що мутація IDH1 стимулює проліферацію клітин через зниження експресії HIF, була підтверджена в кількох клінічних дослідженнях. У дослідженні Williams et al. [51] було проаналізовано 120 зразків гліоми людини і показано, що лише у незначній частині зразків гліом із мутантною формою IDH1 спостерігається підвищена експресія HIF1-а, і як правило, обмежується некротичними ділянками. Таким чином, метаболічні порушення, пов'язані з гіпоксією, залишаються важливою областю досліджень в біології гліом з мутантною IDH та гліом дикого типу.

Гіпоксична регуляція експресії генів є багатогранною і окрім транскрипційних механізмів цієї регуляції відомі ще пост-транскрипційні. Так, експресія генів за умов гіпоксії може залежати від факторів сплайсингу і їх кіназ, а також за рахунок інших механізмів [52, 53]. Важливу роль у регуляції програм гіпоксичних пухлинних клітин відіграють і епігенетичні механізми [54]. Показано, що гіпоксія контролює також некодуючу частину геному і що некодуючі РНК можуть бути ефекторами не прямої залежності від HIF, впливаючи на утворення транскрипту або його процесінг [55]. Більше того, модулювати активність HIF можуть також активні форми кисню, доступність заліза, оксид азоту та окисно-відновний статус [56].

За умов гіпоксії змінюється експресія великої когорти генів, причому індукується експресія лише частини генів, а для багатьох інших показано пригнічення експресії на фоні збільшення транскрипційного фактора HIF I тоді як HIF є основним рушієм адаптивної експресії генів, значно менше відомо про сигнальні механізми, що регулюють залежну від гіпоксії репресію генів. Висловлено припущення, що ключовим посередником репресії генів за гіпоксії може бути REST (Repressor Element 1-Silencing Transcription factor) [57, 58]. Він локалізується у ядрі, індукується за гіпоксії і відповідає за регуляцію приблизно двадцяти відсотків генів, експресія яких пригнічується гіпоксією, причому ця

REST-залежна репресія генів принаймні частково опосередкована прямим зв'язуванням з промоторами цільових генів [57]. Вирішальну роль у регуляції експресії генів за умов гіпоксії відіграють і мікроРНК, які функціонують як інгібуючі модулятори експресії генів, націлюючись на мРНК і сприяють або деградації мРНК, або репресії трансляції, причому їх експресія диференційовано регулюється в умовах гіпоксії [59, 60].

Важливу роль в гіпоксичній регуляції експресії генів відіграє і стрес ендоплазматичного ретикулума, зокрема його сигнальний протеїн ERN1. Численними дослідженнями встановлено, що пригнічення ERN1 суттєво змінює характер гіпоксичної регуляції великої кількості генів у клітинах гліобластоми, причому експресія одних генів при цьому посилюється, а інших – знижується, але по-різному для різних генів [37, 38, 40, 61-80]. Це може бути обумовлено тим, що стрес ЕР перепрограмує геном, індукуючи резистентність клітин до токсичних ефектів гіпоксії, робить гіпоксію необхідною для інтенсивного росту пухлин переважно через ERN1 сигнальний шлях. Тому при інгібуванні ERN1 спостерігаються зворотні процеси, в результаті яких змінюється чутливість генів до гіпоксії.

1.4. Значення метаболізму глутаміну та глюкози у контролі проліферації пухлинних клітин

Глюкоза і глутамін є важливими субстратами для гліколізу та глутамінолізу і необхідні для росту злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, і їх високої агресивності шляхом впливу на клітинний цикл на різних етапах, причому глутамін є найбільш важливий із усіх амінокислот [81, 82]. Амінокислоти і глюкоза використовуються в різних метаболічних процесах як у нормальних, так і пухлинних клітинах, але під впливом стресу ЕР у клітинах пухлин метаболізм глюкози перепрограмується [83, 84]. Було проведено біоінформаційне дослідження для визначення пов'язаних із глюкозою ознак

ризикую злоскісності гліобластоми і виживання пацієнтів [85]. Важливим для росту гліобластом є і серин, причому експресія генів синтезу серину за дефіциту глюкози і глутаміну збільшується у цих клітинах, а пригнічення ERN1 різко збільшує чутливість цих генів до дефіциту як глюкози, так і глутаміну, що свідчить про тісну взаємодію між амінокислотами і глюкозою [86, 87]. Більше того, є дані що дефіцит глюкози може пригнічувати хіміорезистентність клітин злоскісних пухлин шляхом пригнічення стресу ER, впливаючи на його сигнальні шляхи [88, 89].

Дослідження, присвячені вивченню ролі сигнального шляху ERN1 у чутливості пухлинних клітин до дефіциту поживних речовин, зокрема глюкози і глутаміну, показали, що цей сигнальний шлях контролює залежність експресії багатьох ключових генів від забезпечення клітин глюкозою та глутаміном, оскільки пригнічення ензиматичних активностей протеїну ERN1 модифікує чутливість клітин гліобластоми до дефіциту цих поживних речовин [37, 38, 61, 90-96]. Варто відмітити, що експресія різних генів у клітинах гліобластоми має різну чутливість до дефіциту як глюкози, так і глутаміну у контрольних клітинах гліобластоми і по-різному змінюється за умов пригнічення обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1.

Разом з тим, молекулярні механізми взаємодії сигнальних шляхів ERN1 і сигналювання від зміненого рівня глюкози та глутаміну виявлені ще недостатньо і безперечно заслуговують на подальше вивчення.

1.5. Транскрипційні фактори родини Notch

Транскрипційні фактори є ключовими клітинними регуляторами, які контролюють експресію практично всіх генів, у тому числі і ключових регуляторних генів. Їх функціональна активність визначає, як клітини працюють і реагують на зміни навколишнього середовища. Регуляція метаболізму на рівні

транскрипції відіграє центральну роль у контролі багатьох біологічних процесів, починаючи від прогресування клітинного циклу та підтримання внутрішньоклітинного метаболічного та фізіологічного балансу, до клітинної диференціації та розвитку [97, 98].

Велика кількість різноманітних протеїнів відіграє значну роль в успішній транскрипції РНК-полімеразою в клітинах еукаріот. До цих протеїнів відносять загальні транскрипційні фактори, кофактори, протеїнкінази, гістони та білки ремоделювання хроматину. Крім того, більшість транскрипційних факторів забезпечують пряму ініціацію транскрипції з промотора шляхом зв'язування зі специфічними послідовностями ДНК [98, 99].

Гени родини *Homeobox* кодують еволюційно консервативні фактори транскрипції, які мають вирішальну роль в ембріональному розвитку, регулюючи численні процеси, включаючи диференціювання, міграцію клітин, органогенез, рецепторну передачу сигналів і ангиогенез, та у дорослому житті, причому чітко регульований часово-просторовий патерн експресії генів *Homeobox* є критичним для нормального ембріонального розвитку мозку [100, 101]. Нещодавні численні дослідження вказують на те, що експресія генів родини *Homeobox* може бути змінена при аномальному розвитку та злоякісних новоутвореннях, у тому числі пухлинах мозку [102, 103]. Показано, що різні гени родини *Homeobox* мають або пухлино-супресивний, або пухлино-стимулюючий ефект, причому деякі гени можуть проявляти про-онкогенну роль в одному типі пухлин і мати супресивний ефект в інших пухлинах [104-107]. *MEIS1* (myeloid ecotropic viral integration site 1) задіяний у виникненні та розвитку гострого мієлоїдного лейкозу і надмірно експресується в нейробластомі, хоча є дані, що *MEIS1* може бути і негативним регулятором росту нирково-клітинної карциноми [105, 108].

Роль транскрипційного фактора *MEIS2* (*Meis homeobox 2*) в онкогенезі також неоднозначна [107, 109]. Так, було показано, що *MEIS2* пригнічує проліферацію і сприяє апоптозу клітин пухлин щитовидної залози через NF-

карраВ сигнальний шлях [107]. А у нейробластомі експресія MEIS2 є необхідною для проліферації клітин і їх виживання [109]. Такі парадоксальні спостереження підтверджують концепцію, що функціональна активація генів родини Homeobox і їх мішеней є клітино- і тканино-специфічними. Було встановлено, що транскрипційний фактор MEIS1 інгібує проліферацію клітин карциноми нирки і що пригнічення цього фактора ініціює пухлиногенез і резистентність до оксаліплатину [108, 110]. Разом з тим, пригнічення експресії транскрипційного фактора MEIS1 низькомолекулярним інгібітором WNT ICG-001 ефективно знижує метастазування клітин карциноми нирки [111]. Таким чином, MEIS1 має канцерогенну або пухлино-супресивну дію на різні новоутворення і ця невизначеність свідчить про те, що цей транскрипційний фактор має унікальну функцію в проліферації та диференціації клітин [112]. Можливо, що це залежить від ко-фактора, який зв'язується з цим транскрипційним фактором.

Показано також, що експресія транскрипційного фактора MEIS2 значно посилює виживання і проліферацію клітин нейробластоми [109]. Однак загальна парадигма полягає в тому, що зниження або посилення регуляції генів Homeobox призводить до активації ембріональних сигнальних шляхів розвитку в зрілих органах, тим самим перериваючи нормальні шляхи диференціювання та росту клітин, що, у свою чергу, може сприяти аномальній поведінці клітин і неоплазії.

Важливою в плані контролю росту злоякісних пухлин є група Homeobox транскрипційних факторів LIM (LHX1, LHX2 та LHX6), які мають у своїй структурі унікальний LIM домен, що збагачений на цистеїн і зв'язує цинк. Вони задіяні в ембріогенезі і розвитку головного мозку, а також причетні до контролю пухлинного росту, причому можуть проявляти як про-онкогенну, так і анти-онкогенну дію, що можливо залежить від ко-фактора, який зв'язується з транскрипційним фактором [113-117]. Відомо, що транскрипційні фактори в процесі транскрипційної регуляції взаємодіють з декількома іншими протеїнами, які по-різному можуть модифікувати результат цієї регуляції [114].

Протеїн LIM homeobox 1 (LHX1) є онкогеном, який конститутивно експресується у всіх метастатичних тканинах і його сайленсинг зменшує метастазування на моделі *in vivo* [115]. Цей транскрипційний фактор задіяний у регуляції експресії різних генів, у тому числі тих, що контролюють міграцію клітин [115]. Транскрипційний фактор LHX2 задіяний у прогресії карциноми носоглотки шляхом активації фактора росту FGF1 та його рецептора FGFR [116]. Але є дані про те, що надекспресія LHX2 пригнічує проліферацію клітин гострої лімфобластної лейкемії Т-клітин людини [117]. Транскрипційний фактор LHX6 є пухлинним супресором і його надекспресія причетна до інгібуючого ефекту нокдауну мікроРНК miR-346 на ріст клітин колоректальної пухлини [118]. Показано також, що miR-1290 посилює проліферацію, міграцію та інвазію клітин гліобластоми впливаючи на мРНК LHX6 [119].

Sperm associated antigen 4 (SPAG4) також відноситься до транскрипційних факторів родини Homeobox і є потенційним біомаркером прогресії гліобластоми, який посилено експресується у різних злоякісних пухлинах і контролює міграцію клітин [120, 121]. До родини Homeobox генів відноситься також ген транскрипційного фактора NKX3-1 (NK3 homeobox 1), який є чутливим до андрогенів і залежним від рецептора андрогенів у клітинах аденокарциноми простати, але задіяний і в розвитку інших пухлин [122, 123]. Транскрипційний фактор ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2) контролює експресію переважно задіяних у регуляції епітелійно-мезенхімного переходу шляхом зв'язування зі специфічними послідовностями ДНК у промоторах таргентних генів злоякісних пухлин, посилює поліферацію клітин та їх метастазування і є підвищеним у злоякісних пухлинах [124, 125]. До транскрипційних факторів родини Homeobox відноситься також TGIF (TGFB-induced factor homeobox 1), який відіграє канцерогенну роль і рівень його експресії у пухлинах є збільшеним, хоча у HER2-негативних формах аденокарциноми грудної залози знижений рівень цього транскрипційного фактора асоціюється з прогресією пухлини [126, 127].

Не менш важливу роль у рості злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, відіграють також такі транскрипційні фактори родини Homeobox як PAX6 (paired box 6), PBX3 (PBX homeobox 3), PBXIP1/HPIR (PBX homeobox interacting protein 1/ Hematopoietic PBX-interacting protein) та PRRX1 (Paired related homeobox 1). Транскрипційний фактор PAX6 експресується у різних пухлинних клітинах і приймає активну участь у прогресуванні росту пухлин шляхом активації гена тирозинкінази рецептора прото-онкогена MET / HGFR (MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase / Hepatocyte Growth Factor Receptor) [128]. Було показано, що мікроРНК miR-433 пригнічує ріст ретинобластоми шляхом зниження експресії NOTCH1 і PAX6 [129]. Фактор транскрипції PBX3 також приймає участь у регуляції гліколізу та прогресії злоякісних пухлин шляхом активації AKT/mTOR сигналювання, причому у цій регуляції задіяна і довга некодуюча РНК DSCAM-AS1, змінюючи дію мікроРНК miR-136-5p [130, 131].

Протеїн, що взаємодіє з рецептором естрогенів PBXIP1 (PBX homeobox interacting protein 1), який ще часто називають HPIR (hematopoietic PBX-interacting protein), також проявляє про-онкогенні ефекти, посилюючи проліферацію пухлинних клітин і збільшуючи експресію генів, залежних від естрогенів, шляхом активації AKT і MAPK [132, 133]. У центрі нашої уваги був ще один транскрипційний фактор родини Homeobox – PRRX1 (paired related homeobox 1). Він переважно функціонує як ко-активатор транскрипції, послаблює аутофагію, впливаючи на метаболізм жирних кислот у карциномі, проявляє свою дію на епітелійно-мезенхімний перехід та інвазію пухлинних клітин [134, 135].

Таким чином, транскрипційні фактори родини Homeobox є важливими факторами регуляції експресії генів на транскрипційному рівні як за фізіологічних, так і патологічних умов, у тому числі і за злоякісного росту, переважно сприяючи росту злоякісних пухлин та їх інвазивності. Разом з тим, їх

роль багатогранна і може бути направлена як на прискорення росту злоякісних пухлин, так і на їх пригнічення.

1.6. Механізми регуляції експресії генів родини Номеобок

Регуляція експресії генів родини Номеобок є складним комплексним процесом, що включає у себе такі складові як транскрипція, процесинг пре-РНК, пост-транскрипційна регуляція за участі мікроРНК, а також епігенетична регуляція. Складне багаторівневе регулювання генів Номеобок сприяє стабільності експресії цих генів у процесі нормального ембріонального розвитку та в онкогенезі. Транскрипційний рівень контролю експресії генів і Номеобок генів зокрема є основним, але він також багатокomпонентний, оскільки процес транскрипції контролюється не лише факторами транскрипції, а і різними ко-факторами, їх активаторами та інгібіторами, протеїнкіназами і протеїнофосфатазами [136-138]. Альтернативний сплайсинг та процесинг пре-мРНК також вносять певний вклад в експресію РНК [139].

Одним із важливих механізмів регулювання експресії генів родини Номеобок, як і більшості інших генів, є пригнічення експресії за допомогою мікроРНК. Це короткі послідовності РНК, що негативно регулюють експресію генів шляхом зв'язування з 3'-нетранслюємою ділянкою цільової мРНК і що призводить до їх деградації або замовчування трансляції через RNA-induced silencing complex [118, 119, 124, 129, 140-149]. Було показано, що мікроРНК miR-506 інактивує Wnt/бета-катенін сигнальний шлях знижуючи експресію транскрипційного фактора LHX2 і це призводить до пригнічення росту і метастазування карциноми носоглотки [140]. Через цей же сигнальний шлях реалізується вплив і мікроРНК miR-330-3p на інвазію та міграцію злоякісних пухлин шлунку через зниження експресії PRRX1 [143]. А зниження рівня експресії пухлинного супресора PAX6 за допомогою мікроРНК miR-223

посилює ріст та інвазію клітин гліобластоми [142]. Було також виявлено зниження інтенсивності проліферації та інвазії клітин гліоми за умов пригнічення рівня мікроРНК miR-10b і miR-21 [146].

Суттєве значення в контролі експресії генів належить епігенетичній регуляції [150-151]. Важливу роль в регуляції експресії генів відіграють і великі некодуючі РНК (lncRNAs), які кодуються більшою половиною всього геному, причому вони є функціональними і залучені у процес регуляції експресії генів епігенетично [151-156]. Більшість великих некодуючих РНК суттєво впливають на розвиток різних злоякісних пухлин, у тому числі і гліобластом, а також на їх резистентність до терапії [153-157]. Було показано, що великі некодуючі РНК є новими генетичними гравцями розвитку хіміорезистентності і що опосередкована метилуванням ДНК активація lncRNA SNHG12 ініціює розвиток резистентності до темозоломіду у клітинах гліобластоми [154, 155]. Великі некодуючі РНК також можуть контролювати активність мікроРНК і таким чином впливати на експресію певних генів і прогресію злоякісних пухлин [148].

1.7. Механізми перепрограмування геному у клітинах злоякісних пухлин

Численні дослідження метаболізму в клітинах злоякісних пухлин свідчать не просто про зміни в окремих метаболічних процесах, а про зміну програми метаболізму, про його перепрограмування, причому опосередковано через перепрограмування експресії всього геному. Більше того, це перепрограмування є динамічним процесом і може змінюватися з часом росту пухлини у зв'язку з появою мутацій та утворенням клонів мутантних клітин, розвитком гетерогенності пухлини. Вирішальну роль як у рості злоякісної пухлини, так і в її багатоплановому перепрограмуванні відіграє стрес ендоплазматичного ретикулума, який забезпечує інтенсивний ріст пухлини і її полірезистентність, у тому числі і до токсичних ефектів гіпоксії. На даний момент є підґрунтя вважати,

що основним регулятором такого перепрограмування експресії всього геному є ERN1/IRE1 сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, оскільки його пригнічення не лише знижує інтенсивність росту пухлини, а і відновлює її чутливість до токсичних речовин, у тому числі і лікарських препаратів.

І в цьому плані, представлені у цій дисертаційній роботі результати розкривають механізми цього зворотного до перепрограмування експресії всього геному процесу в результаті пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 або лише його ендорибонуклеази, що безсумнівно буде сприяти розробці нових підходів до профілактики і лікування онкопатологій.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та умови проведення експериментів

Експерименти проводили на культурі клітин гліобластоми лінії U87MG, яка була отримана із компанії ATCC (США), а також на генетично модифікованих сублініях цих клітин, які були отримані професором Олександром Мінченком у співпраці з професором Michel Moenner (INSERM U1029 Лабораторія молекулярних механізмів ангіогенезу, Університет Бордо 1, Франція) [15]. Клітини гліобластоми лінії U87MG росли у середовищі DMEM (*Gibco, Invitrogen*, США). Це модифіковане Дульбекко мінімальне есенціальне середовище Ігла з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), яке було доповнене глутаміном (2 мМ), ембріональною сироваткою телят (*Equitech-Bio, Inc.*, США; 10 %), пеніциліном (*Gibco*, США; 100 од./мл) та стрептоміцином (*Gibco*, США; 0,1 мг / мл). Клітини росли в інкубаторі при 37°C і зволоженій атмосфері повітря (95 %) у присутності 5 % CO₂, як описано [15].

В роботі було використано три сублінії клітин гліобластоми лінії U87MG: 1) – клітини без обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) сигнального протеїну ERN1, стабільно трансфіковані генетичною конструкцією dnERN1, яка містила у векторі pcDNA3.1 кДНК ERN1 без цитоплазматичного домена; 2) – клітини з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1, стабільно трансфіковані генетичною конструкцією dnrERN1, яка містила кДНК ERN1 з наведеною мутацією в ендорибонуклеазному домені, у векторі pcDNA3.1) та 3) – контрольні клітин гліобластоми, стабільно трансфіковані порожнім (без вставки) вектором pcDNA3.1. Ці генетично модифіковані клітини, як і контрольні клітини гліобластоми росли у тому ж середовищі DMEM, але в присутності аміноглікозидного антибіотика G418 (*Sigma-Aldrich*, США), який блокує синтез поліпептидів шляхом інгібування етапу елонгації і таким чином не дозволяє рости клітинам без вектора pcDNA3.1.

Умови гіпоксії моделювали за допомогою DMOG (dimethyloxalylglycine; (Sigma-Aldrich), який є інгібітором пролілгідроксилаз субодиниці транскрипційного фактора HIF1A), в концентрації 0,5 мМ, як описано [137]. Для створення умов дефіциту глутаміну і глюкози до культури клітин додавали середовище DMEM з усіма перерахованими вище добавками, але без глюкози або глутаміну.

2.2. Методи досліджень

Для виконання запланованих досліджень були використанні сучасні методи біохімії та молекулярної біології, включаючи методи культивування стабільно трансфікованих клітин гліобластоми лінії U87MG з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN1) та клітин без обох ензиматичних активностей цього сигнального протеїну (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної; dnERN1), і для порівняння – контрольні клітини гліобластоми, трансфіковані вектором без вставки, а також методи біоінформатики та статистичної обробки отриманих результатів.

2.2.1. Виділення РНК із клітин гліобластоми

РНК із клітин гліобластоми лінії U87MG та її генетично модифікованих субліній проводили за допомогою реагенту TRIzol згідно протоколу виробника (*Invitrogen*, США) як описано [15].

З чашок з культурами клітин відбирали середовище вирощування, клітини промивали фосфатно-сольовим буфером DPBS і додавали 0,5 мл реагенту TRIzol для лізису клітин. Через 5 хвилин лізат переносили у центрифужні мікропробірки і додавали 100 мкл хлороформу, перемішували, і через 5 хвилин центрифугували у центрифугу (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Німеччина)

протягом 10 хвилин при 15000 g та 4 °C для розділення водної та фенольної фаз. Верхню водну фазу відбирали і переносили у нові пробірки, а РНК осаджували рівним об'ємом ізопропанолу при -20 °C протягом 2 годин. Для осадження РНК пробірки центрифугували протягом 10 хвилин при 15000 g та 4 °C. Осади РНК промивали 75 % етанолом і розчиняли у воді без рибонуклеаз. Для додаткового очищення від можливих залишків фенолу отримані РНК повторно осаджували 95 % етанолом, що містив 0,1 М ацетату натрію, при -20 °C протягом 1 години і центрифугували 5 хвилин при 15000 g та 4 °C. Осад РНК розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз і отриману РНК використовували для синтезу комплементарної ДНК. Концентрацію РНК, а також її спектральні характеристики вимірювали за допомогою наноспектрофотометру. На Рис. 2.2.1 представлено спектральні характеристики типового препарату РНК із клітин гліобластоми, які переконливо свідчать про високий ступінь їх чистоти.

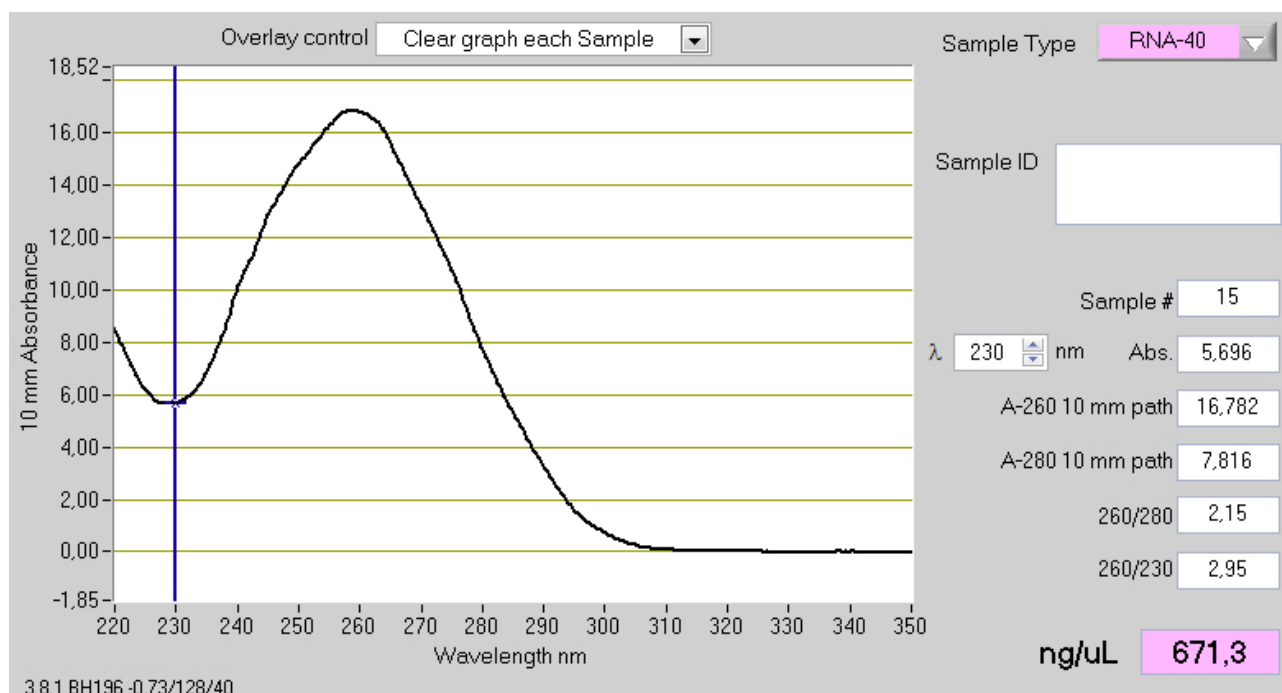


Рис. 2.2.1. Спектральні характеристики типового препарату РНК із клітин гліобластоми.

2.2.2. Синтез комплементарних ДНК зворотною транскриптазою

Для синтезу комплементарної ДНК був використаний набір Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для зворотної транскрипції в реакцію брали 1 мкг РНК із клітин гліобластоми лінії U87MG і додавали воду до 10 мкл. Потім додавали 10 мкл завчасно підготовленої суміші реагентів з набору для синтезу кДНК, яка включала в себе 4 мкл 5× реакційного буферу для зворотної транскрипції, 1 мкл суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTP mix), 0,5 мкл праймера для зворотної транскрипції, 0,5 мкл суміші зворотної транскриптази та інгібітора РНКаз для захисту РНК (Verso Enzyme mix) та вільну від рибонуклеаз воду. Проби інкубували протягом 30 хвилин при 42 °С. Для зупинення реакції реакційну суміш прогрівали протягом 2 хвилин при 95 °С, а потім поміщали на лід для охолодження. Отриману кДНК розводили у 100 разів і використовували для дослідження рівня експресії генів за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Для зворотної транскрипції мікроРНК використовували набір Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, Японія), який включає етап поліаденілювання мікроРНК до початку її зворотної транскрипції.

2.2.3. Визначення експресії мРНК методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі

Рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Nobox, а також бета-актину (ACTB) як контрольного гена, визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі використовуючи 2х-реакційну суміш SYBRGreen Mix (ABgene, Thermo Fisher Scientific, Великобританія) та апарат для ампліфікації „QuantStudio 5 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems, США). Для ампліфікації до 3 мкл розчину

кДНК додавали 2× реакційну суміш Absolute QPCR SYBR-Green Mix та суміш прямого і зворотного олігонуклеотидних праймерів (Sigma-Aldrich, США, або Metabion Int, AG, Німеччина), специфічних для кожного гена, та вільну від нуклеаз воду до 20 мкл. Пари праймерів підбирали за допомогою програми Primer3web version 4.1.0. Використані для ампліфікації праймери представлені у таблицях 2.2.1 та 2.2.2).

Таблиця 2.2.1

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
<i>MEIS1</i>	Meis homeobox 1	F: 5'- aagtgatggcttgacaac R: 5'- tgtgccaactgcttttctg	1472–1491 1661–1642	NM_002398.3
<i>MEIS2</i>	Meis homeobox 2	F: 5'- gtcagcaacacatggggatc R: 5'- ggaccaccctgagaaacgta	1505–1524 1673–1654	NM_002399.4
<i>MEIS3</i>	Meis homeobox 3	F: 5'- cagcctcccagaccagaata R: 5'- tcctggtccaagtctcatc	1028–1047 1222–1203	NM_020160.3
<i>SPAG4</i>	sperm associated antigen 4	F: 5'- cagcttctggaactacgcac R: 5'- gtggatgctgcagagtgatg	1042–1061 1193–1174	NM_003116.3
<i>LHX1</i>	LIM homeobox 1	F: 5'- atttatttcggtcccgccg R: 5'- ccaaaactgcaccagga	354–373 591–572	NM_005568.5
<i>LHX2</i>	LIM homeobox 2	F: 5'- tcctactacaatggcgtgg R: 5'- gtcggggtgtggttaatgg	1214–1233 1457–1438	NM_004789.4
<i>LHX6</i>	LIM homeobox 6	F: 5'- cggaacagctgcaggttatg R: 5'- ctgaacggggtgtagtgat	987–1006 1224–1205	NM_014368.5
<i>NKX3-1</i>	NK3 homeobox 1	F: 5'- aagaacctcaagctcacgga R: 5'- tgcacctgagctggcatta	524–543 591–572	NM_006167.4
<i>ACTB</i>	beta-actin	F: 5'- catccgcaaagacctgtacg R: 5'- cctgcttgcgtgatccacatc	948–967 1165–1146	NM_001101.5

Ампліфікацію усіх вибраних для дослідження генів проводили протягом 40 циклів за такими параметрами: 20 сек. при 95 °C – денатурація; 20 сек. при 55 °C – “відпал” олігонуклеотидних праймерів і 30 сек. при 72 °C для синтезу продукту ампліфікації. Дослідження експресії кожного із генів транскрипційних факторів родини Номеобок проводили у трьох повторах у кожному із чотирьох незалежних експериментів.

Таблиця 2.2.2

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
<i>PAX6</i>	Paired box 6	F: 5'- tgtccaacggatgtgtgagt R: 5'- ttccaagcaaagatggac	466-485 627-608	NM_000280.6
<i>PBX3</i>	PBX homeobox 3	F: 5'- aacaaccagaccaattcgcc R: 5'- cctccaaggccatcactgta	1054-1073 1262-1243	NM_006195.6
<i>PBXIP1/HPIP</i>	PBX homeobox interacting protein 1/ Hematopoietic PBX-interacting protein	F: 5'- cctcaacatgtgcctccttg R: 5'- tccagcagaagacccatgtt	649-668 885-866	NM_020524.4
<i>PRRX1</i>	Paired related homeobox 1	F: 5'- cgtacagatcctcgtccctc R: 5'- tccttggecttcagtctcag	681-700 858-839	NM_006902.5
<i>TGIF1</i>	TGFB induced factor homeobox 1	F: 5'- acaagttacgggagagtcgg R: 5'- gttgcccctctccttctct	208-227 234-215	NM_003244.4
<i>ZEB2</i>	Zinc finger E-box binding homeobox 2	F: 5'- actcctgtctgtctcgcaaa R: 5'- gctcgataagggtggtgcttg	3198-3217 3383-3364	NM_014795.4
<i>ERN1</i>	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	F: 5'- ccatgccgaagttcagatgg R: 5'- gtgaggccgcatagtaaag	437-456 671-652	NM_001433.5
<i>XBP1</i>	X-box binding protein 1	F: 5'- tgccaccctccagaacatc R: 5'- aaggagggtgtaaggaac	584-603 779-760	NM_005080.4

Якість продуктів ампліфікації аналізували за допомогою кривих плавлення та електрофорезу в 3 % агарозному гелі. Аналіз кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі проводили за допомогою спеціальної комп'ютерної програми “Differential Expression Calculator”. Значення рівня експресії мРНК досліджених генів були нормалізовані по рівню експресії мРНК бета-актину (АСТВ) та представлені у відсотках від контролю (100 %).

2.2.4. Визначення експресії мікроРНК методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі

Рівень експресії мікроРНК у клітинах гліобластоми визначали методом кількісної полімеразної реакції у реальному часі з використанням специфічного для кожної мікроРНК прямого праймера і універсального для аналізу мікроРНК зворотного праймера, які були отримані із (Sigma-Aldrich, США). Їх характеристики представлені у таблиці 2.3. Значення експресії різних мікроРНК були нормалізовані по рівню експресії U6 РНК як відсоток від контролю.

Таблиця 2.3

Характеристики праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР мікроРНК

Символ гена	Назва гена	Послідовності праймерів	Номери нуклеотидів у відповідній послідовності	Номер у GenBank
miR-19a-3p	microRNA 19a-3p	F: 5'- tgtgcaaatctatgcaaaactga	49-71	NR_029489
miR-96-5p	microRNA 96-5p	F: 5'- ttggcactagcacattttgct	9-31	NR_029512.1
miR-145-5p	microRNA 145-5p	F: 5'- gtccagtttcccaggaatccct	16-38	NR_029686.1
miR-182-5p	microRNA 182-5p	F: 5'- ttggcaatggtagaactcacact	23-46	NR_029614.1

2.2.5. Сайленсінг мРНК

Були також проведені дослідження з клітинами гліобластоми з нокдауном мРНК ERN1/IRE1 та XBP1 за допомогою специфічних малих інтерферуючих РНК (siRNA). Для цього були використані siRNA проти ERN1/IRE1 людини (5'-GCGUCUUUUACUACGUAAUCU-3') від Eurofins MWG Operon (Німеччина), а siRNA проти XBP1 людини (5'-GCUCUUUCCCUCAUGUAUAC) як і контрольна siRNA (ON-TARGETplus Control Pool, Non-Targeting pool; catalog: D-001810-10-05) були отримані з (Dharmacon, Horizon Discovery Group Company, США). Сайленсінг ERN1 та XBP1 проводили протягом 48 годин, як було описано Auf et al. [15].

2.2.6. Вестерн-блот аналіз протеїнів

Вестерн-блот аналіз протеїнів проводили як описано Minchenko et al. [158]. Для інгібування протеаз і фосфатаз був використаний коктейль інгібіторів із Roche (Німеччина). Протеїни розділяли електрофорезом у 12% поліакриламідному гелі з SDS і переносили на нітроцелюлозну мембрану (Bio-Rad Lab., Німеччина) у камері для напів-сухого переносу (semi-dry blotting system). Маркером молекулярної маси слугував Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder (#26617). Мембрани блокували 5 % обезжиреним молоком у TBST буфері протягом 2 годин і інкубували з первинними антитілами до HIF1A (Novus Biologicals, NBP2-75978, rabbit monoclonal) та ZEB2, (Novus Biologicals, H00009839-MO4, mouse monoclonal), а також з моноклональними антитілами миші до АСТВ (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) протягом 16 годин при 4 °C. Як вторинні антитіла були використані goat anti-mouse IgG та goat anti-rabbit IgG (ThermoFisher Scientific, США). Для виявлення комплексів протеїнів із специфічними антитілами використовували Amersham ECL Western Blotting detection reagent.

2.2.7. Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів родини Homeobox

Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів на наявність сайтів зв'язування транскрипційного фактора HIF проводили для генів родини Homeobox. Промоторні ділянки генів виявляли на сайті <https://www.activemotif.com/catalog/901/lightswitch-promoter-reporter-goclone-collection> і потім проводили пошук сайтів зв'язування транскрипційного фактора HIF: A(G)CGTGC(G) на обох ланцюгах промоторної послідовності генів родини Homeobox.

2.2.8. Біоінформаційний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК родини Homeobox

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

2.3. Аналіз результатів та їх статистична обробка

Статистичну обробку даних по експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox, отриманих в результаті проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, проводили за допомогою спеціальної

програми “Differential expression calculator”. Усі значення Δ , ΔC_t від трьох повторів вимірювання були виражені як середнє і ці середні дані чотирьох незалежних експериментів опрацьовували статистично у програмі Excel та програмі GraphPad Prism8 і виражали як $M \pm SEM$ (стандартна помилка середнього). Отримані дані були проаналізовані на нормальність розподілу за допомогою графічного інструменту (діаграма нормальної ймовірності) та гістограми. Для всіх отриманих результатів було показано нормальний розподіл. Оцінку показника статистичної достовірності відмінностей p здійснювали за t -критерієм Стюдента. Також були застосовані тест Д’Агостіно-Пірсона (p був близький до 1,00) та тест Шапіро – Вілка ($W > 0,9$; $p > 0,9$) для аналізу деяких наборів даних [159]. Різницю між середніми значеннями вважали статистично значимою при значенні похибки $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У цій роботі були проведені дослідження, направлені на в'яснення ролі сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума IRE1/ERN1 і, зокрема, його протеїнкіназної та ендорибонуклеазної активності, в опосередкованій стресом ендоплазматичного ретикулума регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини *Homeobox* у клітинах гліобластоми U87MG та їх можливий вклад у анти-проліферативний ефект, обумовлений пригніченням IRE1, а також ролі гіпоксії та дефіциту глутаміну і глюкози в регуляції експресії цих генів транскрипційних факторів у залежності від функціональної активності IRE1.

3.1. Експресія генів родини *Homeobox* у клітинах гліобластоми з пригніченою функцією сигнального протеїну IRE1

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії мРНК ZEB2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) істотно знижувався (-69 % і -66 %, відповідно) у порівнянні з контрольними клітинами (Рис. 3.1.1). Подібні зміни рівня експресії мРНК були показані і для транскрипційного фактора TGIF1. Із даних, представлених на Рис. 3.1.2, видно, що рівень експресії мРНК TGIF1 знижується на 43 % у клітинах гліобластоми з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1, причому при інгібуванні лише ендорибонуклеазної активності ERN1 зміни в експресії цієї мРНК були дуже близькими. Таким чином, зміни в експресії мРНК транскрипційного фактора ZEB2 були більш вираженими у порівнянні зі змінами рівня експресії мРНК TGIF1 в обох типах пригнічення сигнального протеїну

ERN1, але близькими за величиною у клітинах з пригніченою ендорибонуклеазою і обома ензиматичними активностями протеїну ERN1.

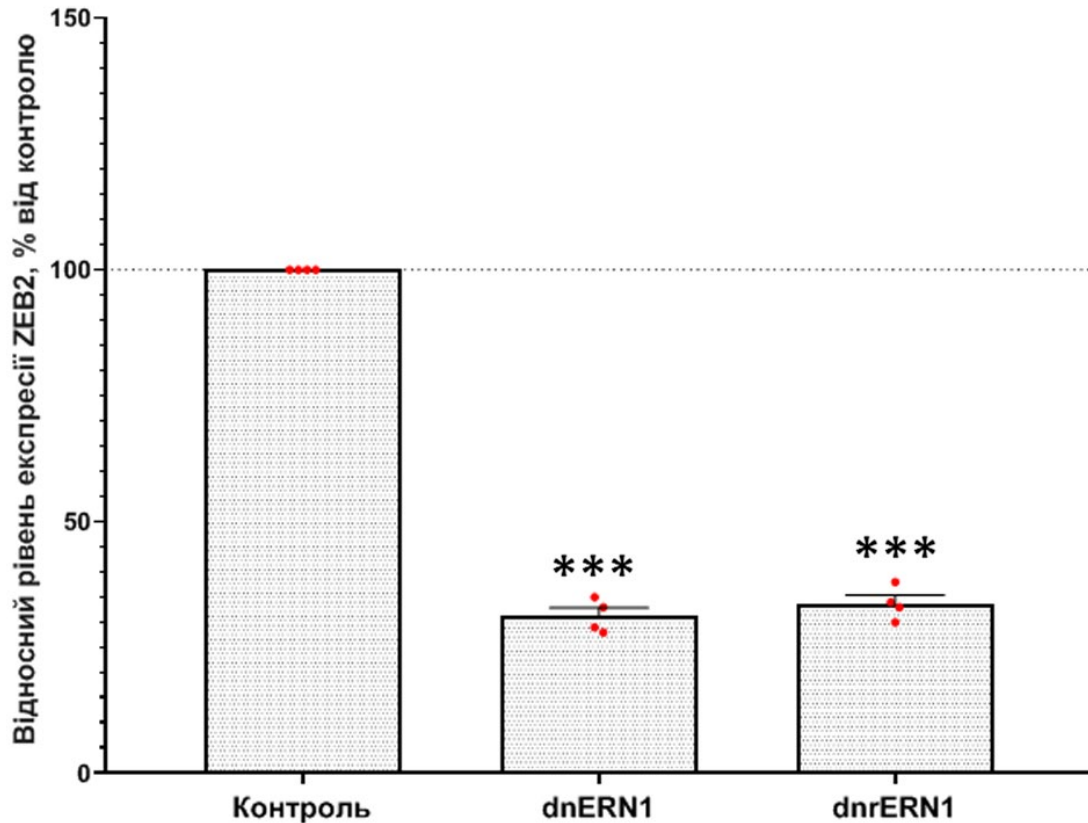


Рис 3.1.1. Відносний рівень експресії мРНК ZEB2 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії мРНК ZEB2 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

Протилежно направлені зміни в експресії мРНК були виявлені у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) для декількох інших генів транскрипційних факторів родини Homeobox: PBX3, PBXIP1, PAX6 і PRRX1.

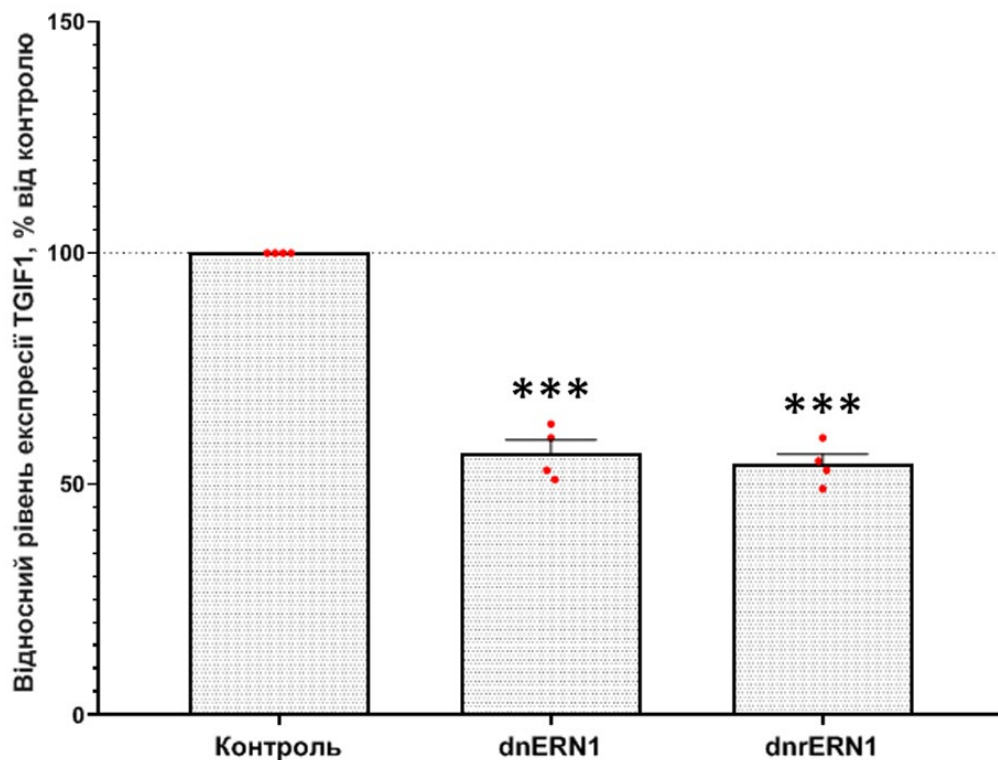


Рис 3.1.2. Відносний рівень експресії мРНК TGIF1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

Із даних, представлених на Рис. 3.1.3, видно велике підвищення рівня експресії мРНК TBX3 (+148 %) у клітинах гліобластоми з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1, але при інгібуванні лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну змін в експресії мРНК TBX3 не було виявлено. Подібний характер змін в експресії мРНК був виявлений і при дослідженні залежності експресії мРНК PRRX1 від

пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 (Рис. 3.1.4). Так, було показано, що пригнічення ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей ERN1 у клітинах гліобластоми збільшує рівень експресії мРНК PRRX1 на 113 %, але при інгібуванні лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну істотних змін рівня експресії цієї мРНК не було виявлено у порівнянні з контрольними клітинами.

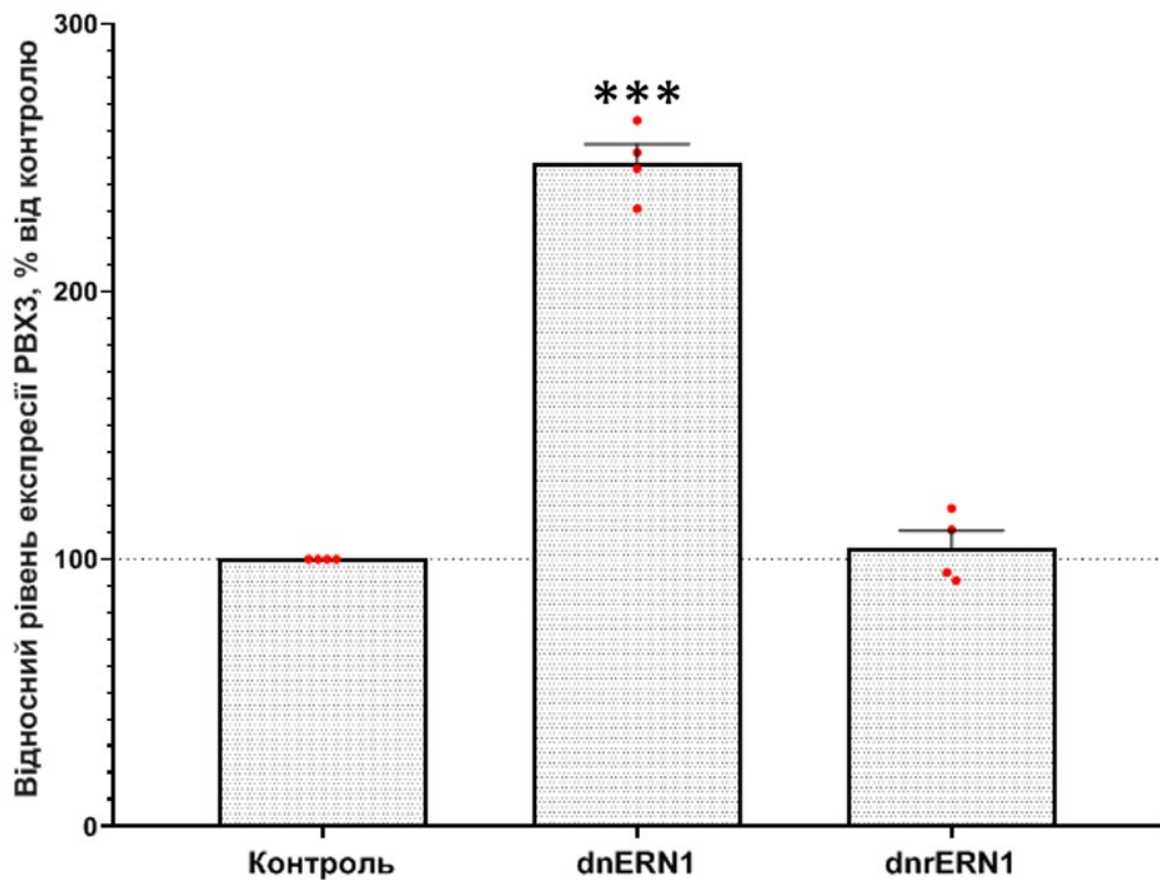


Рис 3.1.3. Відносний рівень експресії мРНК РВХЗ у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

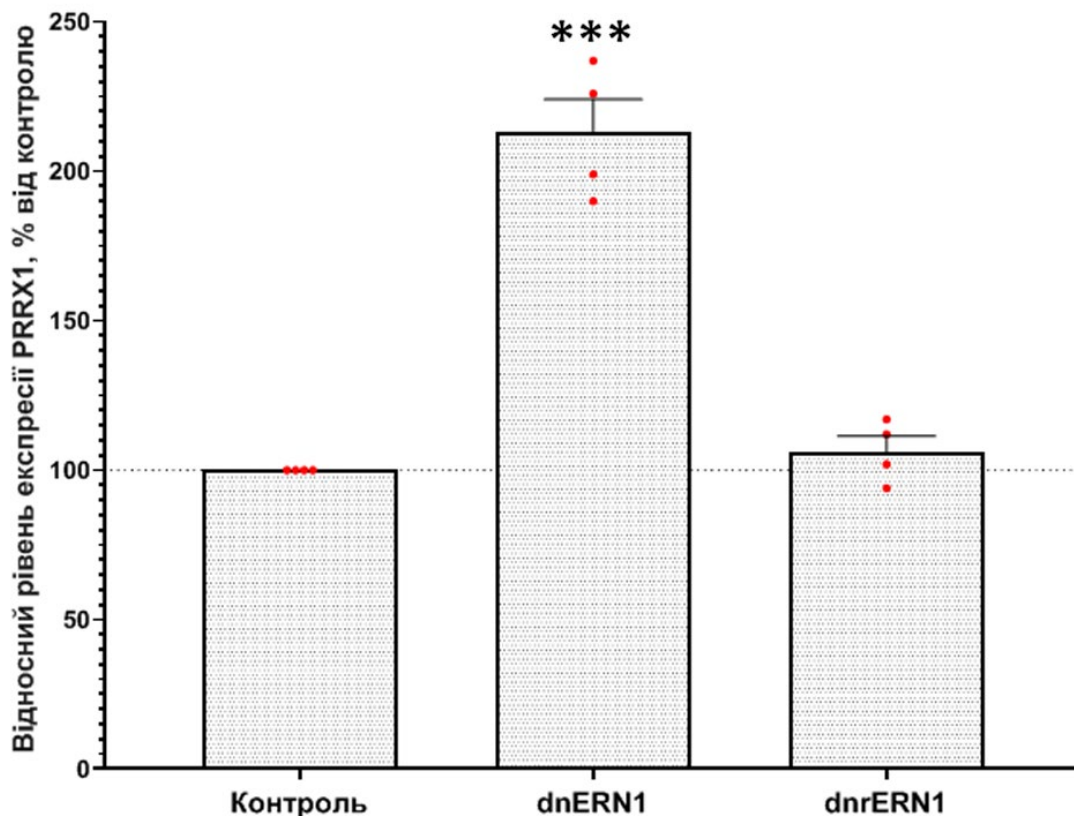


Рис 3.1.4. Відносний рівень експресії мРНК PRRX1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

Таким чином, у клітинах гліобластоми лінії U87MG одночасне пригнічення обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної) сигнального протеїну ERN1 призводить до вираженого посилення експресії генів PBX3 та PRRX1 при відсутності змін в їх експресії за

умов інгібування однієї ендорибонуклеазної активності протеїну ERN1, що вказує на важливу роль протеїнкінази ERN1 у залежному від стресу ендоплазматичного ретикулума контролі експресії цих генів.

На Рис. 3.1.5, представлені результати дослідження рівня експресії мРНК PAX6 у клітинах гліобластоми з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 та у клітинах з пригніченням лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну.

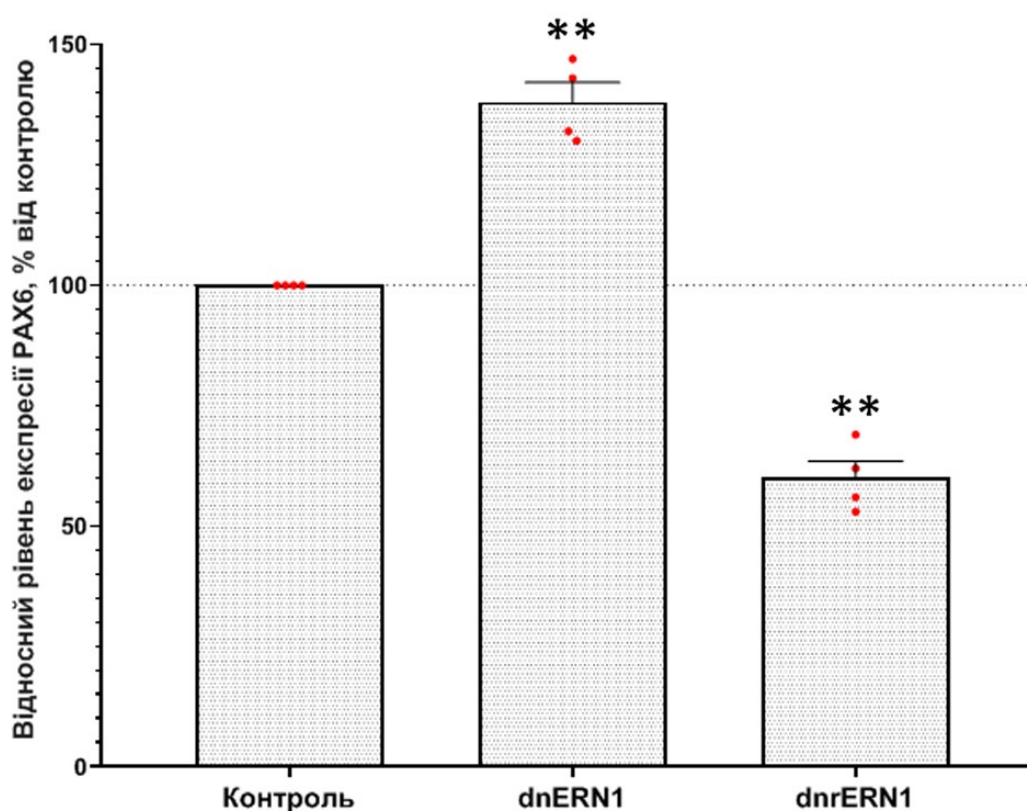


Рис 3.1.5. Відносний рівень експресії мРНК PAX6 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ** - $p < 0,001$.

Із представлених на цьому рисунку даних видно, що пригнічення обох ензиматичних активностей ERN1 підвищує рівень експресії мРНК PAX6 на 38 %. Разом з тим, у клітинах гліобластоми без ендорибонуклеазної активності ERN1 спостерігаються протилежно направлені зміни: рівень експресії мРНК PAX6 знижується на 40 % у порівнянні з контрольними клітинами.

Посилення експресії мРНК у клітинах гліобластоми без ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей ERN1 було виявлено і при дослідженні експресії транскрипційного фактора PBXIP1 (Рис. 3.1.6).

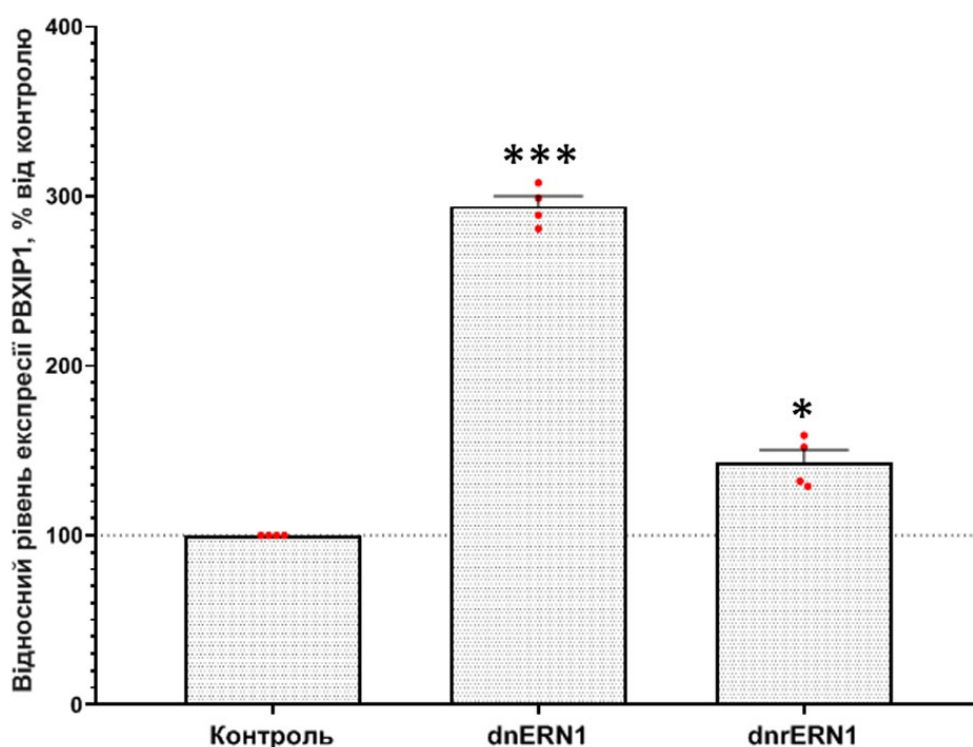


Рис 3.1.6. Відносний рівень експресії мРНК PBXIP1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною; dnERN1) та у клітинах лише без ендорибонуклеазної активності ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$.

Так, було показано, що пригнічення ендорибонуклеазної і протеїнкіназної активностей ERN1 у клітинах гліобластоми збільшує рівень експресії мРНК PBXIP1 на 194 %, але при інгібуванні лише ендорибонуклеазної активності цього сигнального протеїну зміни рівня експресії цієї мРНК були значно меншими (+43 %).

Результати дослідження експресії мРНК PAX6 та PBXIP1 вказують на участь обох ензиматичних активностей сигнального протеїну ERN1 у регуляції їх експресії у клітинах гліобластоми.

Наступним етапом роботи було перевірити залежність експресії досліджених нами генів транскрипційних факторів родини Homeobox від способу пригнічення сигнального протеїну ERN1. Для цього було проведено сайленсінг ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siRNA. Як видно із даних, представлених на Рис. 3.1.7, рівень мРНК сигнального протеїну ERN1 знизився на 88 % через 48 годин після трансфекції клітин гліобластоми специфічною до ERN1 людини siRNA у порівнянні з клітинами, які були трансфіковані не специфічною, контрольною siRNA. Встановлено, що рівень експресії мРНК транскрипційних факторів ZEB2 та TGIF1 істотно знижувався у клітинах гліобластоми з пригніченим шляхом сайленсінгу рівнем мРНК ERN1 на 65 і 40 відсотків, відповідно (Рис. 3.1.7). Разом з тим, рівень експресії мРНК транскрипційних факторів PBX3, PRRX1, PAX6 і PBXIP1 істотно підвищувався (+132, +170, +28 та +162 %, відповідно).

Отримані результати добре узгоджуються з даними експресії досліджених нами генів транскрипційних факторів родини Homeobox у клітинах гліобластоми з ERN1 без обох його ензиматичних активностей (ендорибонуклеазної і протеїнкіназної), що свідчить про відносну незалежність змін в експресії генів цих транскрипційних факторів від способу пригнічення сигнального протеїну ERN1.

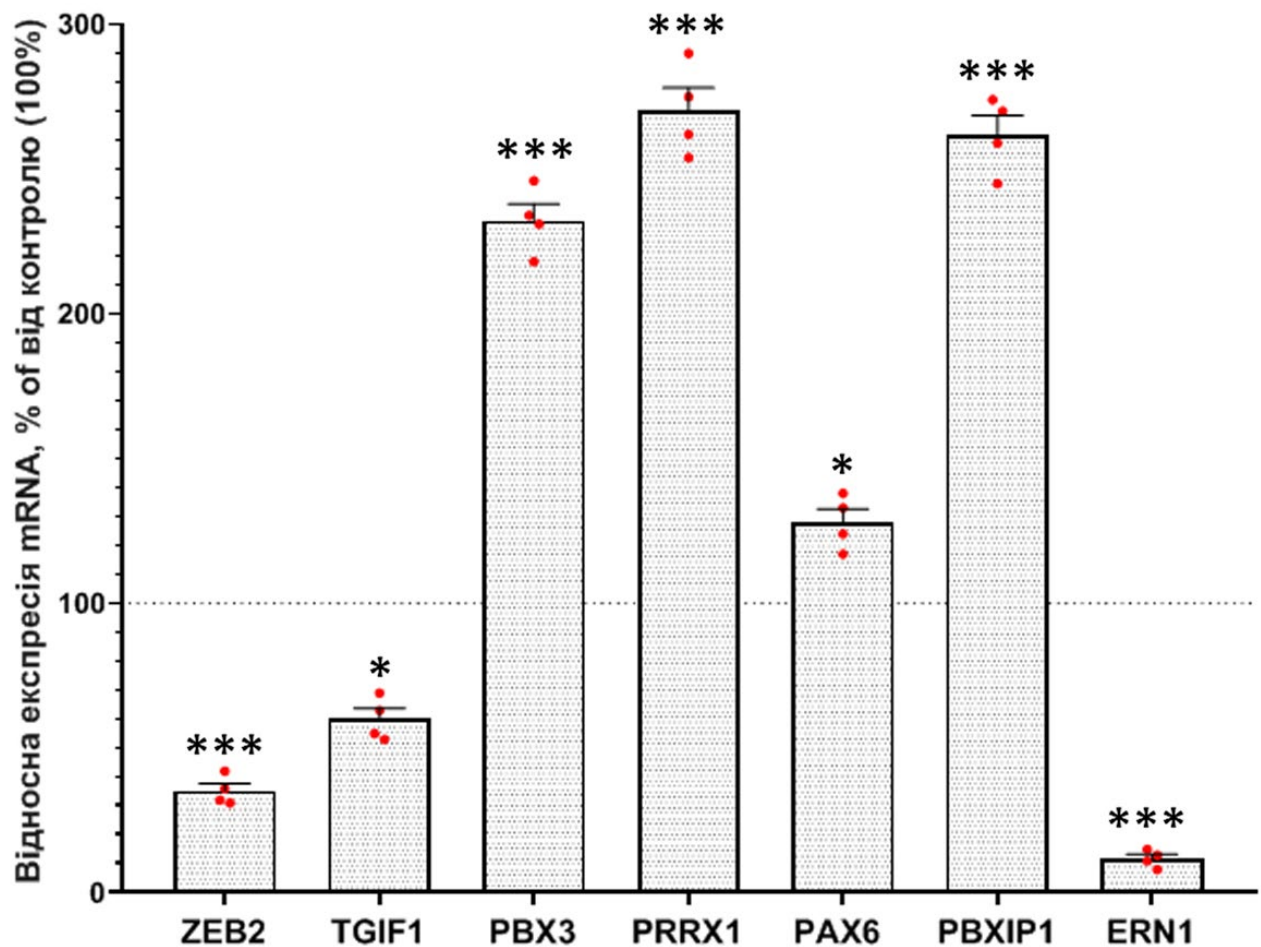


Рис 3.1.7. Відносний рівень експресії мРНК ZEB2, TGIF1, PBX3, PRRX1, PAX6, PBXIP1 та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG через 48 годин після сайленсінгу мРНК сигнального протеїну ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siRNA у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими контрольними siRNA. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$.

Для перевірки ролі ендорибонуклеази ERN1 у стрес-залежному контролі експресії генів транскрипційних факторів родини Номеобох були проведені дослідження на клітинах гліобластоми через 48 годин після сайленсінгу ХВР1,

який є головною мішенню ендорибонуклеази ERN1 у регуляції експресії генів. Результати представлені на Рис. 3.1.8.

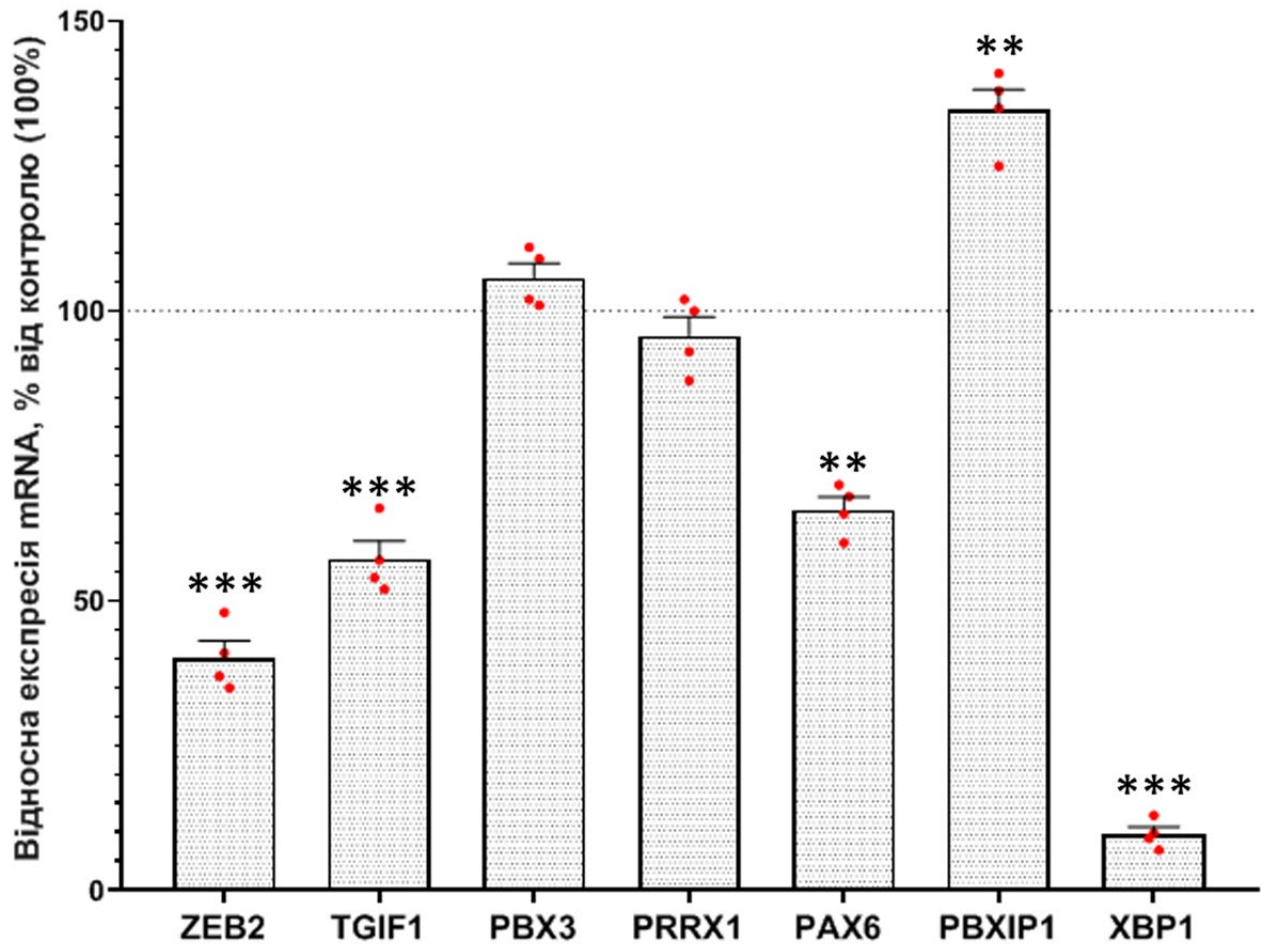


Рис 3.1.8. Відносний рівень експресії мРНК ZEB2, TGIF1, PBX3, PRRX1, PAX6, PBXIP1 та ERN1 у клітинах гліобластоми лінії U87MG через 48 годин після сайленсінгу мРНК сигнального протеїну ERN1 за допомогою специфічної до ERN1 людини siRNA у порівнянні з клітинами, трансфікованими контрольними siRNA. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; *- $p < 0,05$, ***- $p < 0,001$.

Встановлено, що рівень мРНК транскрипційного фактора XBP1 знизився на 90 відсотків через 48 годин після сайленсінгу мРНК XBP1, а рівень мРНК Номеобох факторів ZEB2, TGIF1 і PBX3 суттєво знизився (-60 %, -43 % та -34

%, відповідно), а мРНК PRRX1 підвищився на 35 % (Рис. 3.1.8). У той же час, рівень експресії мРНК PBX3 і PRRX1 у цих клітинах гліобластоми істотно не змінився. Ці дані узгоджуються з наведеними раніше результатами досліджень експресії *Homeobox* генів у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазою, що може вказувати на їх опосередкованість транскрипційним фактором XBP1s, що утворюється під дією ендорибонуклеази ERN1.

Наступним етапом досліджень було визначити рівень протеїну транскрипційного фактора ZEB2 у клітинах з пригніченням обох ензиматичних активностей ERN1 та клітинах з пригніченою лише ендорибонуклеазною активністю. Представлені на Рис. 3.1.9 результати вестерн-аналізу показали зниження рівня протеїну транскрипційного фактора ZEB2 в обох типах досліджених клітин з пригніченням ERN1 у порівнянні з контрольними клітинами.

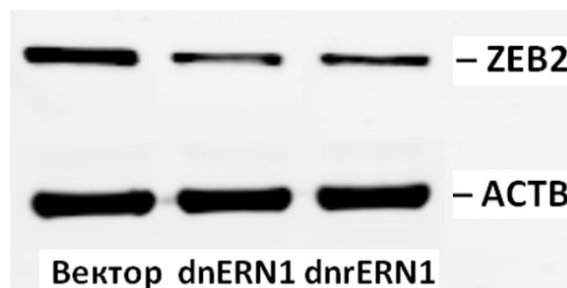


Рис. 3.1.9. Вестерн-блот аналіз рівня протеїну транскрипційного фактора ZEB2 у клітинах гліобластоми з пригніченням обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеази і протеїнкінази) сигнального протеїну ERN1 (dnERN1) або лише ендорибонуклеази ERN1 (dnrERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими порожнім вектором (вектор).

Були також проведені дослідження по впливу тунікаміцину, який індукуює стрес ендоплазматичного ретикулума, на експресію генів родини *Homeobox* у клітинах гліобластоми без ендорибонуклеази ERN1. Як видно із представлених

на Рис. 3.1.10 отриманих нами результатів, тунікаміцин знижує рівень експресії мРНК PBX3 і PRRX1, а інших досліджених генів – підвищує, але в різній мірі.

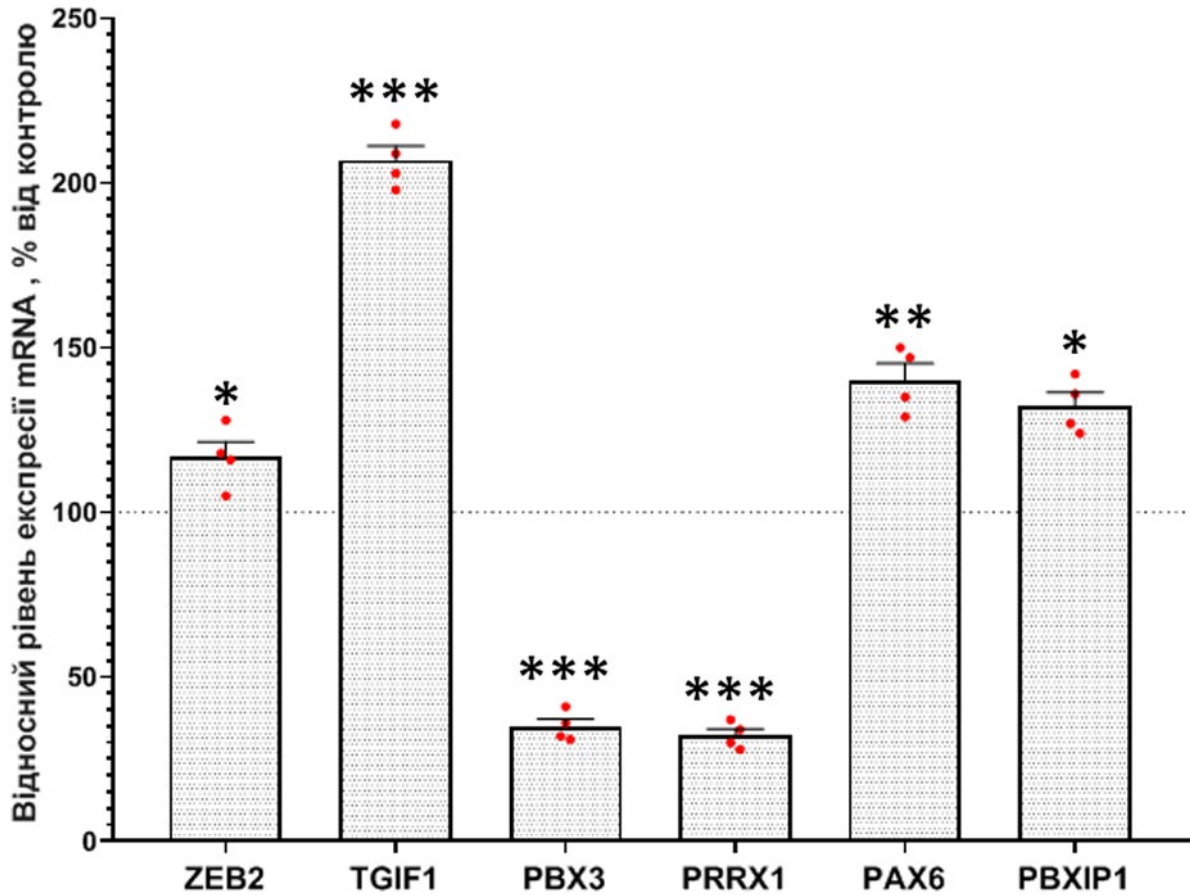


Рис 3.1.10. Вплив тунікаміцину (0,5 мкг/мл) на рівень експресії мРНК ZEB2, TGIF1, PBX3, PRRX1, PAX6 та PBXIP1 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазою ERN1 у порівнянні з контрольними клітинами без тунікаміцину. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

Отримані результати вказують на участь й інших сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума у регуляції експресії генів родини Homeobox, хоча і по-різному. Звертає на себе увагу те, що тунікаміцин знижує рівень експресії мРНК PBX3 і PRRX1, саме тих, експресія яких контролюється

протеїнкіназою ERN1 і сильно посилюється за умов пригнічення цієї протеїнкіназної активності разом з ендорибонуклеазною, але інгібування однієї ендорибонуклеазної активності змін в експресії мРНК PBX3 і PRRX1 не було виявлено.

3.2. Вплив гіпоксії на експресію генів родини Homeobox у клітинах гліобластоми з пригніченим IRE1

У зв'язку з тим, що гіпоксія є важливим фактором розвитку і росту злоякісних пухлин, ми провели дослідження по вивченню впливу диметилноксалілгліцину, який імітує ефекти гіпоксії пригнічуючи активність пролілгидроксилази альфа-субодиниці HIF, на рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими обома активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною, dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 – для контрольних клітин з вектором та контроль 2 – для клітин з dnERN1) без гіпоксії.

Із даних, приведених на Рис. 3.2.1, видно, що ген транскрипційного фактора ZEB2 є досить чутливим до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми, оскільки рівень експресії цього гена за гіпоксії збільшується на 154 %. Разом з тим, у клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 ефект гіпоксії на експресію транскрипційного фактора ZEB2 зовсім не виявлявся.

У той же час, експресія транскрипційного фактора TGIF1 є резистентною до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми, але посилюється у клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 (+51 %; Рис. 3.2.2).

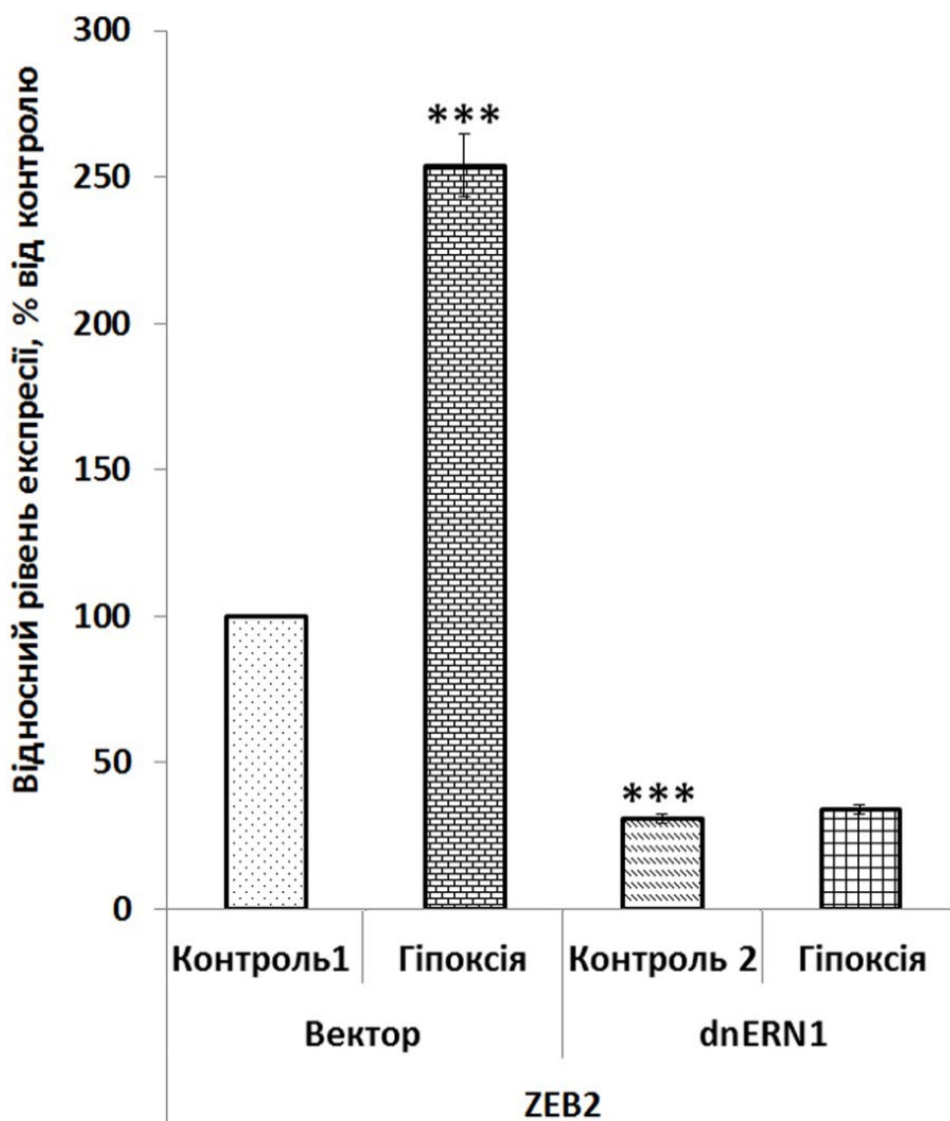


Рис 3.2.1. Вплив гіпоксії (0,5 мМ диметилноксалілгліцину, 4 години) на рівень експресії мРНК ZEB2 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК ZEB2 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

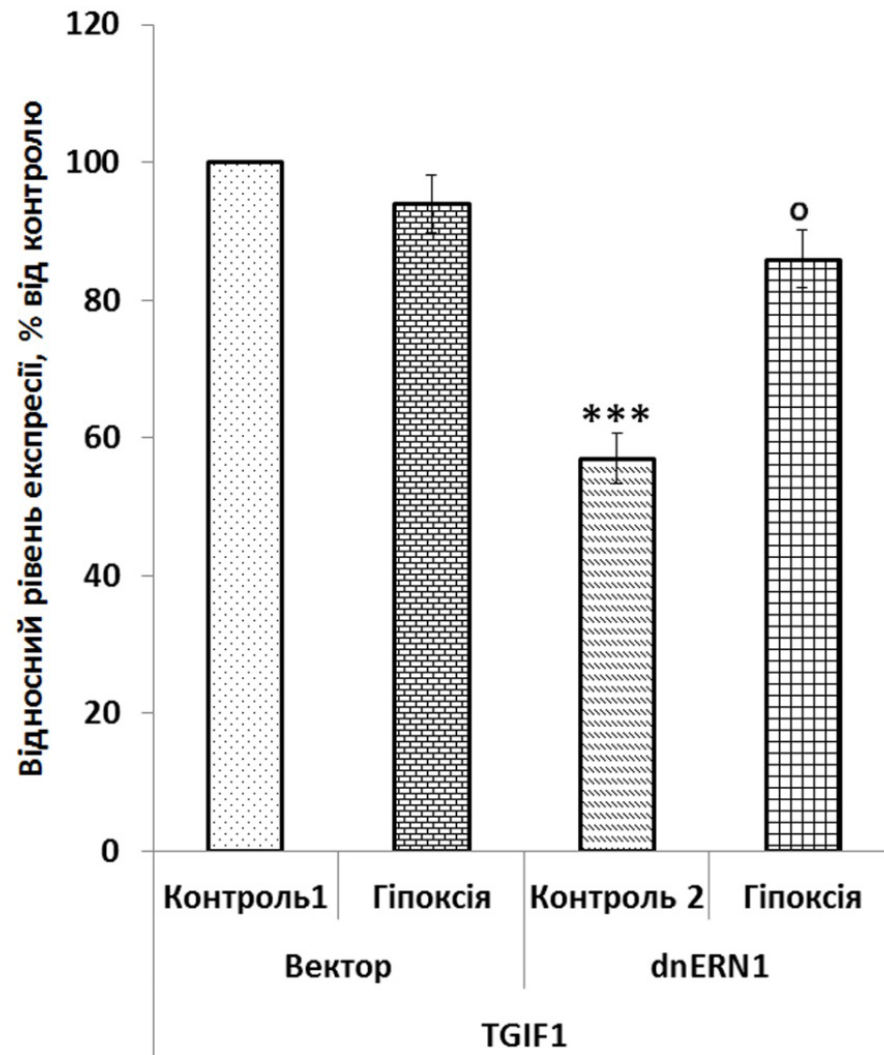


Рис 3.2.2. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК TGIF1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК TGIF1 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, °- $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Приведені на Рис. 3.2.3 дані свідчать про те, що ген транскрипційного фактора PBX3 є резистентним до гіпоксії у контрольних клітинах гліобластоми

у порівнянні з контролем 1, але рівень його експресії знижується на 14 відсотків у порівнянні з контролем 2 у клітинах з пригніченим ERN1.

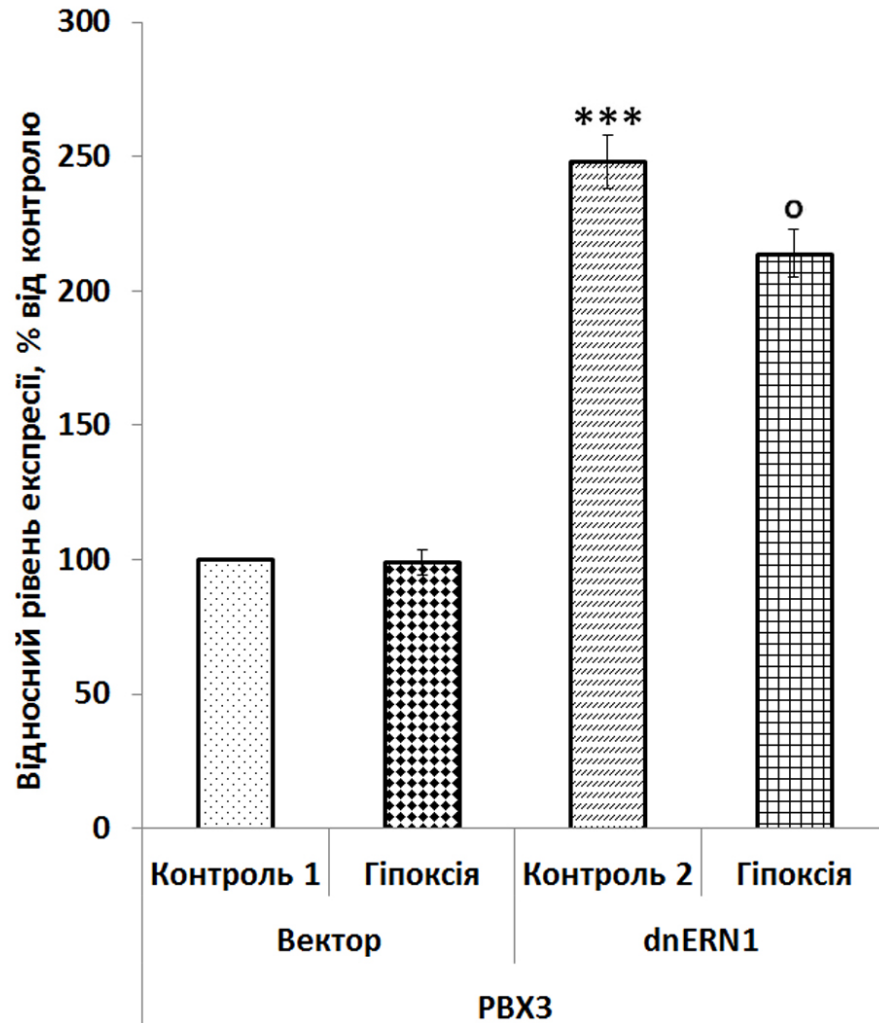


Рис 3.2.3. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PBX3 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, °- $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

У той же час, рівень експресії транскрипційних факторів PAX6 та PRRX1 знижується за умов гіпоксії як у контрольних клітинах гліобластоми відповідно

на 35 і 30 відсотків порівняно з контролем 1, так і у клітинах з пригніченим ERN1 (-25 % та -51 %, відповідно; Рис. 3.2.4 і 3.2.5).

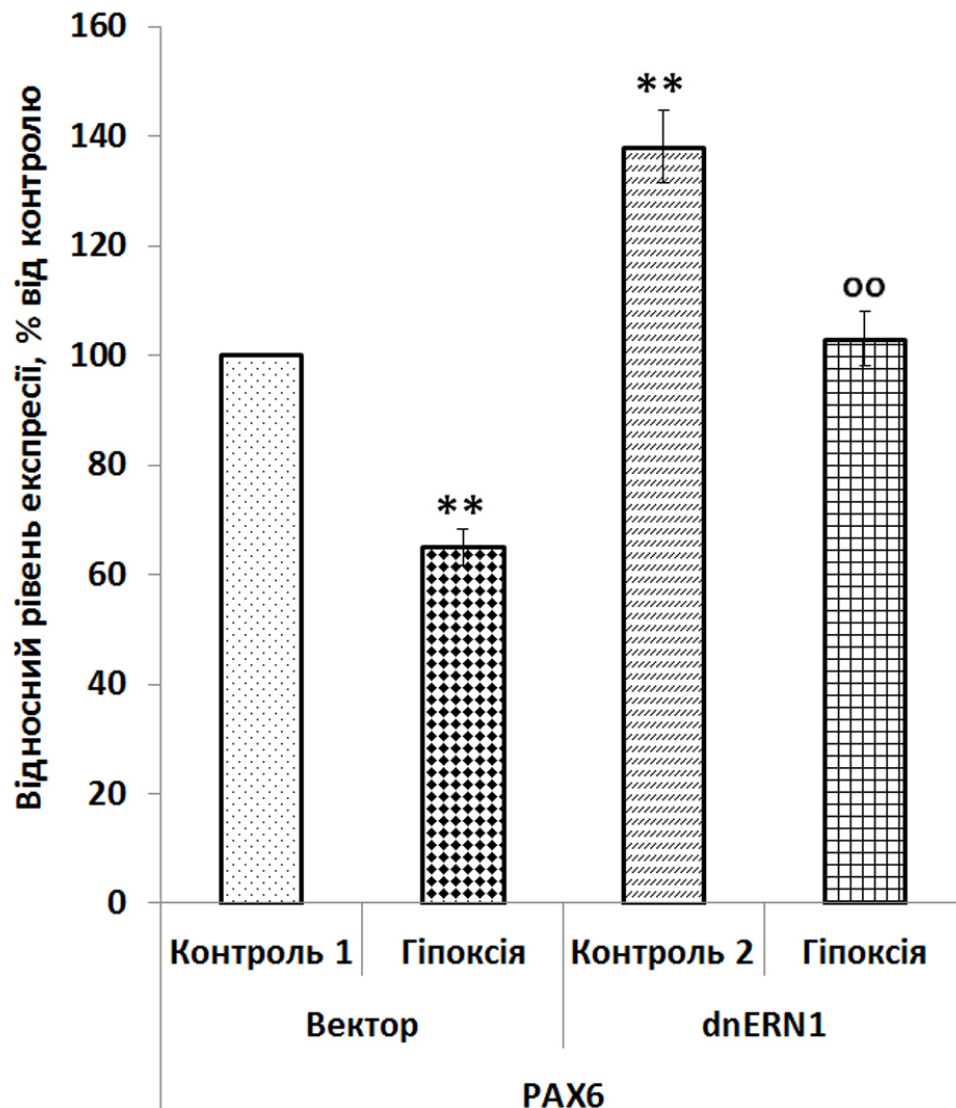


Рис 3.2.4. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PAX6 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК PAX6 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ** - $p < 0,01$ порівняно з контролем 1, а oo - $p < 0,01$ порівняно з контролем 2.

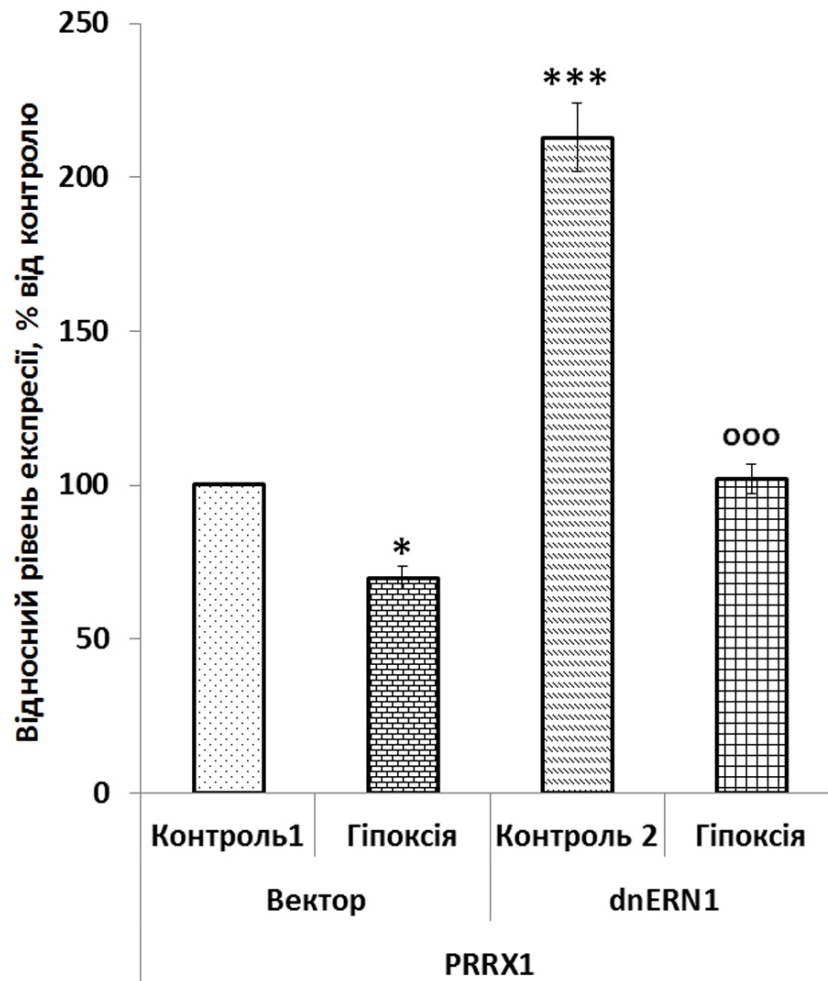


Рис 3.2.5. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PRRX1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ і ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, а ^{ooo}- $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Таким чином, отримані дані вказують на пригнічуючий ефект гіпоксії на рівень експресії генів транскрипційних факторів PAX6 та PRRX1 як у контрольних клітинах гліобластоми, так і за пригнічення ERN1, але інгібування цього сигнального протеїну послаблює ефект гіпоксії на експресію PAX6 та посилює чутливість до гіпоксії фактора PRRX1.

Наступним етапом було дослідження впливу гіпоксії на експресію генів транскрипційних факторів PBXIP1 та NKX3-1 у клітинах гліобластоми і залежності гіпоксичної регуляції цих генів від протеїну ERN1. Показано, що гіпоксія істотно не змінює рівень експресії PBXIP1 у контрольних клітинах гліобластоми, але різко пригнічує експресію NKX3-1 (-48 %) у порівнянні з контролем 1 (Рис. 3.2.6 та 3.2.7).

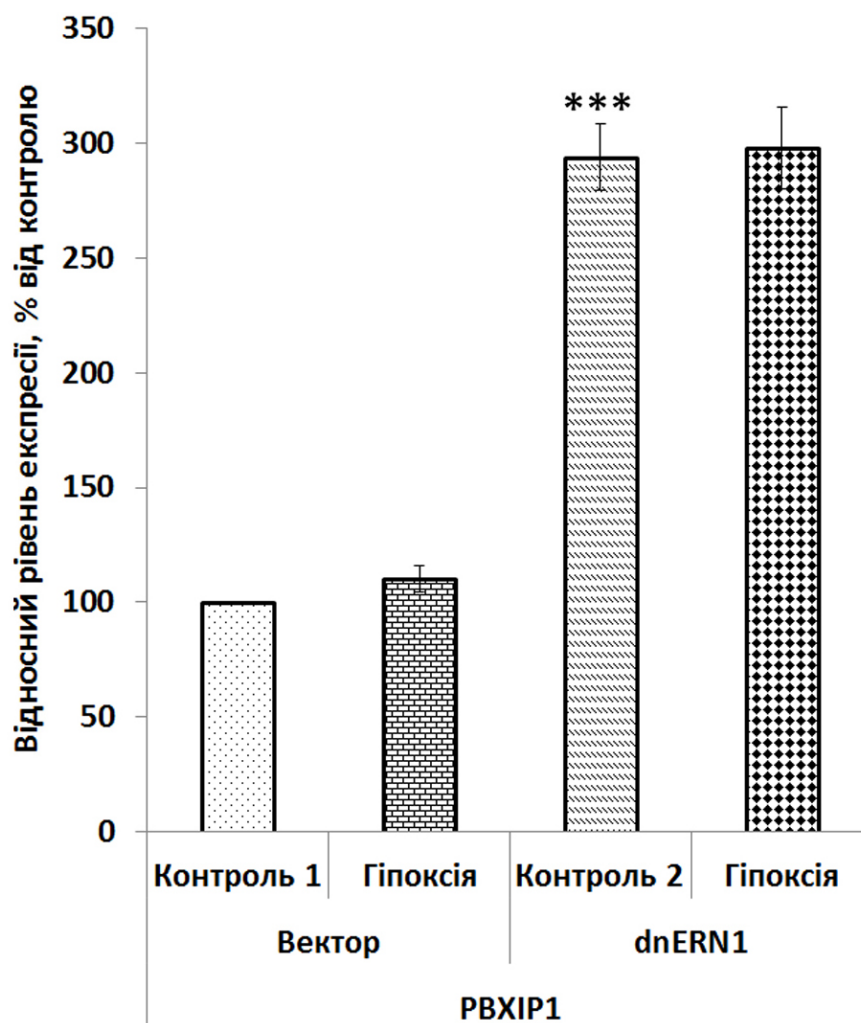


Рис 3.2.6. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК PBXIP1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1.

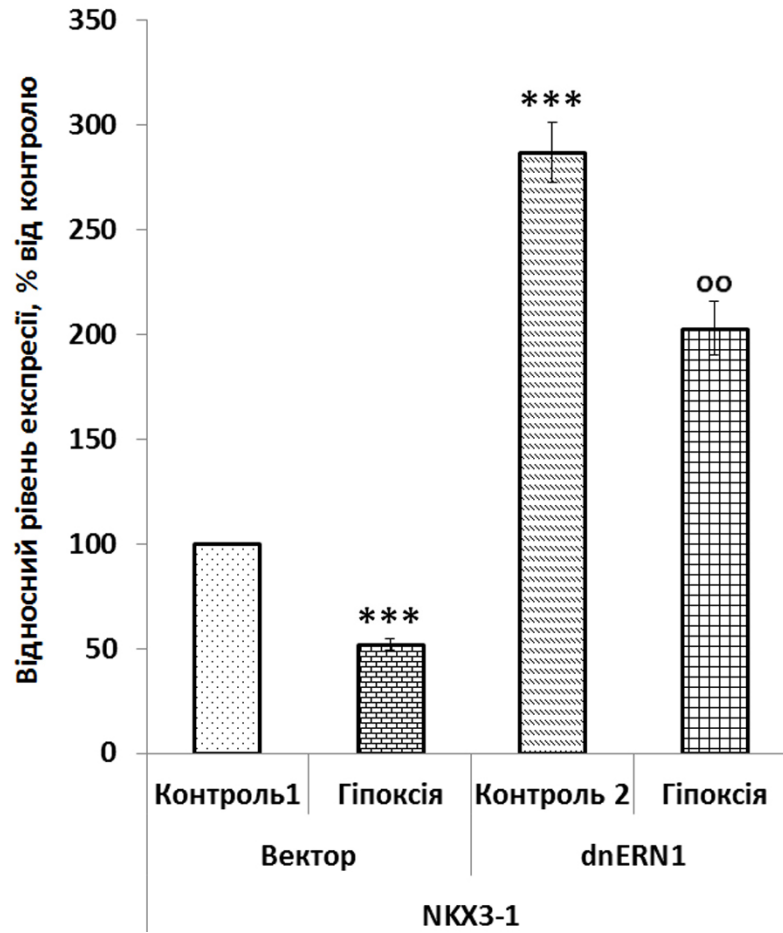


Рис 3.2.7. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК NKX3-1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК NKX3-1 були нормалізовані по рівню експресії АКТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, а °°- $p < 0,01$ порівняно з контролем 2.

Більше того, дослідження впливу гіпоксії на рівень експресії генів транскрипційних факторів PBXIP1 та NKX3-1 у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 показали, що чутливість експресії гена *PBXIP1* до гіпоксії істотно не залежить від сигнального протеїну ERN1, а гена *NKX3-1* – знижується (Рис. 3.2.6 і 3.2.7).

Досить чутливим до дії гіпоксії виявився ген *SPAG4*. Рівень його експресії під впливом гіпоксії підвищувався на 487 % у контрольних клітинах гліобластоми, а у клітинах з пригніченим ERN1 – лише на 88 % (Рис. 3.2.8). Ці результати чітко вказують на залежність гіпоксичної регуляції гена *SPAG4* від сигнального протеїну ERN1.

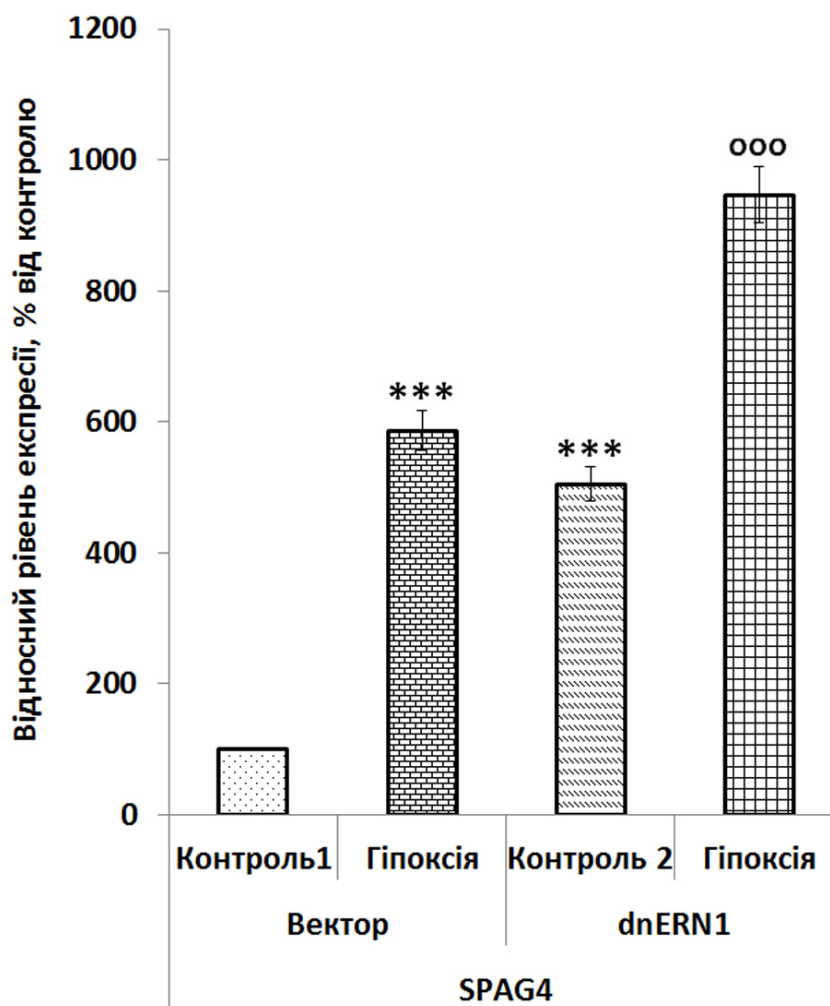


Рис 3.2.8. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК *SPAG4* у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК *SPAG4* були нормалізовані по рівню експресії АКТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, а ^{ooo}- $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Наступним етапом було дослідження впливу гіпоксії на рівень експресії генів транскрипційних факторів LHX1, LHX2 та LHX6 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 для в'яснення їх чутливості до гіпоксії в залежності від пригнічення ERN1. Результати цих досліджень приведені на Рис. 3.2.9, 3.2.10 і 3.2.11).

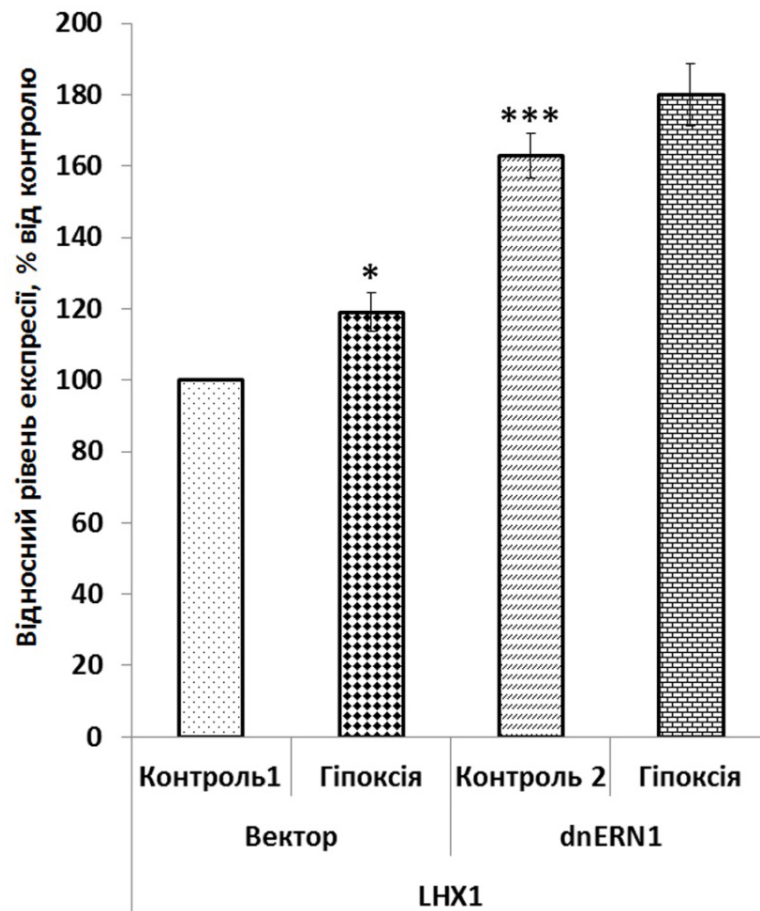


Рис 3.2.9. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК LHX1 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК LHX1 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1.

Як видно із даних, приведених на Рис. 3.2.9, рівень експресії гена транскрипційного фактора LHX1 під впливом гіпоксії збільшувався на 19 % у контрольних клітинах гліобластоми у порівнянні з контролем 1, але у клітинах без обох ензиматичних активностей ERN1 цей ген втрачав чутливість до гіпоксії.

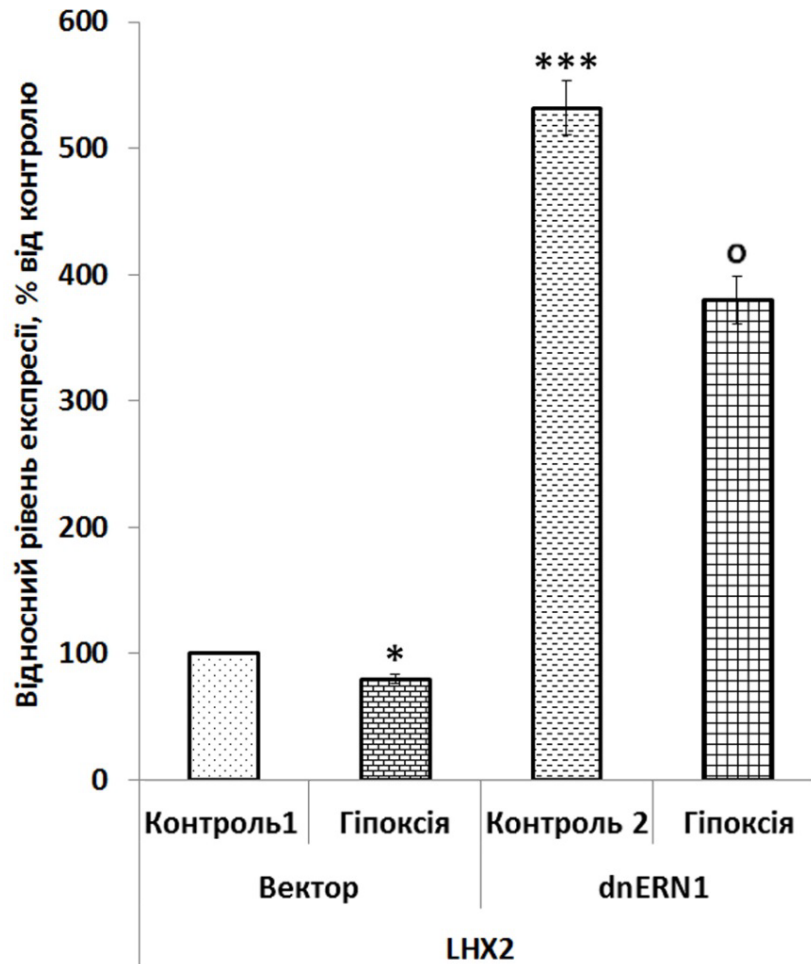


Рис 3.2.10. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК LHX2 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $M \pm m$; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, а °- $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

Дещо інші зміни були виявлені при дослідженні гіпоксичної регуляції експресії гена фактора LHX2. Зниження його рівня експресії було виявлено як у контрольних клітинах гліобластоми, так і в клітинах з пригніченим ERN1: - 20 % та -29 % у порівнянні з контролем 1 і 2, відповідно (Рис 3.2.10).

Подібні, але більш виражені зміни були виявлені при вивченні впливу гіпоксії на рівень експресії гена транскрипційного фактора LHX6. Зниження його рівня експресії було також виявлено як у контрольних клітинах гліобластоми, так і в клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1: -49 % та -57 % у порівнянні з контролем 1 і 2, відповідно (Рис 3.2.11).

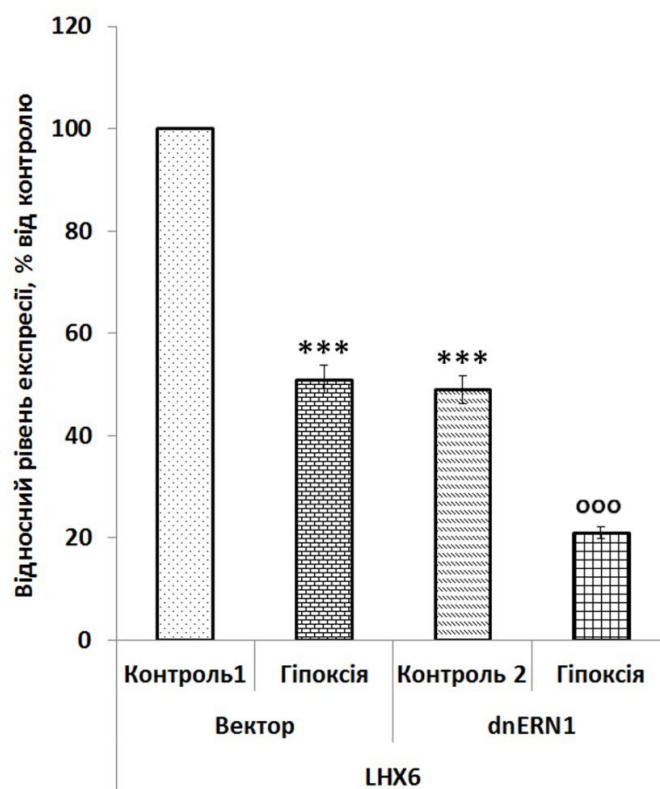


Рис 3.2.11. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК LHX6 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контролями без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК LHX6 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, ^{ooo}- $p < 0,001$ порівняно з контролем 2.

Важливу роль в регуляції експресії генів в нормі і за пухлинного росту відіграють транскрипційні фактори групи MEIS: MEIS1, MEIS2 та MEIS3. Результати дослідження їх чутливості до гіпоксії в залежності від пригнічення сигнального протеїну ERN1 представлені на Рис. 3.2.12, 3.2.13 і 3.2.14). Встановлено, що гіпоксія збільшує рівень експресії гена MEIS1 на 23 %, але лише у контрольних клітинах гліобластоми, а пригнічення ERN1 робить ці клітини резистентними до гіпоксії (Рис. 3.2.12).

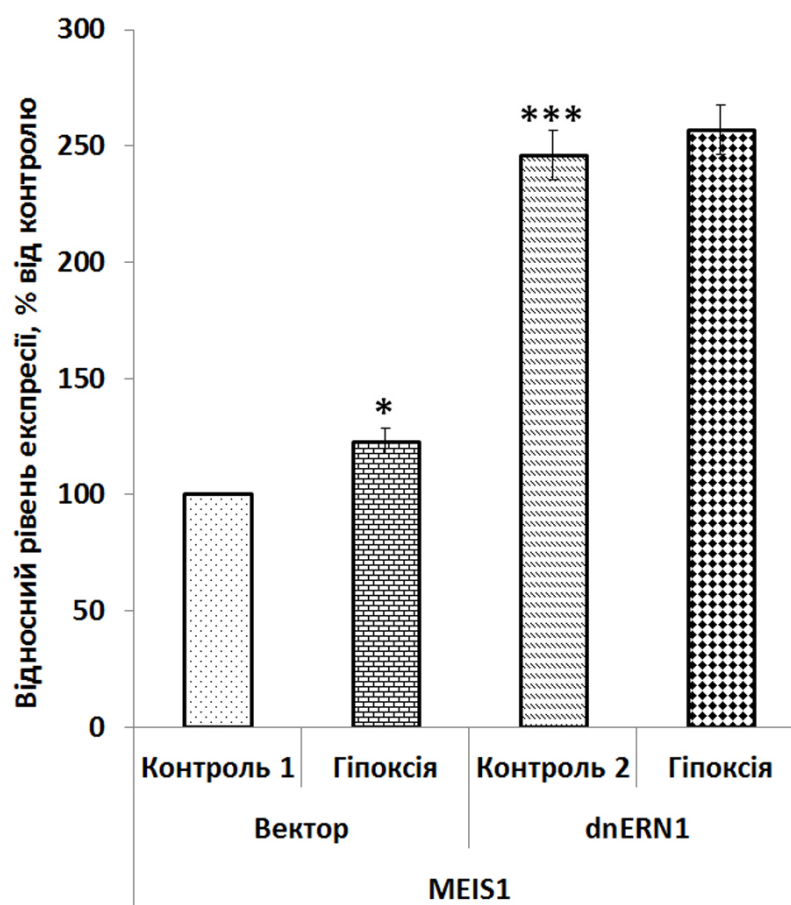


Рис 3.2.12. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК MEIS1 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERF1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК MEIS1 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; * - $p < 0,05$ і *** - $p < 0,001$ порівняно з контролем 1.

У той же час, гіпоксія негативно регулює експресію гена MEIS2 як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах з пригніченим ERN1, але більш виражено (-30 %), тоді як ген транскрипційного фактора MEIS3 є більш чутливим до гіпоксії і рівень його експресії збільшується за умов гіпоксії аж на 66 % у контрольних клітинах гліобластоми і в дещо меншій мірі у клітинах з пригніченим ERN1 (+51 %) (Рис. 3.2.13 та 3.2.14).

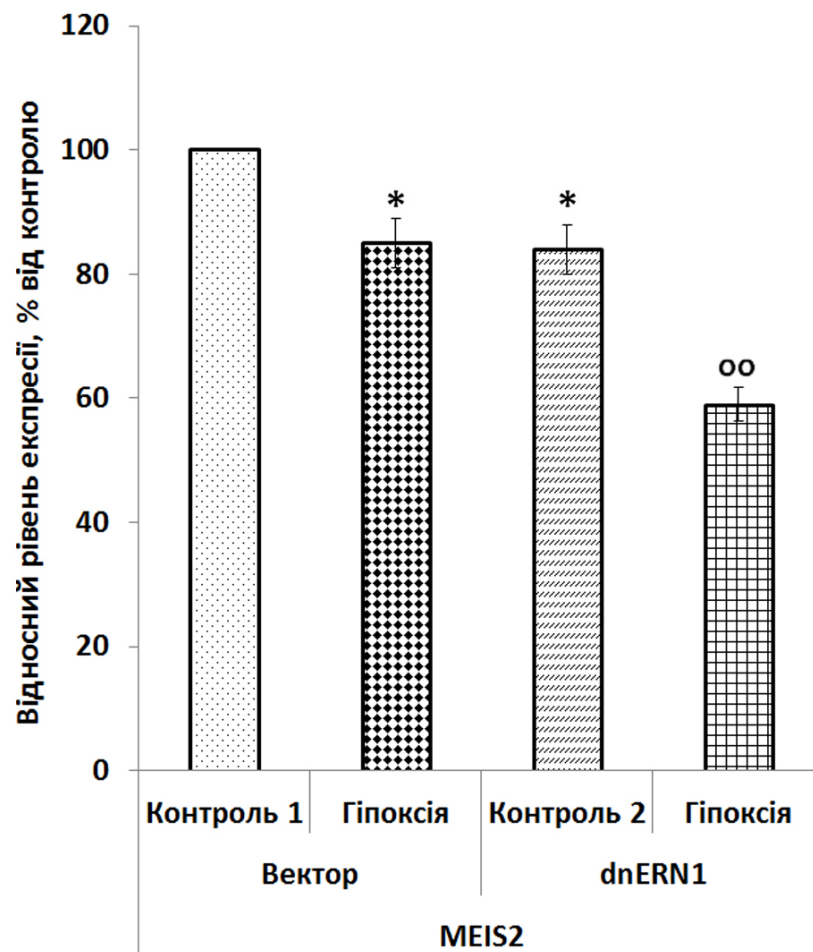


Рис 3.2.13. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК MEIS2 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії мРНК MEIS2 були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ порівняно з контролем 1, ^{oo}- $p < 0,01$ порівняно з контролем 2.

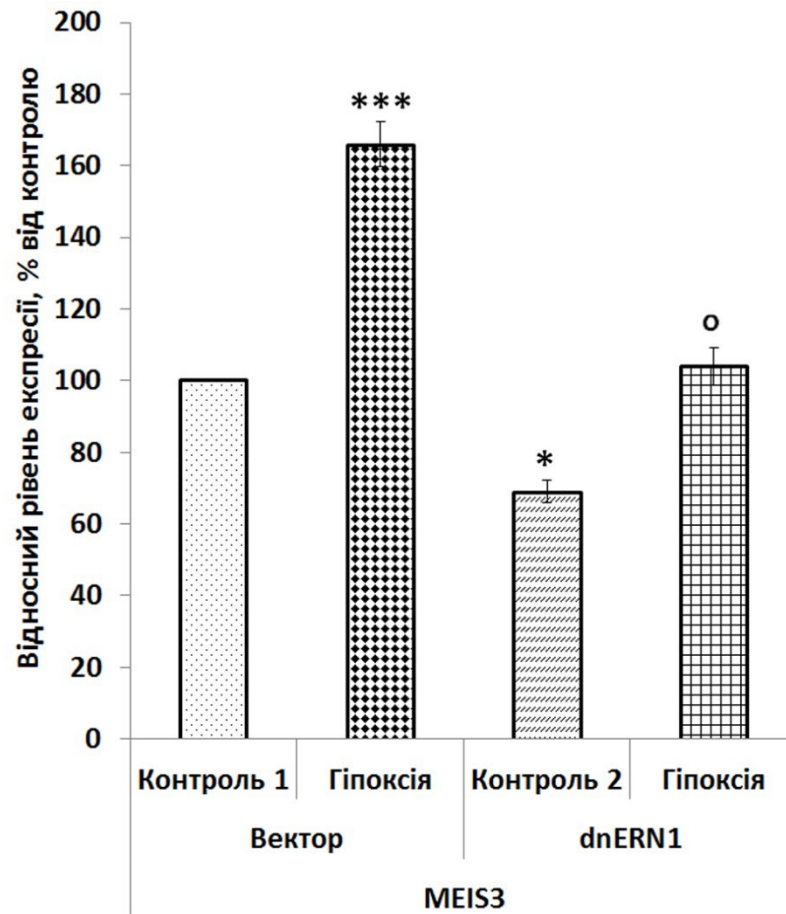


Рис 3.2.14. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК MEIS3 у контрольних клітинах гліобластоми, трансфікованих вектором pcDNA3.1 без вставки, та клітинах з пригніченими ендорибонуклеазною і протеїнкіназною активностями ERN1 (dnERN1) у порівнянні з відповідними контрольними клітинами (контроль 1 та контроль 2) без гіпоксії. Отримані значення рівня експресії цієї мРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю 1 чи 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ і ***- $p < 0,001$ порівняно з контролем 1, °- $p < 0,05$ порівняно з контролем 2.

У зв'язку з тим, що гіпоксія викликала різні за величиною і напрямком зміни в експресії досліджених генів транскрипційних факторів родини Nucleobox, ми визначили рівень протеїну альфа субодиниці транскрипційного фактора HIF вестерн-блот аналізом лізатів контрольних клітин гліобластоми і клітин з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1, вирощених за звичайних, нормоксичних умов та за гіпоксії. Встановлено, що гіпоксія різко

збільшує рівень протеїну альфа субодиниці транскрипційного фактора HIF як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (Рис. 3.2.15). Більше того, пригнічення обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеази і протеїнкінази) сигнального протеїну ERN1 знижує рівень протеїну HIF1A у клітинах гліобластоми, що добре узгоджується з даними про зниження проліферативного потенціалу цих клітин.

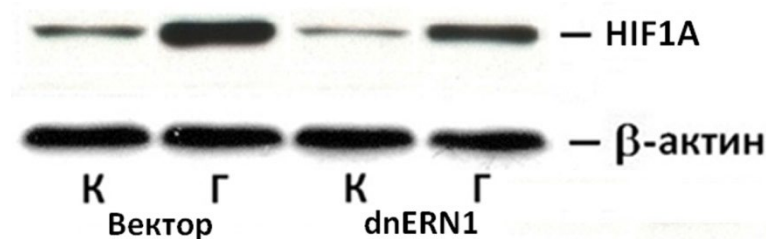


Рис. 3.2.15. Вестерн-блот аналіз протеїну альфа субодиниці транскрипційного фактора HIF у клітинах гліобластоми пригніченням обох ензиматичних активностей (ендорибонуклеази і протеїнкінази) сигнального протеїну ERN1 з (dnERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, трансфікованими порожнім вектором (вектор) за умов гіпоксії (Г; 4 години) у порівнянні з контролем (К; нормоксія).

Таким чином, переважна більшість досліджених генів транскрипційних факторів родини Nucleobox є чутливими до гіпоксії, причому рівень експресії лише частини із них збільшується, а решти генів – знижується і величина змін коливається в значних межах. Найбільше збільшення рівня експресії показано для гена *SPAG4* під впливом гіпоксії, але після пригнічення ERN1 ефект гіпоксії різко знижується, що переконливо свідчить про роль сигнального протеїну ERN1 у гіпоксичній регуляції експресії цього гена.

3.3. Експресія генів родини Homeobox у клітинах гліобластоми за умов дефіциту глютаміну та глюкози в залежності від сигнального протеїну IRE1

Важливими для росту злоякісних пухлин і особливо гліобластом є забезпечення їх глютаміном та глюкозою, а дефіцит цих поживних речовин має анти-пухлинну дію. У зв'язку з цим, були проведені дослідження залежності експресії низки Homeobox генів від дефіциту глюкози у середовищі у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 для виявлення можливої участі стресу ендоплазматичного ретикулула за цих експериментальних умов (Рис. 3.3.6 – 3.3.14).

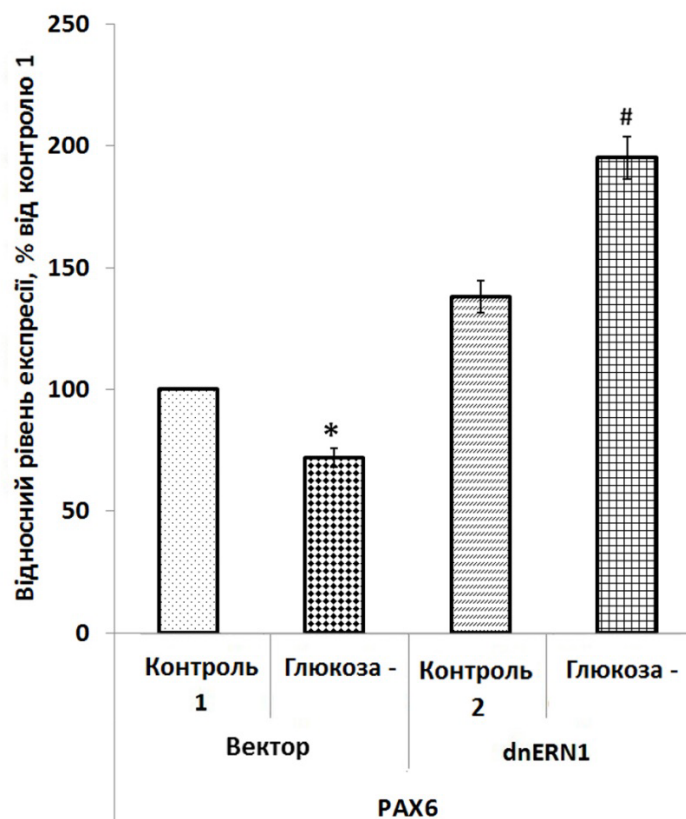


Рис. 3.3.1. Вплив дефіциту глюкози (глюкоза -) на рівень експресії мРНК PAX6 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень експресії гена транскрипційного фактора PAX6 знижується у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глюкози у середовищі (-22 %), а за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1/IRE1, навпаки, підвищується на 41 % (Рис. 3.3.1).

На Рис. 3.3.2 приведені результати дослідження рівня експресії гена транскрипційного фактора PBX3, із яких видно, що експресія цього гена є резистентною до дефіциту глюкози у середовищі у контрольних клітинах гліобластоми, а за умов пригнічення сигнального протеїну ERN1 знижується на 18 %.

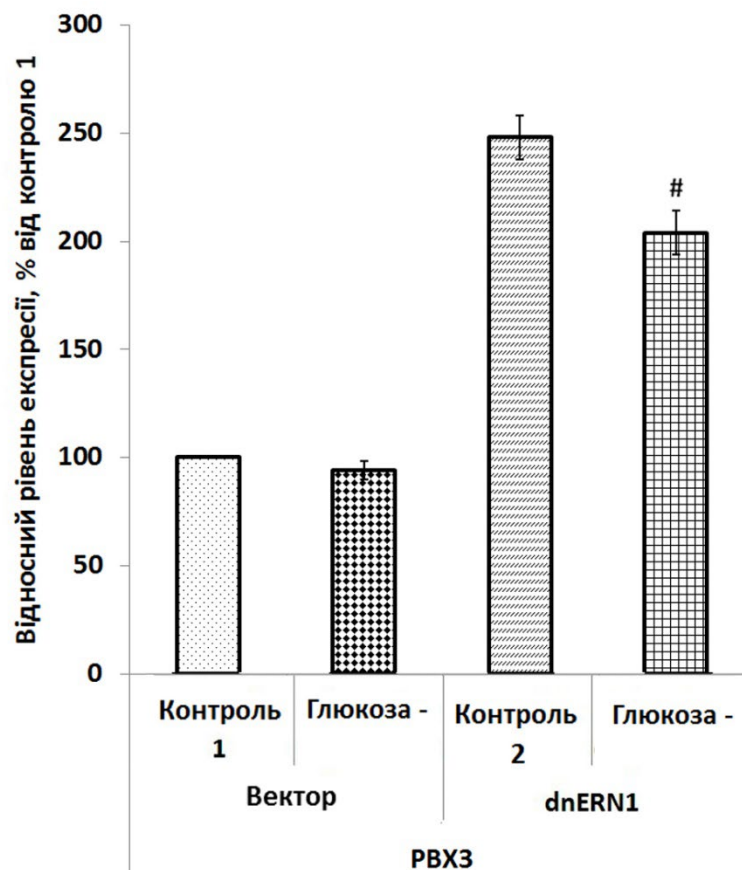


Рис. 3.3.2. Вплив дефіциту глюкози (глюкоза -) на рівень експресії мРНК PBX3 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnER1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Були також проведені дослідження рівня експресії гена транскрипційного фактора *PBXIP1*, які показали, що експресія цього гена також є резистентною до дефіциту глюкози у середовищі, але лише у контрольних клітинах гліобластоми, тоді як у клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями сигнального протеїну ERN1 знижується на 41 % (Рис. 3.3.3).

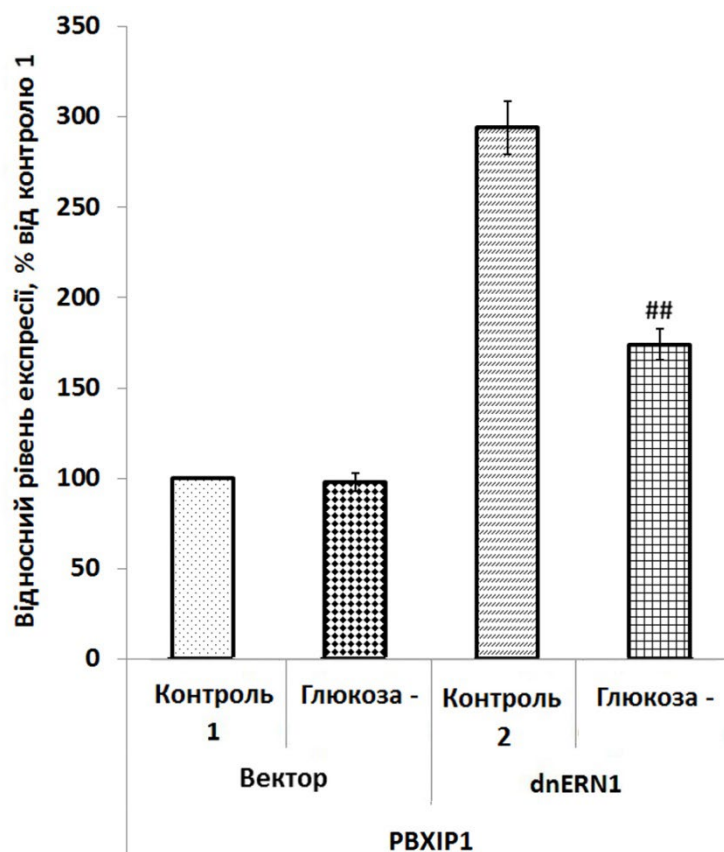


Рис. 3.3.3. Вплив дефіциту глюкози (глюкоза -) на рівень експресії мРНК *PBXIP1* у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; ##- $p < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

Ці дані показують, що гени транскрипційних факторів *PBXIP1* та *PBX3* мають резистентність до дефіциту глюкози у середовищі у контрольних клітинах гліобластоми, але пригнічення ERN1 індукує чутливість до цих експериментальних умов і приводить зниження рівня їх експресії, але більш вираженого для гена *PBXIP1*.

Наступним етапом цього дослідження було вивчення рівня експресії генів транскрипційних факторів групи MEIS: MEIS1 та MEIS2. Як видно із даних, представлених на Рис. 3.3.4, рівень експресії гена транскрипційного фактора MEIS1 знижується за умов дефіциту глюкози у середовищі як у контрольних клітинах гліобластоми (-18 %), так і у клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (-41 %), але пригнічення ERN1 посилює ефект залежності експресії цього гена від дефіциту глюкози.

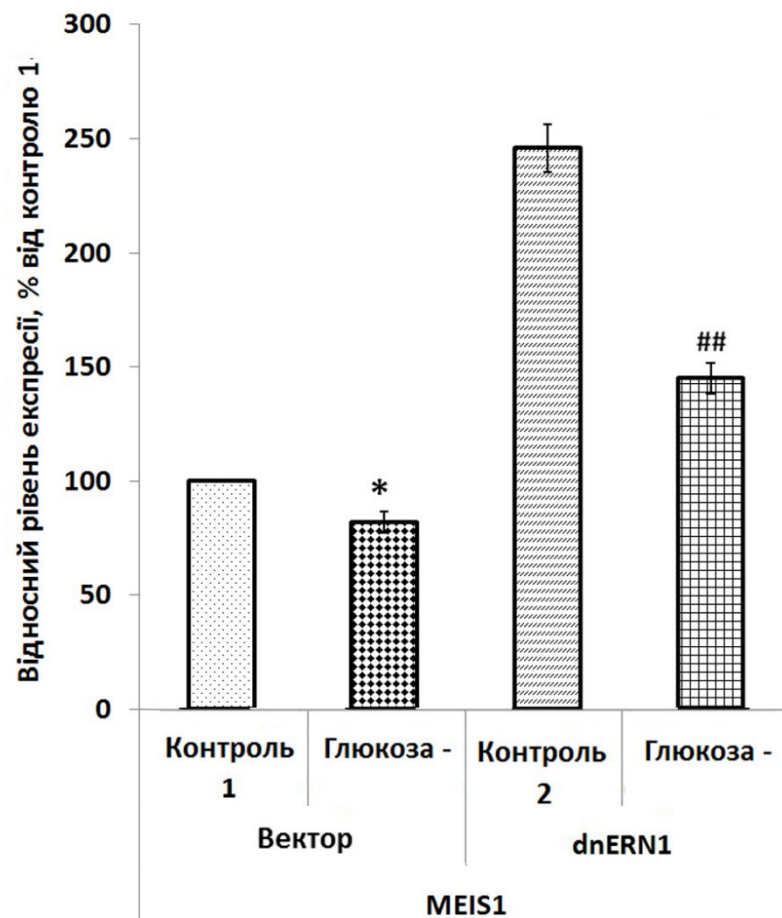


Рис. 3.3.4. Вплив дефіциту глюкози (глюкоза -) на рівень експресії мРНК MEIS1 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ##- $p < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

Подібні за величиною і напрямком зміни були виявлені і при дослідженні рівня експресії гена транскрипційного фактора MEIS2 за умов дефіциту глюкози

у середовищі (Рис. 3.3.5). Так, у контрольних клітинах гліобластоми рівень експресії цього гена транскрипційних факторів родини Номеобох знижується на 14 %, але пригнічення сигнального протеїну ERN1 різко посилює ефект залежності експресії гена *MEIS2* від дефіциту глюкози (-52 %) (Рис. 3.3.5).

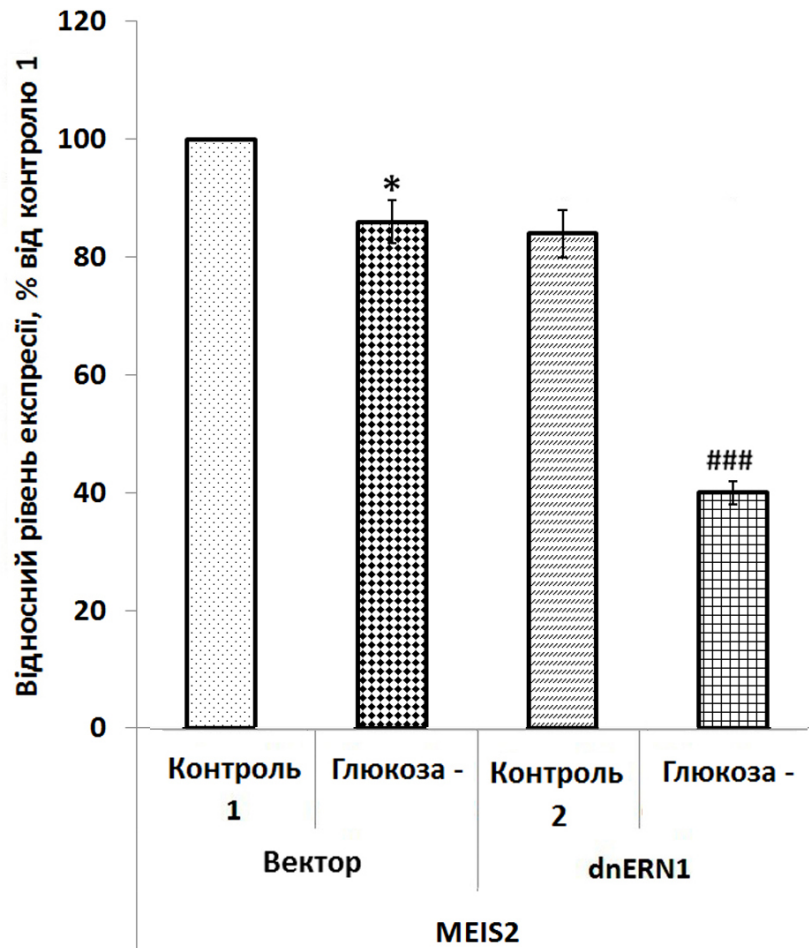


Рис. 3.3.5. Вплив дефіциту глюкози (глюкоза -) на рівень експресії мРНК *MEIS2* у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ###- $p < 0,001$ у порівнянні з контролем 2.

Були також проведені дослідження по вивченню залежності експресії низки генів транскрипційних факторів родини Номеобох від дефіциту глутаміну у середовищі в контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим

сигнальним протеїном ERN1/IRE1 (Рис. 3.3.6) з метою вияснити чи впливає пригнічення ERN1 на чутливість цих генів до дефіциту глутаміну у середовищі.

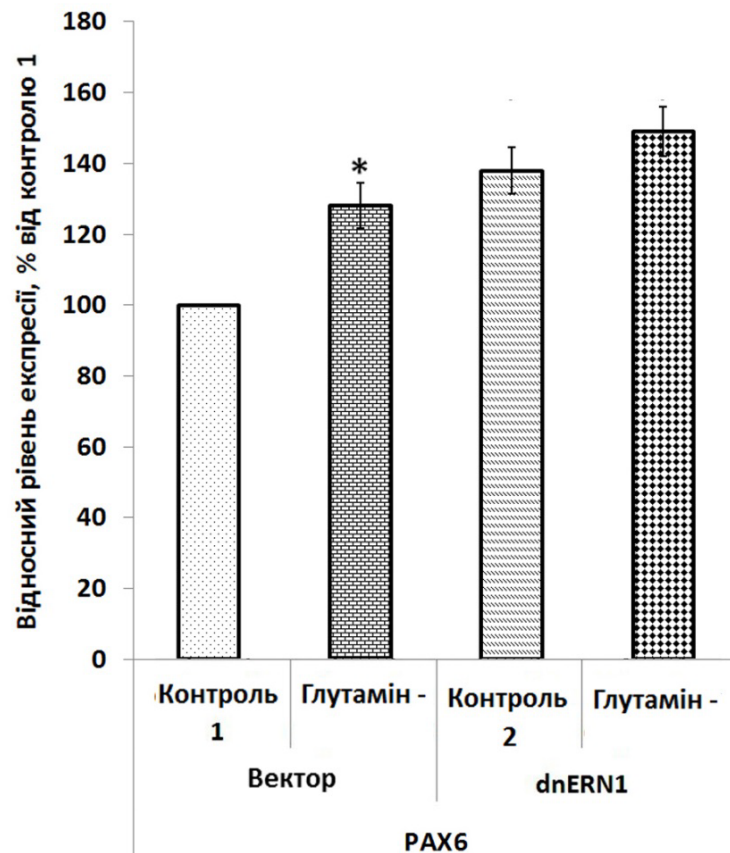


Рис. 3.3.6. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК PAX6 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Встановлено, що рівень експресії мРНК PAX6 збільшується на 28 % у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну і що пригнічення ERN1 робить експресію цієї мРНК резистентною до дефіциту глутаміну (Рис. 3.3.6).

У той же час, рівень експресії гена транскрипційного фактора PBX3 змінювався за цих експериментальних умов по-іншому: у контрольних клітинах гліобластоми за умов дефіциту глутаміну у середовищі знижувався на 23 % і ще

в більшій мірі знижувався (-42 %) у клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (Рис. 3.3.7).

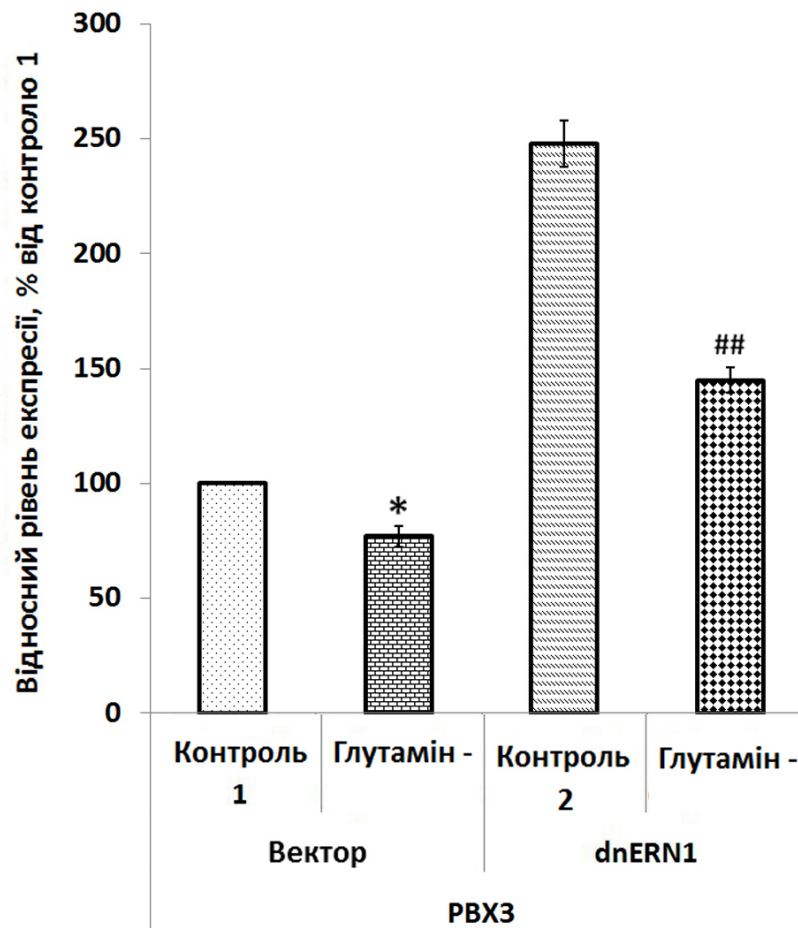


Рис. 3.3.7. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК PBX3 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; ##- $p < 0,01$ у порівнянні з контролем 2.

На наступному етапі було проведено дослідження рівня експресії мРНК транскрипційного фактора PBXIP1 у контрольних клітинах гліобластоми та клітинах з пригніченим ERN1 за умов дефіциту глутаміну. Встановлено, що у контрольних клітинах гліобластоми рівень експресії цієї мРНК збільшувався на

35 %, а клітини гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 були резистентними до дефіциту глутаміну (Рис. 3.3.8).

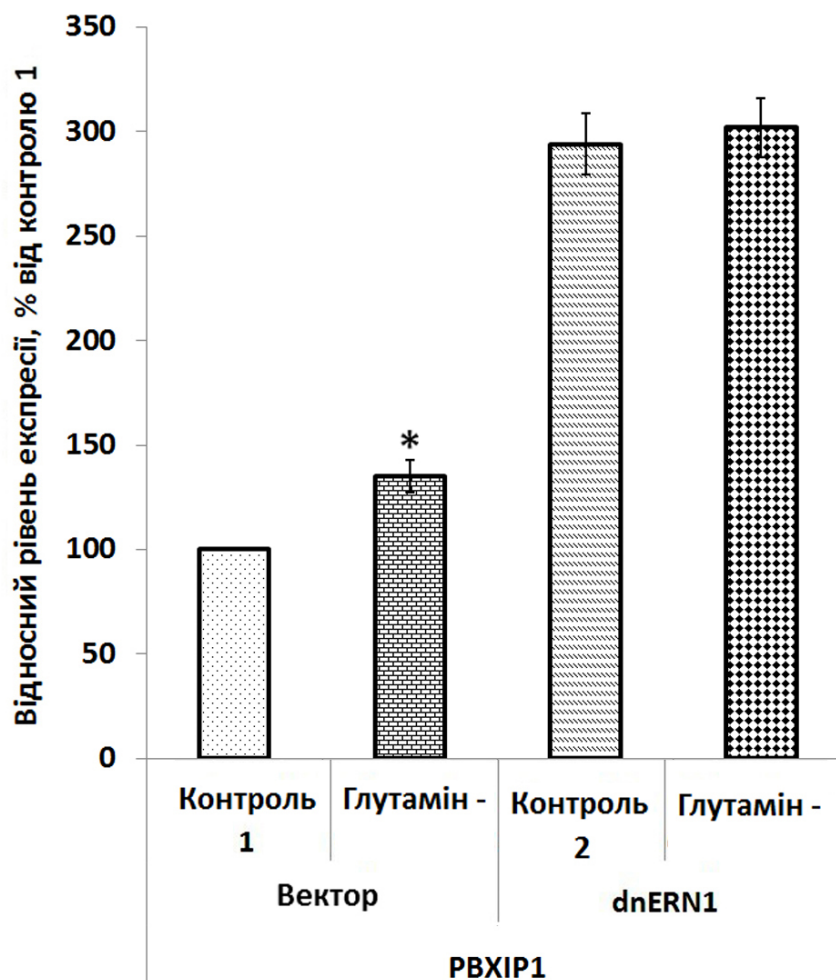


Рис. 3.3.8. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК PBXIP1 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1.

Із даних, представлених на Рис. 3.3.9, 3.3.10 та 3.3.11, видно, що гени транскрипційних факторів групи MEIS по різному реагують на дефіцит глутаміну у середовищі. Так, було встановлено, що у контрольних клітинах гліобластоми експресія мРНК транскрипційного фактора MEIS1 була резистентною до дефіциту глутаміну, а у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 збільшувалася на 18 % (Рис. 3.3.9).

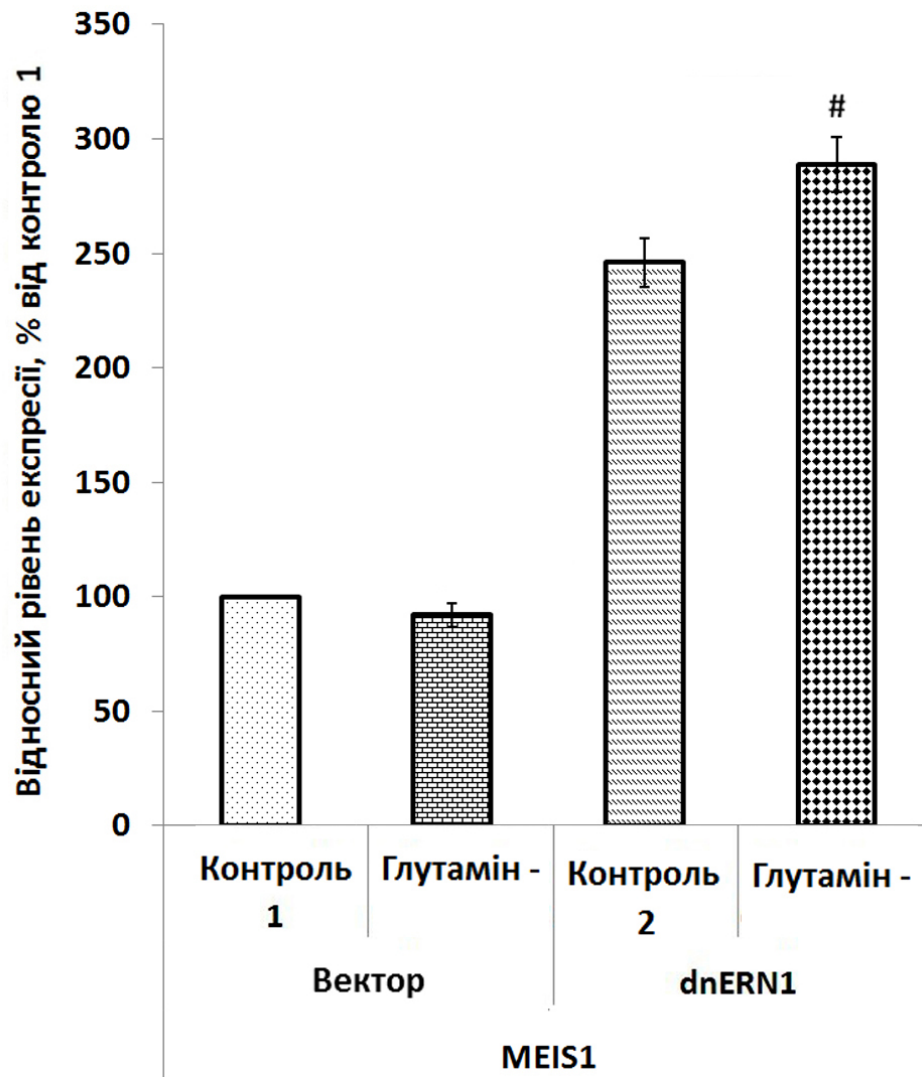


Рис. 3.3.9. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК MEIS1 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

У той же час, експресія мРНК транскрипційного фактора MEIS2 була досить чутливою до дефіциту глутаміну як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 (Рис. 3.3.10). Так, рівень експресії цієї мРНК знижувався на 52 % у контрольних клітинах гліобластоми і на 50 % у клітинах гліобластоми з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (Рис. 3.3.10).

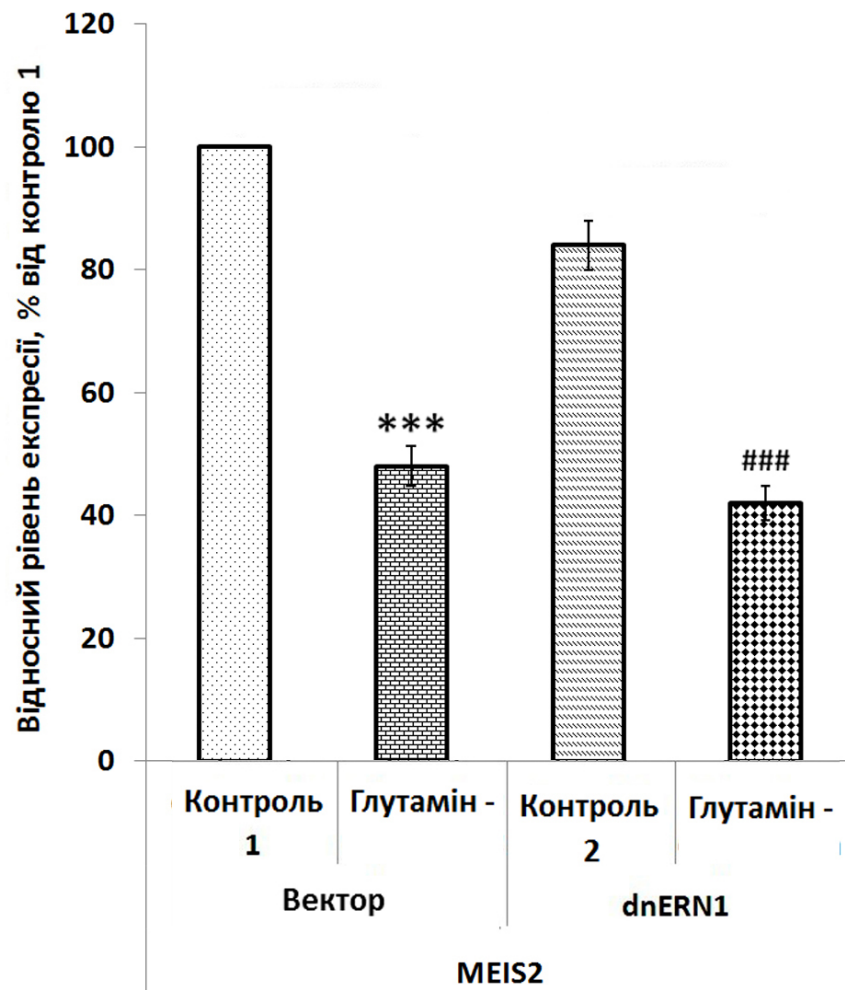


Рис. 3.3.10. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК MEIS2 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ у порівнянні з контролем 1; ###- $p < 0,001$ у порівнянні з контролем 2.

Разом з тим, експресія мРНК транскрипційного фактора MEIS3 теж була чутливою до дефіциту глутаміну як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1, але змінювалася у протилежному до MEIS2 напрямку (Рис. 3.3.11). Було встановлено, що рівень експресії мРНК MEIS3 збільшувався як у контрольних клітинах гліобластоми (+22 %) так і у клітинах гліобластоми з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 (+20 %) (Рис. 3.3.11).

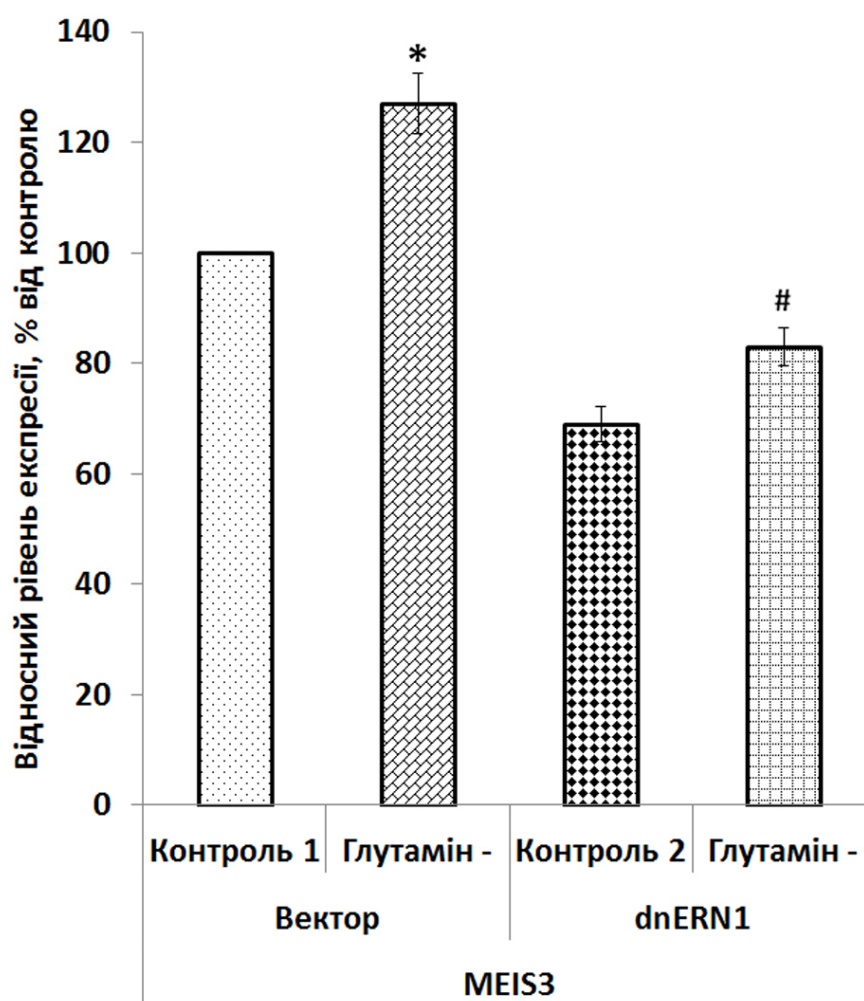


Рис. 3.3.11. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК MEIS3 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК ACTB і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; * - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; # - $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Пригнічуючий вплив дефіциту глутаміну на рівень експресії мРНК як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1 був показаний також для транскрипційного фактора SPAG4. Так, було встановлено, що рівень експресії цієї мРНК знижувався у контрольних клітинах гліобластоми на 28 %, а у клітинах гліобластоми з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 на 25 % (Рис. 3.3.12).

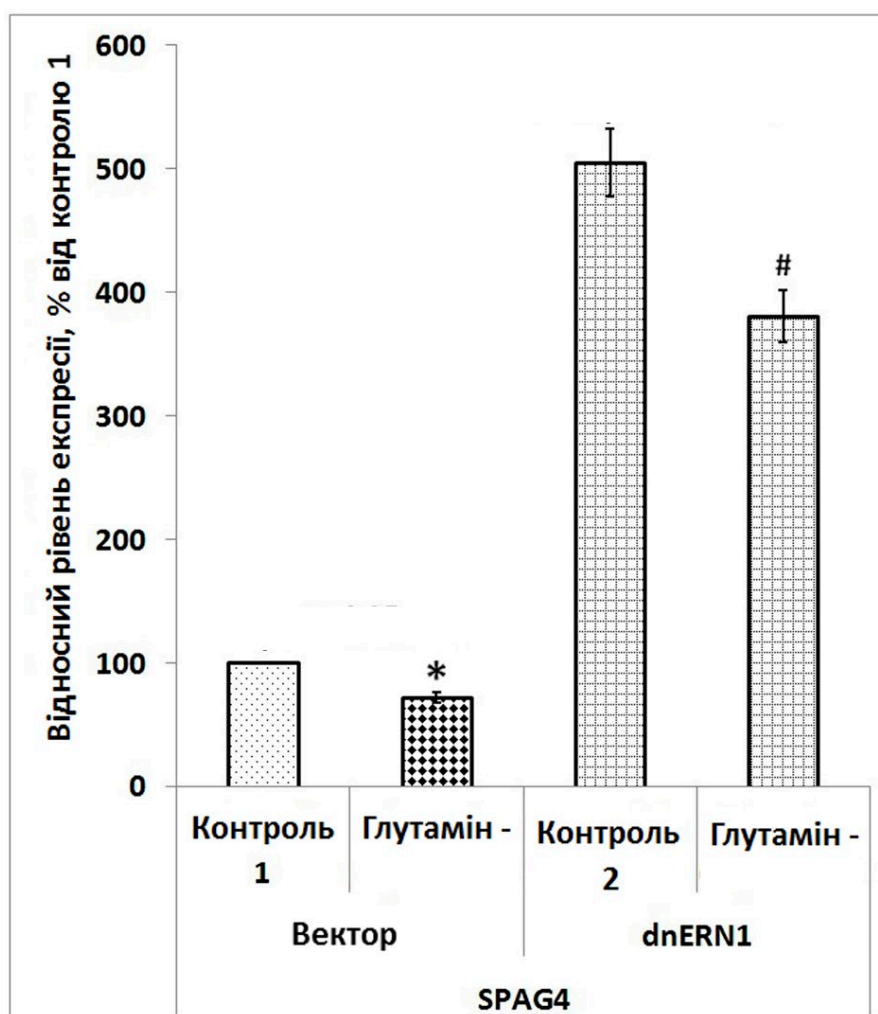


Рис. 3.3.12. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК SPAG4 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Була також досліджена чутливість експресії генів для транскрипційних факторів групи LHX (LHX1, LHX2 та LHX6) до дефіциту глутаміну в середовищі. Встановлено, що реакція експресії цих генів на дефіцит глутаміну була різною як по напрямку, так і за величиною змін (Рис. 3.3.13, 3.3.14 і 3.3.15).

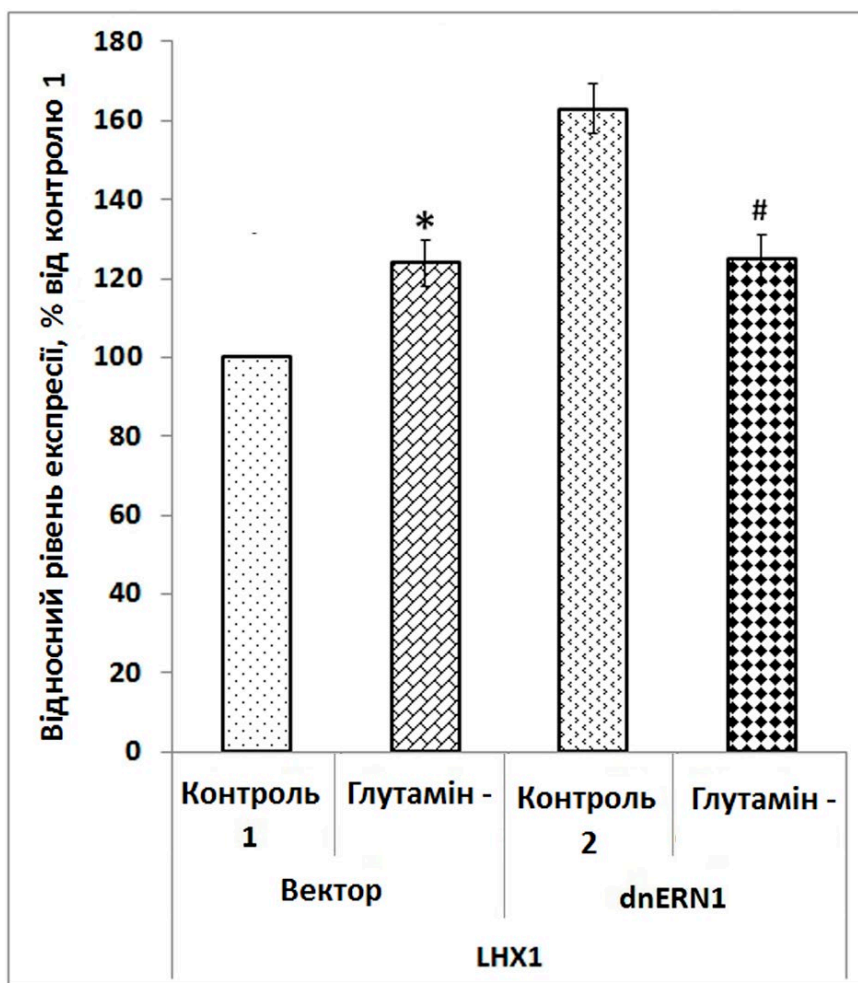


Рис. 3.3.13. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК LHX1 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Так, рівень експресії мРНК LHX1 збільшувався у контрольних клітинах гліобластоми на 24 %, а у клітинах гліобластоми без обох ензиматичних активностей ERN1, навпаки, знижувався на 23 % (Рис. 3.3.13). Разом з тим, експресія мРНК транскрипційного фактора LHX2 була дуже чутливою до дефіциту глутаміну в обох типах клітин (Рис. 3.3.14).

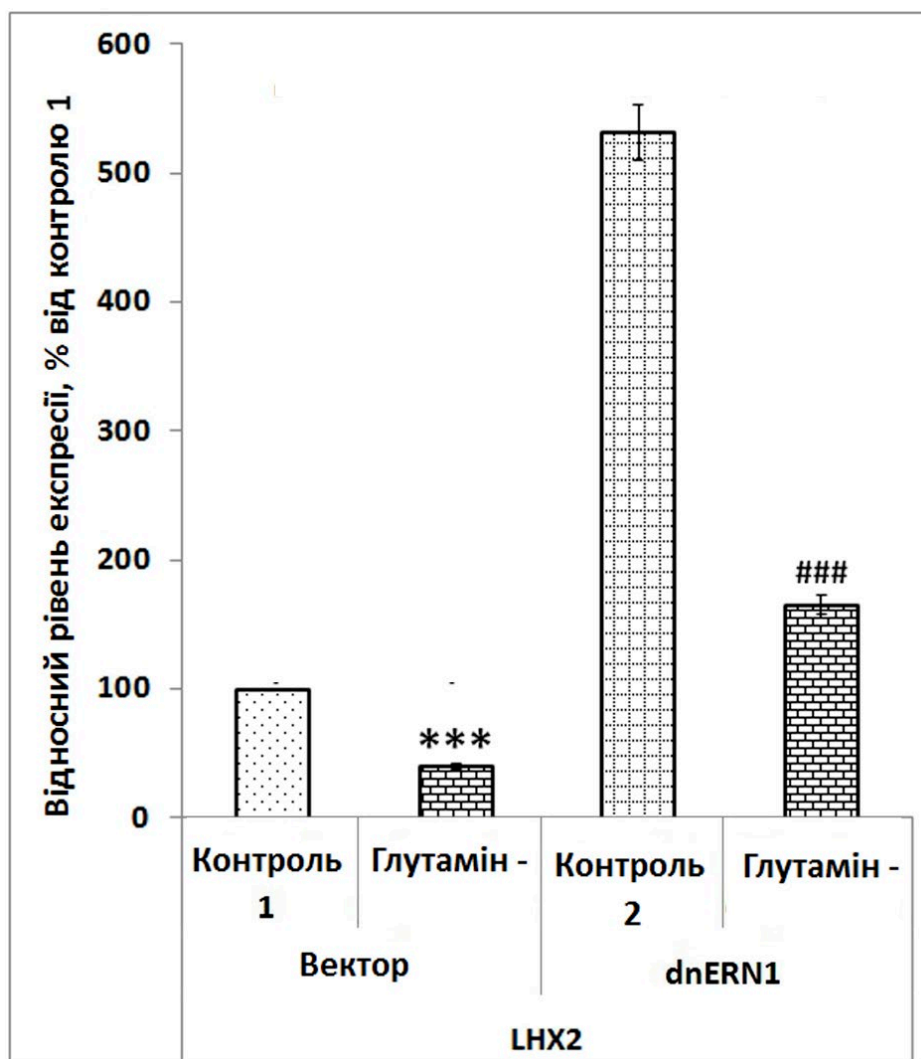


Рис. 3.3.14. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК LHX2 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; ***- $p < 0,001$ у порівнянні з контролем 1; ###- $p < 0,001$ у порівнянні з контролем 2.

Встановлено, що рівень експресії цієї мРНК знижувався у контрольних клітинах гліобластоми на 60 %, а у клітинах гліобластоми з пригніченим сигнальним протеїном ERN1 на 69 % (Рис. 3.3.12). Показано також, що експресія мРНК транскрипційного фактора LHX3 також знижується як у контрольних клітинах гліобластоми, так і клітинах з пригніченим ERN1, але в меншій мірі порівняно з LHX2. Так, рівень експресії мРНК LHX3 у контрольних клітинах

гліобластоми знижувався на 30 %, пригнічення ERN1 істотно не змінювало чутливість цього гена до дефіциту глутаміну (Рис. 3.3.15).

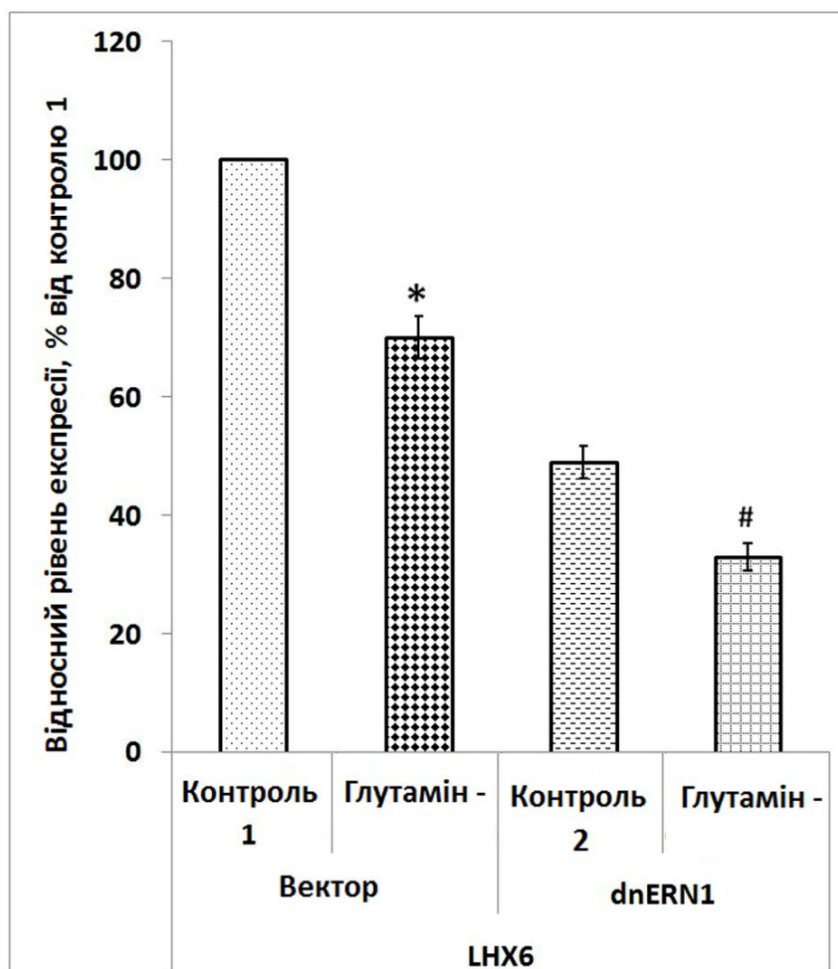


Рис. 3.3.15. Вплив дефіциту глутаміну (глутамін -) на рівень експресії мРНК LHX6 у контрольних клітинах гліобластоми (вектор) та клітинах з пригніченим ERN1 (dnERN1). Значення експресії цієї мРНК нормалізували по мРНК АСТВ і виражали у відсотках до контролю 1 та 2; $n = 4$; *- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 1; #- $p < 0,05$ у порівнянні з контролем 2.

Таким чином, експресія генів переважної більшості транскрипційних факторів родини Nucleobox у клітинах гліобластоми є чутливими до дефіциту глюкози і глутаміну в середовищі, але реакція різних генів як на дефіцит глюкози, так і на дефіцит глутаміну є різною за величиною, а інколи і за напрямком змін, причому пригнічення сигнального протеїну стресу

ендоплазматичного ретикулума ERN1 часто модифікує чутливість експресії генів до дефіциту глюкози і/або глутаміну.

3.4. Біоінформаційний аналіз промоторних ділянок генів транскрипційних факторів родини Nucleobox

Прийнято вважати, що ефекти гіпоксії в клітинах реалізуються через транскрипційний фактор HIF [41, 43, 47, 51, 57]. Разом з тим, появились роботи, в яких чітко показано, що гіпоксія проявляє різно-направлену дію на експресію різних генів і що пригнічення ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума модифікує гіпоксичну регуляцію великої кількості генів, причому може як знижувати, так і посилювати ефект гіпоксії, специфічно для кожного гена, а також знімати чи ініціювати гіпоксичну регуляцію експресії генів [63-70, 137, 138]. Відомо, що опосередкована сигнальним шляхом ERN1 регуляція експресії генів за умов стресу ендоплазматичного ретикулума значною мірою реалізується через транскрипційний фактор XBP1s, синтез якого відбувається шляхом альтернативного сплайсингу мРНК за участі ендорибонуклеази ERN1, але сайти зв'язування XBP1s та HIF перекриваються і таким шляхом може відбуватися взаємодія гіпоксичної регуляції генів зі стресом ендоплазматичного ретикулума [28, 33, 34].

У зв'язку з цим, для виявлення молекулярних механізмів залежності гіпоксичної регуляції експресії генів від стресу ендоплазматичного ретикулума нами проведені біоінформаційні дослідження по виявленню сайтів зв'язування транскрипційних факторів HIF та XBP1 у промоторних ділянках деяких із досліджених нами генів. Результати біоінформаційного аналізу промоторних ділянок генів *ZEB2*, *LHX1*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4*, *NKX3-1* і *HIF1A* на наявність в них послідовностей A/GCGTGG/C (C/GCACGC/T) і CGTGG

(CCACG), що зв'язують транскрипційний фактор HIF та XBP1, відповідно, представлені у таб. 3.4.1 і Табл. 3.4.2.

Як видно із даних біоінформаційного аналізу, представлених у Табл. 3.4.1, промоторні ділянки генів *ZEB2*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4*, *NKX3-1* та *HIF1A* містять по одному “прямому” варіанту послідовностей A/GCGTGG/C, а промоторна ділянка гена *SPAG4* містять аж три таких послідовності. У промоторі гена *LHX1* є зворотна послідовність (CCACGCC), корова частина якої є дзеркальним відображенням наведеної вище послідовності. Подібні послідовності виявлені також у промоторах *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4* та *HIF1A*. Всі ці ділянки мають можливість зв'язувати транскрипційний фактор HIF і контролювати транскрипцію Homeobox генів.

Надзвичайно важливим моментом цього аналізу є виявлення в послідовностях, що зв'язують транскрипційний фактор HIF коротших послідовностей, які можуть зв'язувати транскрипційний фактор XBP1s – CGTGG (Табл. 3.4.1). Саме ця послідовність виявлена у промоторних ділянках більшості досліджених генів, а саме *ZEB2*, *LHX1*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4* та *HIF1A*, і тому залежність гіпоксичної регуляції від стресу ЕР може бути обумовлена також і взаємодією транскрипційних факторів HIF та XBP1i на цих промоторних ділянках генів *ZEB2*, *LHX1*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4* та *HIF1A*. Разом з тим, детальні механізми такої взаємодії ще невідомі і заслуговують на подальше їх вивчення.

Таблиця 3.4.1

Послідовності A/GCGTGG/C (C/GCACGC/T), що зв'язують транскрипційний фактор HIF, у промоторних ділянках генів транскрипційних факторів родини Номеобокс

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промоторної ділянки та GenBank номер
<i>ZEB2</i>	-131 до -125	TAC <u>GTGG</u>	1, NM_014795
<i>LHX1</i>	-472 до -466	CCAC <u>GCC</u>	2, NM_005568
<i>LHX2</i>	-745 до -739 -262 до -256	AGC <u>GTGG</u> GCACGCG	3, NM_004789
<i>TGIF1</i>	-549 до -543 199 до 205	CGC <u>GTGG</u> GCACGTC	4, NM_003244
<i>PRRX1</i>	-289 до -283 3 106 до 112	TGC <u>GTGG</u> GCACGTT	5, NM_006902
<i>SPAG4</i>	-884 до 878 -639 до -633 -628 до -622 -383 до -387 -128 до -122	GAC <u>GTGG</u> GGC <u>GTGG</u> GCACGCC GGC <u>GTGG</u> CCAC <u>GCC</u>	6, NM_004566
<i>NKX3-1</i>	-408 до -402	TGC <u>GTGC</u>	7, NM_006167
<i>HIF1A</i>	-158 до -152 -93 до -87	GCACGTG GGC <u>GTGG</u>	8, NM_001530

1 - [http:// switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702223/](http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702223/)

2 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_708724/

3 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709898/

4 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722322/

5 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_703093/

6 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722270/

7 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_713190/

8 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721637/

В Табл. 3.4.2 наведені дані біоінформаційного аналізу по виявленню у промоторних ділянках генів *ZEB2*, *LHX1*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4*, *NKX3-1* та *HIF1A* послідовностей, які можуть зв'язувати транскрипційний фактор ХВР1s – CCACG і його зворотний варіант CGTGG, що є дзеркальним відображенням послідовності CCACG.

Таблиця 3.4.2

Послідовності CCACG/CGTGG, що зв'язують транскрипційний фактор ХВР1s, у промоторних ділянках Номеобок генів

Символ гена	Позиція відносно старту транскрипції	Послідовність	Web сайт послідовності промотору та GenBank номер
<i>ZEB2</i>	-129 до -125	CGTGG	1, NM_014795
<i>LHX1</i>	-447 до -443	CCACG	2, NM_005568
<i>LHX2</i>	-743 до -739	CGTGG	3, NM_004789
<i>TGIF1</i>	-547 до -543	CGTGG	4, NM_003244
<i>PRRX1</i>	-287 до -283	CGTGG	5, NM_006902
<i>SPAG4</i>	-882 до -878 -637 до -633 -245 до -241 -128 до -124	CGTGG CGTGG CGTGG CCACG	6, NM_024680
<i>NKX3-1</i>	Не виявлено		7, NM_006167
<i>HIF1A</i>	-550 до -546 -91 до -87	CGTGG CGTGG	9, NM_001530

1 - [http:// switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702223/](http://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_702223/)

2 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_708724/

3 – https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_709898/

4 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722322/

5 – https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_703093/

6 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_722270/

7 - https://www.activemotifgoclones.com/productinfo/id_713190/

8 - https://switchdb.switchgeargenomics.com/productinfo/id_721637/

Такі послідовності виявлені у промоторних ділянках майже всіх досліджених генів за винятком гена *NKX3-1* (Табл. 3.4.2), причому частина із них перекривається з послідовностями, які розпізнають транскрипційний фактор HIF, про що уже було сказано вище. Варто відмітити, що взаємодія транскрипційних факторів HIF та XBP1 у промоторних ділянках генів може відбуватися і в тому випадку, коли зв'язувальні ділянки цих транскрипційних факторів розташовані у різних ділянках промоторної зони і не перекривається між собою, а буде визначатися кількістю регуляторних факторів і конформацією промоторної ділянки.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що індуковані гіпоксією зміни в експресії генів *ZEB2*, *LHX1*, *LHX2*, *TGIF1*, *PRRX1*, *SPAG4*, *NKX3-1* та *HIF1A*, які причетні до регуляції процесів проліферації клітин, залежать від стресу ендоплазматичного ретикулума, в тому числі і від опосередкованого ERN1 сигнального шляху, на що вказують результати біоінформаційних досліджень сайтів зв'язування транскрипційних факторів з промоторними ділянками досліджених генів. Разом з тим, виявлення молекулярних механізмів залежності гіпоксичної регуляції експресії кожного із досліджених генів від стресу ендоплазматичного ретикулума вимагає подальших більш ґрунтовних досліджень.

3.5. Біоінформаційний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК *ZEB2* і *PAX6* та експресія мікроРНК у клітинах гліобластоми з пригніченим IRE1

Для виявлення ролі пост-транскрипційних механізмів регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox були проведені біоінформаційні дослідження 3'-нетранслюємих ділянок мРНК *ZEB2* і *PAX6* на наявність сайтів зв'язування мікроРНК. Результати представлені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Сайти зв'язування мікроРНК з мРНК відповідних генів з 3' UTR кінця

Назва мікроРНК	Назва мРНК	Позиція сайту зв'язування з мРНК від початку 3'-UTR	Передбачуване послідовне сполучення цільової області мРНК (верхня лінія) і мікроРНК (нижня лінія)
miR-19a-3p	PAX6	Позиція 1485-1492 у 3' UTR PAX6 hsa-miR-19a-3p	5' ...UCUGUCUCCCUCCCUUUGCACA... 3' AGUCAAAACGUAUCUAAACGUGU
miR-96-5p	PAX6	Позиція 975-981 у 3' UTR PAX6 hsa-miR-96-5p	5' ...GAUUGUAAAAAACCAUGCCAAAG... 3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU
miR-145-5p	ZEB2	Позиція 3324-3330 у 3' UTR ZEB2 hsa-miR-145-5p	5' ...GGAGGAUGAGGAAACACUGGAAC... 3' UCCCUAAGGACCCUUUUGACCUG
miR-182-5p	ZEB2	Позиція 2098-2104 у 3' UTR ZEB2 hsa-miR-182-5p	5' ...GCUUCUUAAAUCUAA--UUGCCAAG... 3' UCACACUCAAGAUGGUAACGGUUU

Із представлених у табл. 3.5.1 даних видно, що 3'-нетранслюєма ділянка мРНК PAX6 має сайти зв'язування мікроРНК miR-19a-3p та miR-96-5p, а мРНК ZEB2 також має сайти зв'язування мікроРНК, але інших - miR-145-5p і miR-182-5p. Отримані результати вказують на можливу участь цих мікроРНК у регуляції експресії генів *ZEB2* і *PAX6* на пост-транскрипційному рівні.

У зв'язку з цим, були проведені дослідження рівня експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-96-5p, miR-145-5p і miR-182-5p у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) у порівнянні з контрольними клітинами. Результати представлені на Рис. 3.5.1.

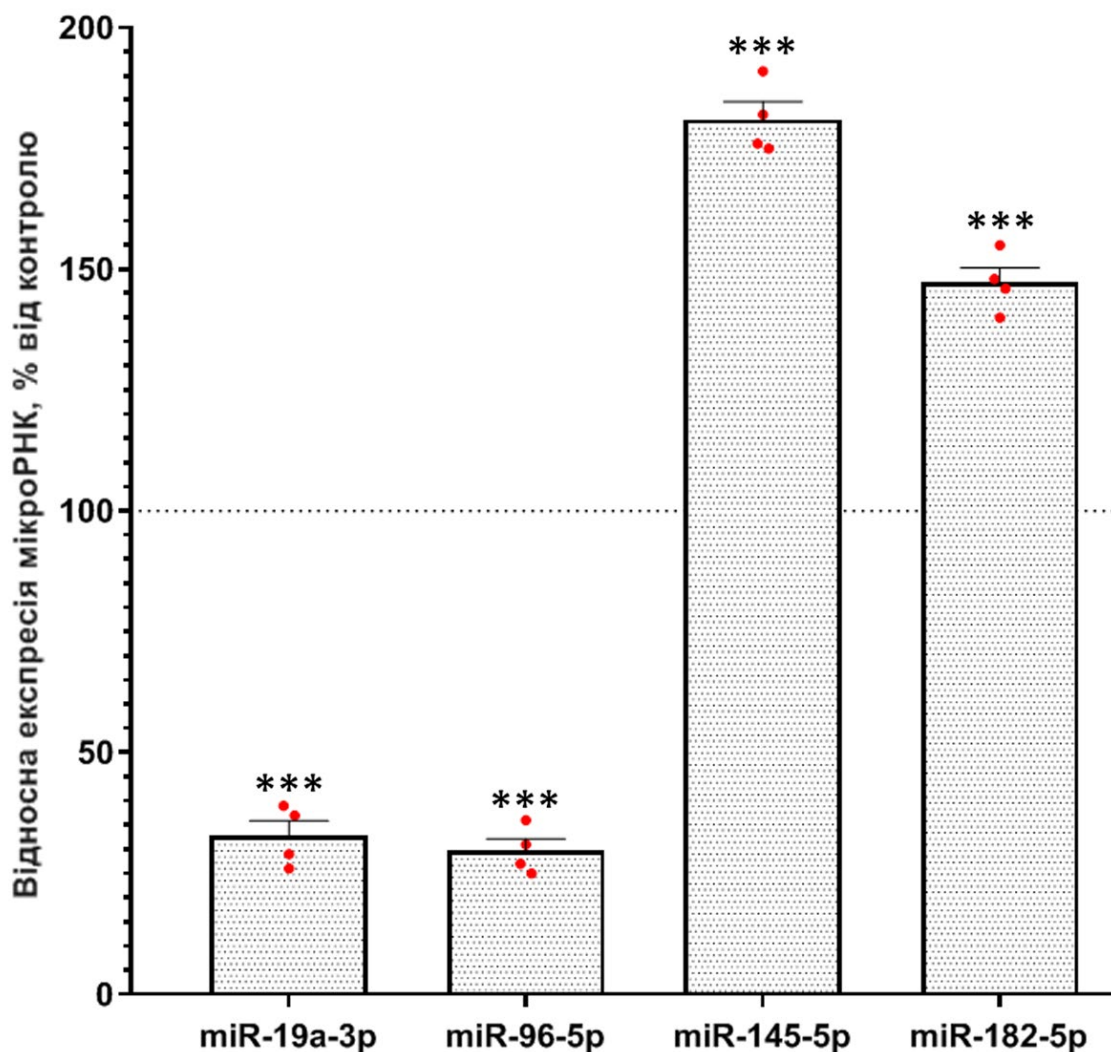


Рис. 3.5.1. Відносний рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p, miR-96-5p, miR-145-5p та miR-182-5p у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) у порівнянні з контрольними клітинами. Отримані значення рівня експресії цих мікроРНК були нормалізовані по рівню експресії АСТВ і представлені як відсоток від контролю (100 %); $n = 4$; ***- $p < 0,001$.

Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії мікроРНК miR-19a-3p і miR-96-5p, у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 різко знижується (-67 % та -70 %, відповідно) у порівнянні з контрольними клітинами гліобластоми, а miR-145-5p та miR-182-5p, навпаки, суттєво підвищується (+81 % та +47 %, відповідно) (Рис.

3.5.1). Таким чином, зниження рівня експресії мікроРНК miR-19a-3p і miR-96-5p у клітинах гліобластоми лінії U87MG з пригніченими обома ензиматичними активностями ERN1 обернено корелює зі змінами рівня експресії PAX6 мРНК у цих клітинах. Обернена кореляція також виявляється між рівнями експресії мРНК ZEB2 і мікроРНК miR-145-5p та miR-182-5p. Таким чином, отримані результати вказують на можливу участь цих мікроРНК у регуляції експресії генів *ZEB2* і *PAX6* на пост-транскрипційному рівні.

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Роль IRE1-залежного шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в регуляції експресії генів родини Homeobox

Проведені нами дослідження показали, що експресія досліджених нами генів транскрипційних факторів родини Homeobox у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG є залежними від стресу ендоплазматичного ретикулула і що за умов пригнічення IRE1/ERN1, основного сигнального шляху цього стресу, виявлено різно-направлені зміни в експресії досліджених генів [160]. Виявлені зміни були гено-специфічними і залежали від типу нокдауну ERN1. Результати цих досліджень узагальнено на Рис. 4.1.1.

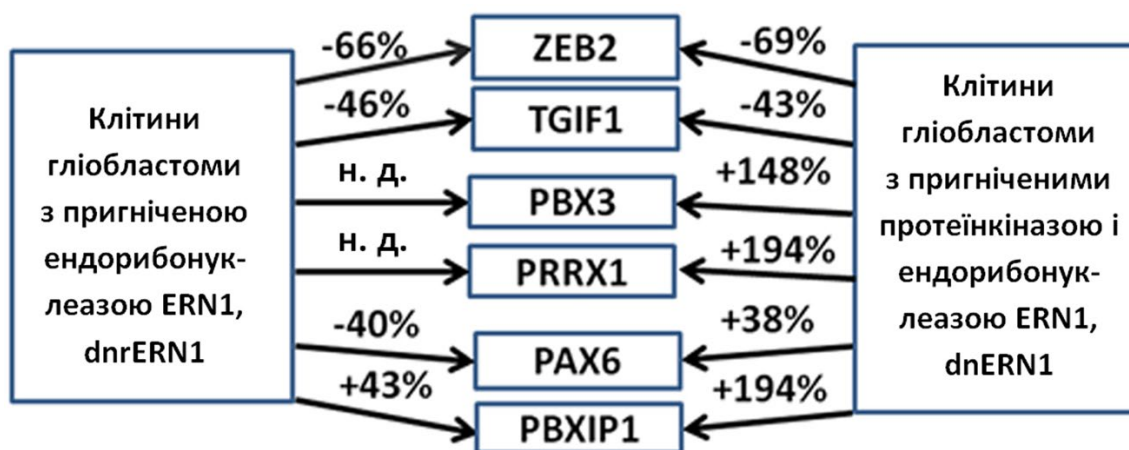


Рис. 4.1.1. Рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox (ZEB2, TGIF1, PBX3, PRRX1, PAX6 та PBXIP1) у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG з пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 (dnrERN1) або обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназою) цього сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулула (dnERN1) у порівнянні з контрольними клітинами, прийнятими за 100 %; н. д. – не виявлено достовірних змін.

Вони добре узгоджуються з численними даними щодо важливої ролі стресу ендоплазматичного ретикулума, особливо його сигнального шляху ERN1, у зростанні пухлини, проліферації клітин, виживанні та хіміорезистентності через перепрограмування геному [10, 13, 14, 16, 17].

Основний висновок цієї роботи полягає в тому, що пригнічення ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, ініційованого домінантно-негативними конструкціями ERN1, істотно впливає на експресію вибраних нами генів родини Nucleobox через різні, опосередковані ERN1, молекулярні механізми. Так, вплив на гени PBX3 і PRRX1 здійснюється через протеїнкіназу ERN1, ZEB2 і TGIF1 – через ендорибонуклеазу ERN1, а гени PAX6 і PBXIP1 – через складну взаємодію протеїнкінази ERN1 з ендорибонуклеазою. Ці результати добре узгоджуються з раніше опублікованими даними про те, що протеїнкіназа ERN1 бере участь у регуляції епірегуліну (EREG), ферменту, що розкладає інсулін (IDE), металопептидази пітрилізину 1 (PITRM1), фактора активації транскрипції 3 (ATF3) і ендотеліну 1 (EDN1) ген експресії в клітинах гліобластоми, оскільки інгібування ендорибонуклеази ERN1 не змінювало рівень їх експресії [15, 34, 36-38].

Є численні дані про те, що ендорибонуклеазна активність ERN1 контролює залежну від стресу ER експресію генів за допомогою різних механізмів: через нетрадиційний сплайсинг пре-мРНК транскрипційного фактора XBP1 і шляхом вибіркової деградації мРНК за допомогою спеціального механізму відомого як RIDD, ERN1-залежний розпад мРНК [14, 29, 33]. У цьому дослідженні ми показали, що сайленсинг XBP1 та інгібування ендорибонуклеази ERN1 у клітинах гліобластоми спричинили подібні зміни в експресії досліджених нами Nucleobox генів. Таким чином, зміни в експресії генів у клітинах, у яких відсутня ендорибонуклеаза ERN1, опосередковуються переважно фактором XBP1s.

Взаємодія протеїнкіназної і ендорибонуклеазної активностей ERN1 у регуляції експресії генів була раніше показана для багатьох генів [34, 37]. Було також показано, що ERN1 відіграє ключову роль у HIF-1 α -опосередкованій

регуляції гліколізу в макрофагах, стимульованому прозапальними тригерами через XBP1s-незалежний механізм, причому ці результати узгоджуються з нашими даними щодо ERN1-залежних механізмів гіпоксичної регуляції експресії генів [34, 37, 38]. Варто відзначити, що нокдаун обох ферментативних активностей ERN1 призводить до менш виражених змін у проліферації клітин гліобластоми, ніж інгібування однієї ендорибонуклеази ERN1 [36]. У той же час, інгібування обох ферментативних активностей ERN1 за допомогою технології dnERN1 пригнічує проліферацію клітин гліоми та ріст пухлини шляхом зниження рівня експресії генів, відповідальних за ангиогенез і проліферацію клітин, але збільшує інвазію [25,26,32,33]. Усі досліджені нами фактори транскрипції родини Nomeobox по-різному задіяні в онкогенезі, частина із них сприяє проліферації пухлинних клітин, регулюючи транскрипцію за допомогою різних механізмів [98-103].

У зв'язку з цим ми передбачали зниження їх експресії в клітинах гліобластоми з нокдауном ERN1, оскільки проліферація клітин за цих умов знижується [16,36]. Однак результати цього дослідження показали, що інгібування ендорибонуклеази ERN1 і протеїнкінази призводить до значного зниження рівня експресії лише двох Nomeobox генів *TGIF1* і *ZEB2* [160]. Важливо відзначити, що зниження рівня експресії цих двох генів опосередковується через ендорибонуклеазу ERN1. Але експресія інших Nomeobox генів у цих експериментальних умовах була збільшена переважно через протеїнкіназний шлях ERN1. Водночас інгібування ендорибонуклеази ERN1 у клітинах гліобластоми призводить до більш вираженого пригнічення клітинної проліферації [33], пригнічує не лише гени *TGIF1* та *ZEB2*, а й ген *PAX6*, не змінюючи рівень експресії генів *TBX3* і *PRRX1*. Ці результати вказують не тільки на можливу роль протеїнкінази ERN1 у регуляції експресії генів, а також у контролі клітинної проліферації.

Таким чином, анти-проліферативний ефект інгібування ендорибонуклеази ERN1 значно знижується при одночасному інгібуванні обох ферментативних

активностей ERN1 мабуть завдяки опосередкованій протеїнкіназою ERN1 індукції експресії про-проліферативних генів транскрипційних факторів TBX3, PRRX1 і TBXIP1. Важливо відзначити, що ці гени беруть участь у міграції та інвазії пухлинних клітин, а націлювання на мРНК TBX3 і PRRX1 пригнічує клітинну міграцію та інвазію різних пухлинних клітин [143, 145, 149]. Таким чином, збільшення експресії генів TBX3, PRRX1 і TBXIP1 у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазою ERN1 і протеїнкіназою може бути пов'язане з посиленням інвазивності цих клітин гліобластоми [16]. Це вказує на важливу та багатогранну роль протеїнкінази в регуляції клітинної проліферації та, можливо, інвазії через контроль експресії генів. Ці важливі відкриття вимагають подальшого поглибленого дослідження.

Результати цього дослідження також є важливими для оцінки можливих молекулярних механізмів регуляції генів родини Nucleobox у ERN1-залежному контролі росту гліобластоми. Крім того, детальні механізми контролю експресії генів, опосередкованого протеїнкіназою ERN1, ще не з'ясовані й вимагають подальших глибших досліджень, оскільки сигнальний шлях ERN1 бере участь у багатьох метаболічних шляхах, а його інгібування має чіткі протипухлинні ефекти [15-17, 34]. У той же час ми також показали, що тунікамідин впливає на експресію всіх досліджених генів родини Nucleobox у клітинах гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазою ERN1, що вказує на можливу участь й інших сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума в регуляції експресії цих генів. Отримані результати демонструють, що, можливо, всі сигнальні шляхи стресу беруть участь у контролі експресії досліджених Nucleobox генів, як і багатьох інших генів [36,38].

Варто відзначити, що тунікамідин знижує експресію генів *PBX3* і *PRRX1*, які є стійкими до інгібування ендорибонуклеази ERN1 у клітинах гліобластоми. Експресія інших досліджених генів родини Nucleobox посилювалася тунікамідином у цих клітинах гліобластоми. Подібні результати були отримані

також і для інших факторів транскрипції у клітинах гліобластоми, оброблених тунікамідом, у яких була пригнічена ендорібонуклеаза ERN1 [36].

Проведені нами дослідження також продемонстрували, що інгібування активності ендорібонуклеази та протеїнкінази ERN1 у клітинах гліобластоми U87MG спричиняє зниження рівня експресії miR-19a-3p та miR-96-5p, але підвищує рівні експресії miR-145 -5p і miR-182-5p. Виявлені зміни в мікроРНК можуть бути відповідальними за підвищення експресії мРНК PAX6 і зниження експресії мРНК ZEB2. Ці результати добре узгоджуються з численними даними щодо важливої ролі мікроРНК у контролі експресії генів родини Homeobox [124, 129, 148].

Проведені нами дослідження дають унікальне уявлення про молекулярні механізми, що контролюють експресію кількох генів родини Homeobox у клітинах гліобластоми, шляхом інгібування ERN1, підтверджуючи той факт, що стрес ендоплазматичного ретикулума є важливим фактором росту злоякісних пухлин і що Homeobox гени беруть участь у цьому процесі. У зв'язку з цим, ERN1, як основний сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума, є важливою мішенню для терапії гліобластоми [14-17, 32]. Таким чином, повний молекулярний механізм взаємодії ERN1-опосередкованого сигнального шляху стресу з експресією генів родини Homeobox є складним і потребує додаткових досліджень.

Зміни рівня експресії генів транскрипційних факторів ZEB2, TGIF1, PBX3, PRRX1, PAX6 та PBXIP1, що індуковані нокдауном ERN1, можливо відображають метаболічне перепрограмування клітин гліобластоми і пов'язані з пригніченням їх проліферації [16, 34, 36].

4.2. Механізми гіпоксичної регуляції експресії генів родини Homeobox

Важливими є результати дослідження впливу гіпоксії на експресію генів, що кодують важливі транскрипційні фактори родини Homeobox, які контролюють транскрипцію переважно регуляторних факторів, у клітинах гліобластоми U87MG у зв'язку з інгібуванням ERN1, основного сигнального шляху відповіді на незгорнуті протеїни [160]. Результати цього дослідження схематично узагальнені на Рис. 4.2.1.

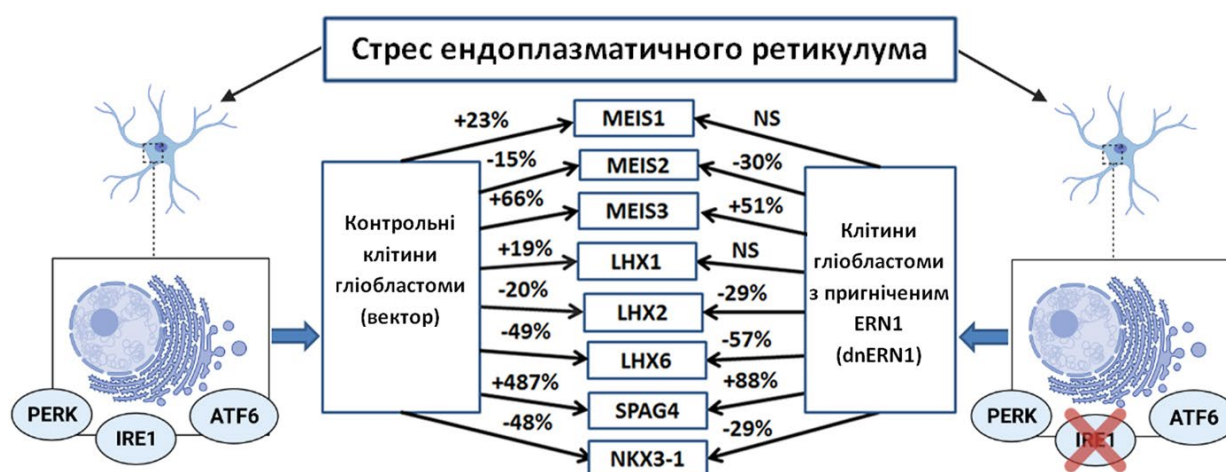


Рис. 4.2.1. Вплив гіпоксії на рівень експресії генів транскрипційних факторів родини Homeobox (MEIS1, MEIS2, MEIS3, LHX1, LHX2, LHX6, SPAG4 та NKX3-1) у контрольних клітинах гліобластоми лінії U87MG та клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума (dnER1), у порівнянні з клітинами, що росли без гіпоксії, прийнятими за 100 %.

Вони демонструють генно-специфічний характер змін у профілі експресії досліджених Homeobox генів за умов гіпоксії у клітинах гліобластоми та залежність гіпоксичної регуляції від стресу ендоплазматичного ретикулума, опосередкованого сигнальним протеїном ERN1 [160]. Результати гіпоксичної регуляції експресії гена SPAG4 показують сильну індукцію його експресії в клітинах гліобластоми і це добре узгоджується з даними літератури, що гіпоксія

посилює експресію SPAG4 через HIF у злоякісних пухлинах та пов'язана з їх прогресуванням, міграцією та інвазією клітин [119-121, 161, 162]. Принципово новим результатом цієї роботи є встановлення факту залежності гіпоксичної регуляції експресії гена SPAG4 від стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема ERN1, який асоціюється з пригніченням проліферації клітин та росту пухлин [16, 32, 36].

Ми також показали, що гіпоксична регуляція транскрипційних факторів MEIS1, MEIS2 і MEIS3 також контролюється стресом ендоплазматичного ретикулума, оскільки інгібування ERN1 усувало вплив гіпоксії на MEIS1 і знижувало гіпоксичну регуляцію MEIS3 [160]. Досі досить важко інтерпретувати отримані результати, оскільки ці фактори транскрипції родини Homeobox можуть виявляти як канцерогенні, так і пухлино-супресивні ефекти в різних новоутвореннях [103-106]. Гіпоксична регуляція Homeobox факторів групи LIM також контролюється сигнальним протеїном ERN1, але все ще важко пояснити значення отриманих результатів, оскільки ці протеїни також по-різному впливають на проліферацію клітин і ріст пухлин [115-118].

Гіпоксія є важливим фактором росту пухлини через те, що стрес ендоплазматичного ретикулума індукує стійкість до токсичних ефектів гіпоксії через перепрограмування геному та сприяє росту пухлини. Гіпоксична регуляція експресії генів реалізується переважно через фактор транскрипції HIF, але багато інших факторів можуть модулювати вплив гіпоксії на експресію генів [44, 137, 138, 157]. У той же час, експресія генів за умов гіпоксії є генно-специфічною та контролюється стресом ендоплазматичного ретикулума через модуль PERK/eIF2a/ATF4 і сигнальний шлях ERN1 [72-79].

Це дослідження дає унікальне уявлення про молекулярні механізми, що регулюють експресію генів, які кодують деякі фактори транскрипції родини Homeobox, такі як MEIS1, MEIS2, MEIS3, LHX1, LHX2, LHX6, SPAG4 та NKX3-1, у клітинах гліобластоми у відповідь на гіпоксію та їх зв'язок з пригніченням активності ERN1 і проліферації клітин. Все це свідчить про те, що

гіпоксія, а і стрес ендоплазматичного ретикулума є необхідним компонентом росту гліобластоми. Нинішні результати також підтверджують взаємодію стресу, опосередкованої ERN1, з гіпоксією, але детальні молекулярні механізми цієї регуляції ще чітко не визначені.

4.3. Особливості експресії генів родини Nomeobox у клітинах гліоми за умов дефіциту глутаміну та глюкози

Ми також дослідили вплив дефіциту глюкози і глутаміну на експресію генів, що кодують важливі транскрипційні фактори родини Nomeobox і які контролюють транскрипцію переважно як транскрипційні або регуляторні фактори, у клітинах гліобластоми U87 у зв'язку з пригніченням ERN1, основного сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулума [163-165]. Для цієї мети ми використали контрольні клітини гліоми, трансфіковані порожнім вектором pcDNA3.1, і клітини з повним дефіцитом ERN1, індукованим dnER1 (нокдаун ERN1). Це важливо для оцінки можливого значення залежного від ERN1 контролю проліферації клітин гліоми, оскільки є дані про те, що опосередкована ERN1 сигналізація стресу ендоплазматичного ретикулума бере участь у численних метаболічних шляхах і що нокдаун ERN1 має чіткі протипухлинні ефекти [15-17, 36].

Результати цього дослідження пояснюють можливі механізми впливу дефіциту глюкози та глутаміну на проліферацію/виживання клітин гліоми з пригніченим ERN1 через специфічні зміни в профілі експресії генів, що кодують важливі транскрипційні фактори родини Nomeobox, такі як PAX6, PBX3, PBXIP1, MEIS1, і MEIS2. Було показано, що всі досліджені гени мають різну чутливість до дефіциту глюкози [163] (Рис. 4.3.1). Експресія генів транскрипційних факторів PAX6, MEIS1 і MEIS2 знижувалася у контрольних клітинах гліобластоми за дефіциту глюкози, а експресія PBX3 і PBXIP1 була

стійкою до такого впливу. Водночас, нокдаун ERN1 істотно модифікував чутливість усіх досліджуваних генів до дефіциту глюкози.

Добре відомо, що активація сигнального протеїну ERN1 за стресу ендоплазматичного ретикулума тісно пов'язана з апоптозом, і що пригнічення її функції призводить до значного анти-проліферативного ефекту при зростанні гліобластоми [15, 16, 26, 36]. Таким чином, залежне від ERN1 пригнічення експресії генів *PBX3*, *PBXIP1*, *MEIS1* і *MEIS2* у клітинах гліоми за умов дефіциту глюкози добре узгоджується з його залученням до біології пухлинного росту та зниження проліферації клітин [15, 16, 26, 36, 106, 110]. Отримані нами дані також вказують на те, що стрес ендоплазматичного ретикулума, опосередкований ERN1, створює резистентність до дефіциту глюкози і що блокада ERN1 частково усуває цю резистентність. У той же час ми показали, що дефіцит глюкози призводить до збільшення рівня експресії гена *PAX6* як у контрольних, так і у клітинах гліобластоми із пригніченим ERN1. Цілком можливо, що цей вплив дефіциту глюкози на експресію гена *PAX6* зумовлений дефіцитом глюкози і важливою роллю *PAX6* у підтримці експресії інсуліну.

У цій роботі ми також демонстрували різні ефекти дефіциту глутаміну на експресію генів транскрипційних факторів родини *Homeobox* (*PAX6*, *PBX3*, *PBXIP1*, *MEIS1* і *MEIS2*), які мають переважно різноманітний вплив на ріст пухлини [106-111, 163]. Так, експозиція контрольних клітин гліобластоми без глутаміну у середовищі призводить до посилення експресії генів *PAX6* і *PBXIP1* та зниження експресії генів *PBX3* і *MEIS2*, а за умов нокдауну ERN1 у клітинах гліобластоми посилення експресії генів транскрипційних факторів *PAX6* і *PBXIP1*, викликане дефіцитом глутаміну зникає, але підвищує чутливість експресії гена *PBX3* до цього експериментального стану (Рис. 4.3.1).

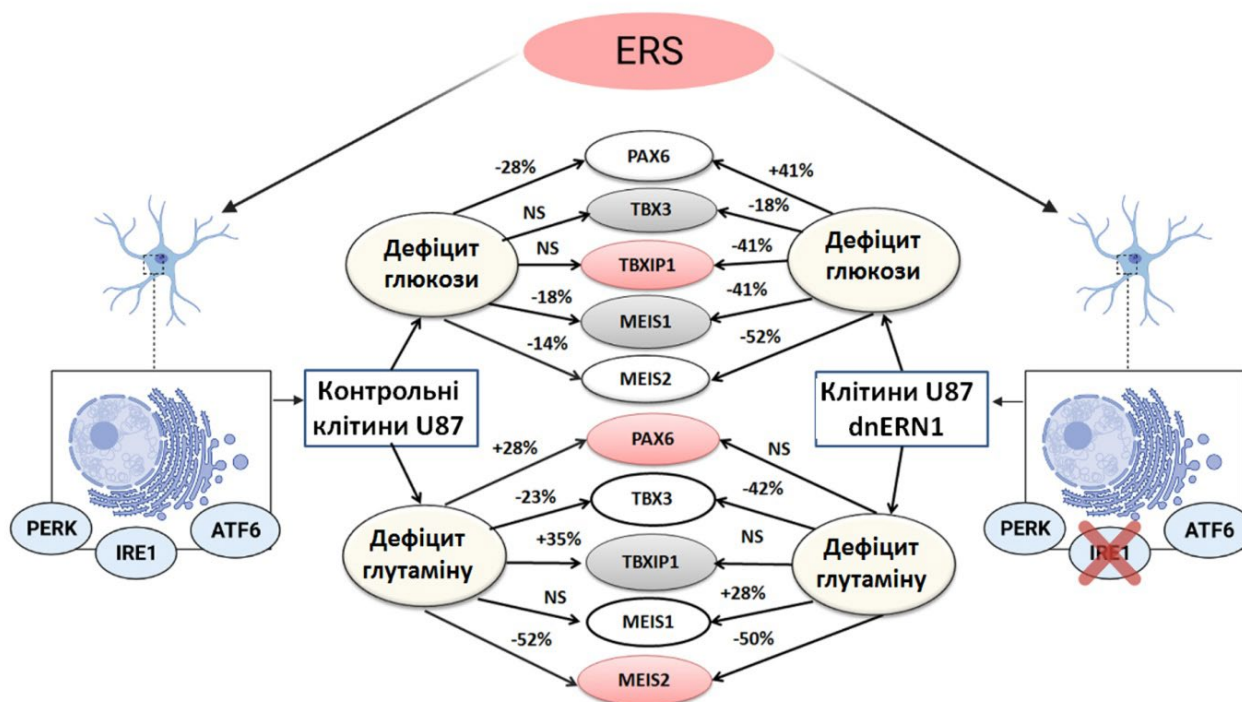


Рис. 4.3.1. Експресія генів транскрипційних факторів родини Номеобох (PAX6, TBX3, TBXIP1, MEIS1 та MEIS2) у контрольних клітинах гліобластоми лінії U87MG та клітинах з пригніченими обома ензиматичними активностями (ендорибонуклеазною і протеїнкіназною) ERN1, основного сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума (dnERN1), за умов дефіциту глюкози і глутаміну у порівнянні з клітинами, що росли у повноцінному середовищі, прийнятими за 100 %.

Функціональне значення цих змін у експресії генів транскрипційних факторів PAX6, PBX3, PBXIP1 і MEIS2, які мають переважно різноманітний вплив на проліферацію клітин і ріст пухлини, за умов дефіциту глутаміну, можливо, пов'язане з дефіцитом глутаміну та опосередковано ERN1 [16]. Можливо, що відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулума, опосередкована ERN1, створює стійкість до дефіциту глутаміну, а блокада ERN1 змінює цю стійкість.

У той же час ми показали, що дефіцит глутаміну збільшує рівень експресії гена *MEIS2* як у контрольних, так і в клітинах гліобластоми з пригніченим ERN1

незалежно від його нокдауну [163]. Подібні результати були отримані і для низки інших факторів транскрипції родини Homeobox [164-165]. Ці дані також добре узгоджуються з пригніченням проліферації клітин за умов дефіциту глутаміну, оскільки глутамін є дуже важливим фактором росту злоякісних пухлин [80, 81, 111].

Таким чином, глюкоза та глутамін є необхідними компонентами росту гліобластоми і результати наших досліджень розкривають деякі молекулярні механізми щодо їх ролі у регуляції експресії генів факторів транскрипції родини Homeobox, зокрема таких як PAX6, PBX3, PBXIP1, MEIS1 та MEIS2, у клітинах гліобластоми у відповідь на дефіцит глюкози та глутаміну. Але найважливішим є їх зв'язок з пригніченням активності сигнального протеїну ERN1 та проліферації клітин, що свідчить про важливу роль стресу ендоплазматичного ретикулума в адаптації клітин до дефіциту поживних речовин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичний аналіз та експериментальні дані, спрямовані на вирішення актуальної наукової проблеми щодо ролі стресу ендоплазматичного ретикулума, зокрема, сенсорно-сигнального протеїну ERN1 (сигналювання від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1), в регуляції експресії генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 у клітинах гліобластоми. Встановлено, що пригнічення ERN1 по-різному змінює експресію Nfe2b3 генів, причому різними механізмами і що протеїнкіназа ERN1 є важливим регулятором експресії генів. Гіпоксія, а також дефіцит глутаміну і глюкози впливають на рівень експресії цих генів гено-специфічно і нокдаун ERN1 переважно модифікує ефекти гіпоксії і дефіциту поживних речовин. Отримані результати розкривають механізми перепрограмування клітин гліобластоми за умов пригнічення ERN1.

1. Встановлено, що пригнічення ERN1, основного сенсорно-сигнального протеїну стресу ендоплазматичного ретикулума, ініційованого домінантно-негативними конструкціями ERN1, по-різному впливає на експресію генів транскрипційних факторів, PBX3, PRRX1, PAX6 та PBXIP1 у клітинах гліобластоми через різні, опосередковані ERN1, молекулярні механізми, включаючи і пост-транскрипційні через мікроРНК.

2. Виявлено, що зниження рівня експресії генів *ZEB2* та *TGIF1* опосередковане пригніченням ендорибонуклеазної активності ERN1, а генів *PBX3* і *PRRX1* - пригніченням його протеїнкіназної активності.

3. Показано, що гіпоксія збільшує рівень протеїну HIF1A як у контрольних клітинах гліобластоми, так і у клітинах з пригніченим ERN1, але по-різному впливає на експресію генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3, причому ефект гіпоксії переважно залежить від активності ERN1.

4. У промоторах генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 виявлені сайти зв'язування HIF та XBP1s, що опосередковує сигнальний шлях

ERN1, а також їх перекривання, а це може свідчити про наявність контролю гіпоксичної регуляції стресом ендоплазматичного ретикулума.

5. Встановлено, що експресія більшості досліджених генів транскрипційних факторів родини Nfe2b3 є чутливою до дефіциту глутаміну та глюкози, але по-різному і залежить від активності ERN1.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
2. Xu, W., Li, T., Gao, L., Zheng, J., Shao, A., & Zhang, J. (2017). Efficacy and safety of long-term therapy for high-grade glioma with temozolomide: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(31), 51758–51765. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17401>
3. Tipping, M., Eickhoff, J., & Ian Robins, H. (2017). Clinical outcomes in recurrent glioblastoma with bevacizumab therapy: An analysis of the literature. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 44, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.070>
4. Schiera, G., Di Liegro, C. M., & Di Liegro, I. (2017). Molecular Determinants of Malignant Brain Cancers: From Intracellular Alterations to Invasion Mediated by Extracellular Vesicles. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2774. <https://doi.org/10.3390/ijms18122774>
5. Masui, K., Onizuka, H., Cavenee, W. K., Mischel, P. S., & Shibata, N. (2019). Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 39(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/neup.12535>
6. Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
7. Obacz, J., Avril, T., Le Reste, P. J., Urrea, H., Quillien, V., Hetz, C., & Chevet, E. (2017). Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular

- mechanisms to therapeutic perspectives. *Science signaling*, 10(470), eaal2323.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aal2323>
8. Moon, H. W., Han, H. G., & Jeon, Y. J. (2018). Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3020. <https://doi.org/10.3390/ijms19103020>
 9. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 10. Chevet, E., Hetz, C., & Samali, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer discovery*, 5(6), 586–597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1490>
 11. Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., & Date, I. (2011). Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain tumor pathology*, 28(1), 13–24. <https://doi.org/10.1007/s10014-010-0007-z>
 12. Parzych, K., Saavedra-García, P., Valbuena, G. N., Al-Sadah, H. A., Robinson, M. E., Penfold, L., Kuzeva, D. M., Ruiz-Tellez, A., Loaiza, S., Holzmann, V., Caputo, V., Johnson, D. C., Kaiser, M. F., Karadimitris, A., Lam, E. W., Chevet, E., Feldhahn, N., Keun, H. C., & Auner, H. W. (2019). The coordinated action of VCP/p97 and GCN2 regulates cancer cell metabolism and proteostasis during nutrient limitation. *Oncogene*, 38(17), 3216–3231. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0651-z>
 13. Wang, M., & Kaufman, R. J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529(7586), 326–335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>
 14. Almanza, A., Carlesso, A., Chinth, C., Creedican, S., Doultisinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., Healy, S., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, 286(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>

15. Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O., & Moenner, M. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC cancer*, 13, 597. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-597>
16. Auf, G., Jabouille, A., Guérit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., von Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A., & Moenner, M. (2010). Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15553–15558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914072107>
17. Logue, S. E., McGrath, E. P., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R. M., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E. C., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J. B., Jäger, R., Gorman, A. M., & Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nature communications*, 9(1), 3267. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05763-8>
18. Sackmann E. (2014). Endoplasmatic reticulum shaping by generic mechanisms and protein-induced spontaneous curvature. *Advances in colloid and interface science*, 208, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.02.006>
19. Braakman, I., & Bulleid, N. J. (2011). Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 80, 71–99. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062209-093836>
20. Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., & Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS biology*, 8(7), e1000415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000415>

21. Carrara, M., Prischi, F., & Ali, M. M. (2013). UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6454–6466. <https://doi.org/10.3390/ijms14036454>
22. Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271–274. <https://doi.org/10.1038/16729>
23. Lloyd, M. A., Osborne, J. C., Jr, Safer, B., Powell, G. M., & Merrick, W. C. (1980). Characteristics of eukaryotic initiation factor 2 and its subunits. *The Journal of biological chemistry*, 255(3), 1189–1193. PMID: 6153180.
24. Adams, S. L., Safer, B., Anderson, W. F., & Merrick, W. C. (1975). Eukaryotic initiation complex formation. Evidence for two distinct pathways. *The Journal of biological chemistry*, 250(23), 9083–9089. PMID: 1194278.
25. Rowlands, A. G., Panniers, R., & Henshaw, E. C. (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *The Journal of biological chemistry*, 263(12), 5526–5533. PMID: 3356695.
26. Saito A., Ochiai K., Kondo S. (2011) Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK ϵ IF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *The Journal of biological chemistry*, 286, 4809–4818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152900>.
27. Hetz, C., Chevet, E., & Harding, H. P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(9), 703–719. <https://doi.org/10.1038/nrd3976>
28. Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., & Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. *Developmental cell*, 13(3), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>

29. Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular cell*, 27(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.011>
30. Ali, M. M., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M. G., Morgan, G. J., Aherne, W., Collins, I., Davies, F. E., & Pearl, L. H. (2011). Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO journal*, 30(5), 894–905. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.18>
31. Lhomond, S., Avril, T., Dejeans, N., Voutetakis, K., Doultzinos, D., McMahon, M., Pineau, R., Obacz, J., Papadodima, O., Jouan, F., Bourien, H., Logotheti, M., Jégou, G., Pallares-Lupon, N., Schmit, K., Le Reste, P. J., Etcheverry, A., Mosser, J., Barroso, K., Vauléon, E., ... Chevet, E. (2018). Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO molecular medicine*, 10(3), e7929. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707929>
32. Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>
33. Moore, K., & Hollien, J. (2015). Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Molecular biology of the cell*, 26(16), 2873–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-02-0074>
34. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Khita, O.O., Minchenko, D.O. (2021). Inhibition of ERN1 signaling is important for the suppression of tumor growth. *Clinical Cancer Drugs*, 8(1), 27-38. <http://dx.doi.org/10.2174/2212697X08666211006100250>

35. Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O. & Minchenko D.O. (2015). IRE-1 α signaling as a key target for suppression of tumor growth. *Single Cell Biology*, 4(3), 118. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3235>
36. Minchenko, O., Tsymbal, D., Minchenko, D., Moenner, M., Kovalevska, O. & Lypova, N. (2015). Inhibition of kinase and endoribonuclease activity of ERN1/IRE1 α affects expression of proliferation related genes in U87 glioma cells. *Cell Pathology*, 2(1), 18-29. <https://doi.org/10.1515/ersc-2015-0002>
37. Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Riabovol, O. O., Viletska, Y. M., Lahanovska, Y. O., Sliusar, M. Y., Bezrodnyi, B. H., & Minchenko, O. H. (2019). Hypoxic regulation of EDN1, EDNRA, EDNRB, and ECE1 gene expressions in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocrine regulations*, 53(4), 250–262. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0025>
38. Minchenko, D. O., Khita, O. O., Tsymbal, D. O., Danilovskyi, S. V., Rudnytska, O. V., Halkin, O. V., Kryvdiuk, I. V., Smeshkova, M. V., Yakymchuk, M. M., Bezrodnyi, B. H., & Minchenko, O. H. (2020). Expression of IDE and PITRM1 genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia and glucose deprivation. *Endocrine regulations*, 54(3), 183–195. <https://doi.org/10.2478/enr-2020-0021>
39. Minchenko, O.H., Kubaichuk, K.I., Minchenko, D.O., Kovalevska, O.V., Kulinich, A.O. & Lypova N.M. (2014). Molecular mechanisms of ERN1-mediated angiogenesis. *International Journal of Physiology and Pathophysiology*, 5(1), 1-22. <https://doi.org/10.1615/IntJPhysPathophys.v5.i1.10>
40. Minchenko D.O., Danilovskyi S.V., Kryvdiuk I.V., Bakalets T.V., Lypova N.M., Karbovskyi L.L. & Minchenko O.H. (2014). Inhibition of ERN1 modifies the hypoxic regulation of the expression of TP53-related genes in U87 glioma cells. *Endoplasm. Reticul. Stress Dis.*, 1(1), 18-26. <https://doi.org/10.2478/ersc-2014-0001>.

41. Dachs, G. U., Patterson, A. V., Firth, J. D., Ratcliffe, P. J., Townsend, K. M., Stratford, I. J., & Harris, A. L. (1997). Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nature medicine*, 3(5), 515–520. <https://doi.org/10.1038/nm0597-515>
42. Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., & Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, 88(11), 2606–2618. PMID: 10861440.
43. Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., & Oberhuber, G. (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer research*, 60(17), 4693–4696. PMID: 10987269.
44. Denko N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews. Cancer*, 8(9), 705–713. <https://doi.org/10.1038/nrc2468>
45. Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell*, 15(6), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018>
46. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., & Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & development*, 14(1), 34–44. PMID: 10640274.
47. Hvinden, I. C., Cadoux-Hudson, T., Schofield, C. J., & McCullagh, J. S. O. (2021). Metabolic adaptations in cancers expressing isocitrate dehydrogenase mutations. *Cell reports. Medicine*, 2(12), 100469. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100469>
48. Qin, N., de Cubas, A. A., Garcia-Martin, R., Richter, S., Peitzsch, M., Menschikowski, M., Lenders, J. W., Timmers, H. J., Mannelli, M., Opocher, G., Economopoulou, M., Siegert, G., Chavakis, T., Pacak, K., Robledo, M., & Eisenhofer, G. (2014). Opposing effects of HIF1 α and HIF2 α on chromaffin cell

- phenotypic features and tumor cell proliferation: Insights from MYC-associated factor X. *International journal of cancer*, 135(9), 2054–2064. <https://doi.org/10.1002/ijc.28868>
49. Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C. G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J. A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., Travins, J., Weiss, S., Looper, R., Ligon, K. L., Verhaak, R. G., Yan, H., & Kaelin, W. G., Jr (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*, 483(7390), 484–488. <https://doi.org/10.1038/nature10898>
 50. Chesnelong, C., Chaumeil, M. M., Blough, M. D., Al-Najjar, M., Stechishin, O. D., Chan, J. A., Pieper, R. O., Ronen, S. M., Weiss, S., Luchman, H. A., & Cairncross, J. G. (2014). Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro-oncology*, 16(5), 686–695. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not243>
 51. Williams, S. C., Karajannis, M. A., Chiriboga, L., Golfinos, J. G., von Deimling, A., & Zagzag, D. (2011). R132H-mutation of isocitrate dehydrogenase-1 is not sufficient for HIF-1 α upregulation in adult glioma. *Acta neuropathologica*, 121(2), 279–281. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0790-y>
 52. Nakayama, K., & Kataoka, N. (2019). Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3278. <https://doi.org/10.3390/ijms20133278>
 53. Infantino, V., Santarsiero, A., Convertini, P., Todisco, S., & Iacobazzi, V. (2021). Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5703. <https://doi.org/10.3390/ijms22115703>
 54. Verdikt, R., & Thienpont, B. (2024). Epigenetic remodelling under hypoxia. *Seminars in cancer biology*, 98, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.10.005>
 55. Choudhry, H., & Mole, D. R. (2016). Hypoxic regulation of the noncoding genome and NEAT1. *Briefings in functional genomics*, 15(3), 174–185. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elv050>

56. Pugh C. W. (2016). Modulation of the Hypoxic Response. *Advances in experimental medicine and biology*, 903, 259–271.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7678-9_18
57. Cavadas, M. A., Mesnieres, M., Crifo, B., Manresa, M. C., Selfridge, A. C., Keogh, C. E., Fabian, Z., Scholz, C. C., Nolan, K. A., Rocha, L. M., Tambuwala, M. M., Brown, S., Wdowicz, A., Corbett, D., Murphy, K. J., Godson, C., Cummins, E. P., Taylor, C. T., & Cheong, A. (2016). REST is a hypoxia-responsive transcriptional repressor. *Scientific reports*, 6, 31355.
<https://doi.org/10.1038/srep31355>
58. Cavadas, M. A. S., Cheong, A., & Taylor, C. T. (2017). The regulation of transcriptional repression in hypoxia. *Experimental cell research*, 356(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.024>
59. Yang, Y., Sandhu, H. K., Zhi, F., Hua, F., Wu, M., & Xia, Y. (2015). Effects of hypoxia and ischemia on microRNAs in the brain. *Current medicinal chemistry*, 22(10), 1292–1301.
<https://doi.org/10.2174/0929867322666150209154755>
60. Bandara, K. V., Michael, M. Z., & Gleadle, J. M. (2017). MicroRNA Biogenesis in Hypoxia. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 6(2), 80–96.
<https://doi.org/10.2174/2211536606666170313114821>
61. Minchenko, D. O., Kharkova, A. P., Hubenia, O. V., & Minchenko, O. H. (2013). Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRAD, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation. *Endocrine regulations*, 47(1), 15–26.
https://doi.org/10.4149/endo_2013_01_15
62. Minchenko O.H., Garmash I.A., Kovalevska O.V., Tsymbal D.O., Minchenko D.O. (2014). Expression of phosphoribosyl pyrophosphate synthetase genes in U87 glioma cells with ERN1 knockdown: effect of hypoxia and endoplasmic reticulum stress. *Ukrainian biochemical journal*, 86 (6): 74-83.
<https://doi.org/10.15407/ubj86.06.074>

63. Minchenko, O. H., Kharkova, A. P., Kubaichuk, K. I., Minchenko, D. O., Hlushchak, N. A., & Kovalevska, O. V. (2014). Effect of hypoxia on the expression of CCN2, PLA2, PLAUR, SLURP1, PLAT and ITGB1 genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 86(4), 79–89. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.079>
64. Danilovskyi, S. V., Minchenko, D. O., Moliavko, O. S., Kovalevska, O. V., Karbovskyi, L. L., & Minchenko, O. H. (2014). ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of TP53, MDM2, USP7 and PERP gene expressions in U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 86(4), 90–102. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.04.090>.
65. Minchenko, O. H., Kharkova, A. P., Minchenko, D. O., & Karbovskyi, L. L. (2015). Effect of hypoxia on the expression of IGFBP6, IGFBP7, NOV, CYR61, WISP1, and WISP2 genes in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. *Ukrainian biochemical journal*, 87(6), 52–63. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.052>
66. Minchenko, O. H., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Kovalevska, O. V., Karbovskyi, L. L., & Bikfalvi, A. (2015). Inhibition of ERN1 signaling enzyme affects hypoxic regulation of the expression of E2F8, EPAS1, HOXC6, ATF3, TBX3 and FOXF1 genes in U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 87(2), 76–87. <https://doi.org/10.15407/ubj87.02.076>.
67. Minchenko, D. O., Kharkova, A. P., Karbovskyi, L. L., & Minchenko, O. H. (2015). Expression of insulin-like growth factor binding protein genes and its hypoxic regulation in U87 glioma cells depends on ERN1 mediated signaling pathway of endoplasmic reticulum stress. *Endocrine regulations*, 49(2), 73–83. https://doi.org/10.4149/endo_2015_02_73
68. Minchenko, D. O., Kharkova, A. P., Halkin, O. V., Karbovskyi, L. L., & Minchenko, O. H. (2016). Effect of hypoxia on the expression of genes encoding insulin-like growth factors and some related proteins in U87 glioma cells without

- IRE1 function. *Endocrine regulations*, 50(2), 43–54. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0008>
69. Minchenko, O. H., Kryvdiuk, I. V., Riabovol, O. O., Minchenko, D. O., Danilovskyi, S. V., & Ratushna, O. O. (2016). Inhibition of IRE1 modifies the hypoxic regulation of GADD family gene expressions in U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 88(2), 25–34. <https://doi.org/10.15407/ubj88.02.025>
 70. Minchenko, O.H., Kryvdiuk, I.V., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O. & Halkin O.V. (2016). Inhibition of IRE1 signaling affects expression of a subset genes encoding for TNF-related factors and receptors and modifies their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endoplasmic Reticulum Stress in Diseases*, 3(1), 1-15. <https://doi.org/10.1515/ersc-2016-0001>
 71. Minchenko, O., Tsymbal, D., Minchenko, D., Riabovol, O., Halkin, O. & Ratushna, O. (2016). IRE-1 α regulates expression of ubiquitin specific peptidases during hypoxic response in U87 glioma cells. *Cell Pathology*, 3(1), 50-62. <https://doi.org/10.1515/ersc-2016-0003>
 72. Minchenko, D. O., Riabovol, O. O., Tsymbal, D. O., Ratushna, O. O., & Minchenko, O. H. (2016). Inhibition of IRE1 signaling affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endocrine regulations*, 50(3), 127–136. <https://doi.org/10.1515/enr-2016-0014>
 73. Minchenko, O. H., Riabovol, O. O., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., & Ratushna, O. O. (2016). Effect of hypoxia on the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 88(3), 54–65. <https://doi.org/10.15407/ubj88.03.054>
 74. Minchenko, O. H., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Riabovol, O. O., Ratushna, O. O., & Karbovskyi, L. L. (2016). Hypoxic regulation of the expression of cell proliferation related genes in U87 glioma cells upon inhibition of ire1 signaling

- enzyme. Ukrainian biochemical journal, 88(1), 11–21.
<https://doi.org/10.15407/ubj88.01.011>
75. Minchenko, O. H., Garmash, I. A., Minchenko, D. O., Kuznetsova, A. Y., & Ratushna, O. O. (2017). Inhibition of IRE1 modifies hypoxic regulation of G6PD, GPI, TKT, TALDO1, PGLS and RPIA genes expression in U87 glioma cells. Ukrainian biochemical journal, 89(1), 38–49.
<https://doi.org/10.15407/ubj89.01.038>
 76. Minchenko, O.H., Riabovol, O.O., Halkin O.V., Minchenko, D.O. & Ratushna O.O. (2017). ERN1-knockdown modifies hypoxic regulation of cathepsins and LONP1 genes expression in U87 glioma cells. Ukrainian biochemical journal, 89(2), 55-69. <http://jnas.nbuv.gov.ua/article/UJRN-0000740462>
 77. Minchenko, D. O., Riabovol, O. O., Ratushna, O. O., & Minchenko, O. H. (2017). Hypoxic regulation of the expression of genes encoded estrogen related proteins in U87 glioma cells: effect of IRE1 inhibition. Endocrine regulations, 51(1), 8–19. <https://doi.org/10.1515/enr-2017-0002>
 78. Minchenko, O.H., Luzina, O.Y., Hnatiuk, O.S., Minchenko, D.O., Garmash, Y.A., & Ratushna O.O. (2017). Expression of tumor growth related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells: effect of hypoxia. Ukrainian biochemical journal, 89(5), 40-51. <https://doi.org/10.15407/ubj89.05.040>
 79. Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Hnatiuk, O.S., Luzina O.Y., & Minchenko, O. H. (2017). Effect of hypoxia on the expression of a subset of proliferation related genes in IRE1 knockdown U87 glioma cells. Advances in Biological Chemistry, 7, 195-210. <https://doi.org/10.4236/abc.2017.76014>
 80. Sliusar, M.Y., Minchenko, D.O., Khita, O.O., Tsymbal, D.O., Viletska, Y.M., Luzina, O.Y., Danilovskyi, S.V., Ratushna, O.O., & Minchenko O.H. (2023). Hypoxia controls the expression of genes responsible for serine synthesis in U87MG cells on ERN1-dependent manner. Endocrine regulations, 57(4), 252-261. <https://doi.org/10.2478/enr-2023-0028>

81. Colombo, S. L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., & Moncada, S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21069–21074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117500108>
82. Drogat B, Bouchecareilh M, North S, Petibois C, Dél  ris G, Chevet E, Bikfalvi A, Moenner M. Acute L-glutamine deprivation compromises VEGF-a upregulation in A549/8 human carcinoma cells. *J Cell Physiol*. 2007; 212, 463-472. <https://doi.org/10.1002/jcp.21044>.
83. Lazo P. A. (1981). Amino acids and glucose utilization by different metabolic pathways in ascites-tumour cells. *European journal of biochemistry*, 117(1), 19–25. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06297.x>
84. Ediriweera, M. K., & Jayasena, S. (2023). The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites*, 13(3), 345. <https://doi.org/10.3390/metabo13030345>
85. Zhao, S., Cai, J., Li, J., Bao, G., Li, D., Li, Y., Zhai, X., Jiang, C., & Fan, L. (2017). Bioinformatic Profiling Identifies a Glucose-Related Risk Signature for the Malignancy of Glioma and the Survival of Patients. *Molecular neurobiology*, 54(10), 8203–8210. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0314-4>
86. Engel, A. L., Lorenz, N. I., Klann, K., M  nch, C., Depner, C., Steinbach, J. P., Ronellenfitsch, M. W., & Luger, A. L. (2020). Serine-dependent redox homeostasis regulates glioblastoma cell survival. *British journal of cancer*, 122(9), 1391–1398. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0794-x>
87. Minchenko, O. H., Sliusar, M. Y., Khita, O. O., Minchenko, D. O., Viletska, Y. M., Halkin, O. V., Levadna, L. O., Cherednychenko, A. A., & Khikhlo, Y. P. (2024). Inhibition of signaling protein ERN1 increases the sensitivity of serine synthesis gene expressions to glucose and glutamine deprivations in U87MG glioblastoma cells. *Endocrine regulations*, 58(1), 91–100. <https://doi.org/10.2478/enr-2024-0010>

88. Awale, S., Lu, J., Kalauni, S. K., Kurashima, Y., Tezuka, Y., Kadota, S., & Esumi, H. (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer research*, 66(3), 1751–1757. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3143>
89. He, Y., Fan, Q., Cai, T., Huang, W., Xie, X., Wen, Y., & Shi, Z. (2018). Molecular mechanisms of the action of Arctigenin in cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 108, 403–407. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.158>
90. Shatokhina, H. O., Khita, O. O., Minchenko, D. O., Tsymbal, D. O., Luzina, O. R., Danilovskyi, S. V., Sliusar, M. Y., Levadna, L. O., & Minchenko, O. H. (2022). ERN1 dependent impact of glutamine and glucose deprivations on the pyruvate dehydrogenase genes expression in glioma cells. *Endocrine regulations*, 56(4), 254–264. <https://doi.org/10.2478/enr-2022-0027>
91. Riabovol, O. O., Tsymbal, D. O., Minchenko, D. O., Lebid-Biletska, K. M., Sliusar, M. Y., Rudnytska, O. V., & Minchenko, O. H. (2019). Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells. *Endocrine regulations*, 53(4), 237–249. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0024>
92. Minchenko, O.H., Kharkova, A., Hnatiuk, O.S., Luzina, O.Y., Kryvdiuk, I.V., Kuznetsova, A.Y. (2018). ERN1 modifies effect of glutamine deprivation on tumor growth related factors expression in U87 glioma cells. *Ukrainian biochemical journal*, 90 (3), 49-61. <https://doi.org/10.15407/ubj90.03.049>
93. Halkin, O.V., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Telychko V.V., Ratushna, O.O., & Minchenko O.H.(2017) Expression of ubiquitin specific peptidase and ATG7 genes in U87 glioma cells upon glutamine deprivation. *Ukrainian biochemical journal*, 89 (5), 52-61. <https://doi.org/10.15407/ubj89.05.052>
94. Ratushna, O.O., Minchenko, D.O., Riabovol, O.O., Halkin, O.V., Kuznetsova, A.Y., & Minchenko O.H.(2017). IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine deprivation on the expression of a subset of proteases in U87 glioma

- cells. *Biotechnologia Acta*, 10 (4), 34-43.
<https://doi.org/10.15407/biotech10.04.034>
95. Tsymbal D.O., Minchenko D.O., Riabovol O.O., Ratushna O.O., & Minchenko O.H. (2016). IRE1 knockdown modifies glucose and glutamine deprivation effects on the expression of proliferation related genes in U87 glioma cells. *Biotechnologia Acta*, 9 (1), 26-37. <https://doi.org/10.15407/biotech9.01.026>
 96. Riabovol, O.O., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Ratushna, O.O., & Minchenko O.H. (2016). IRE1 knockdown modifies the effect of glutamine and glucose deprivations on the expression level of nuclear genes encoding mitochondrial proteins in U87 glioma cells. *Biotechnologia Acta*, 9 (2), 37-47. <https://doi.org/10.15407/biotech9.02.037>
 97. Warren A. J. (2002). Eukaryotic transcription factors. *Current opinion in structural biology*, 12(1), 107–114. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00296-8](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00296-8)
 98. Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, 172(4), 650–665.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
 99. Kant, R., Manne, R. K., Anas, M., Penugurti, V., Chen, T., Pan, B. S., Hsu, C. C., & Lin, H. K. (2022). Deregulated transcription factors in cancer cell metabolisms and reprogramming. *Seminars in cancer biology*, 86(Pt 3), 1158–1174. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.10.001>
 100. Mark, M., Rijli, F. M., & Chambon, P. (1997). Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatric research*, 42(4), 421-429. <https://doi.org/10.1203/00006450-199710000-00001>
 101. Holland, P. W., Booth, H. A., & Bruford, E. A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC biology*, 5, 47. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-47>
 102. Feng, Y., Zhang, T., Wang, Y., Xie, M., Ji, X., Luo, X., Huang, W., & Xia, L. (2021). Homeobox Genes in Cancers: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic

- Intervention. *Frontiers in oncology*, 11, 770428. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.770428>
103. de Faria Poloni, J., & Feltes, B. C. (2023). Potential role of exitron-containing homeobox genes in cancer. *WIREs mechanisms of disease*, 15(3), e1606. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1606>
 104. Cai, P., Xie, Y., Dong, M., & Zhu, Q. (2020). Inhibition of MEIS3 Generates Cetuximab Resistance through c-Met and Akt. *BioMed research international*, 2020, 2046248. <https://doi.org/10.1155/2020/2046248>
 105. Gİrgİn, B., KaradaĖ-Alpaslan, M., & KocabaŞ, F. (2020). Oncogenic and tumor suppressor function of MEIS and associated factors. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 44(6), 328–355. <https://doi.org/10.3906/biy-2006-25>
 106. Dai, X., Chen, X., Chen, W., Ou, Y., Chen, Y., Wu, S., Zhou, Q., Yang, C., Zhang, L., & Jiang, H. (2023). CircDHRS3 inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis through the circDHRS3/miR-421/MEIS2 axis. *Epigenetics*, 18(1), 2178802. <https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2178802>
 107. Wen, X., Liu, M., Du, J., & Wang, X. (2021). Meis homeobox 2 (MEIS2) inhibits the proliferation and promotes apoptosis of thyroid cancer cell and through the NF-κB signaling pathway. *Bioengineered*, 12(1), 1766–1772. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1923354>
 108. Zhu, J., Cui, L., Xu, A., Yin, X., Li, F., & Gao, J. (2017). MEIS1 inhibits clear cell renal cell carcinoma cells proliferation and in vitro invasion or migration. *BMC cancer*, 17(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3155-2>
 109. Zha, Y., Xia, Y., Ding, J., Choi, J. H., Yang, L., Dong, Z., Yan, C., Huang, S., & Ding, H. F. (2014). MEIS2 is essential for neuroblastoma cell survival and proliferation by transcriptional control of M-phase progression. *Cell death & disease*, 5(9), e1417. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.370>
 110. Li, Y., Gan, Y., Liu, J., Li, J., Zhou, Z., Tian, R., Sun, R., Liu, J., Xiao, Q., Li, Y., Lu, P., Peng, Y., Peng, Y., Shu, G., & Yin, G. (2022). Downregulation of MEIS1

- mediated by ELFN1-AS1/EZH2/DNMT3a axis promotes tumorigenesis and oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 87. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00902-6>
111. Choi, J. H., Jang, T. Y., Jeon, S. E., Kim, J. H., Lee, C. J., Yun, H. J., Jung, J. Y., Park, S. Y., & Nam, J. S. (2021). The Small-Molecule Wnt Inhibitor ICG-001 Efficiently Inhibits Colorectal Cancer Stemness and Metastasis by Suppressing MEIS1 Expression. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13413. <https://doi.org/10.3390/ijms222413413>
 112. Jiang, M., Xu, S., Bai, M., & Zhang, A. (2021). The emerging role of MEIS1 in cell proliferation and differentiation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 320(3), C264–C269. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2020>
 113. Ostendorff, H. P., Peirano, R. I., Peters, M. A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M., & Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature*, 416(6876), 99–103. <https://doi.org/10.1038/416099a>
 114. Göös, H., Kinnunen, M., Salokas, K., Tan, Z., Liu, X., Yadav, L., Zhang, Q., Wei, G. H., & Varjosalo, M. (2022). Human transcription factor protein interaction networks. *Nature communications*, 13(1), 766. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28341-5>
 115. Hamaidi, I., Coquard, C., Danilin, S., Dormoy, V., Béraud, C., Rothhut, S., Barthelmebs, M., Benkirane-Jessel, N., Lindner, V., Lang, H., & Massfelder, T. (2019). The Lim1 oncogene as a new therapeutic target for metastatic human renal cell carcinoma. *Oncogene*, 38(1), 60–72. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0413-y>
 116. Xie, T., Du, K., Liu, W., Liu, C., Wang, B., Tian, Y., Li, R., Huang, X., Lin, J., Jian, H., Zhang, J., & Yuan, Y. (2022). LHX2 facilitates the progression of nasopharyngeal carcinoma via activation of the FGF1/FGFR axis. *British journal of cancer*, 127(7), 1239–1253. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01902-7>

117. Miyashita, K., Kitajima, K., Goyama, S., Kitamura, T., & Hara, T. (2018). Overexpression of Lhx2 suppresses proliferation of human T cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells, partly by reducing LMO2 protein levels. *Biochemical and biophysical research communications*, 495(3), 2310–2316. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.135>
118. Li, X., Zhou, Y., Wen, P., Yuan, Y., Xiao, Z., Shi, H., & Zhou, H. (2022). Tumor suppressor LHX6 upregulation contributes to the inhibitory effect of miR-346 knockdown on colorectal cancer cell growth. *Environmental toxicology*, 37(3), 435–445. <https://doi.org/10.1002/tox.23410>
119. Yan, L., Cai, K., Sun, K., Gui, J., & Liang, J. (2018). MiR-1290 promotes proliferation, migration, and invasion of glioma cells by targeting LHX6. *Journal of cellular physiology*, 233(10), 6621–6629. <https://doi.org/10.1002/jcp.26381>
120. Wang, Y., Tang, Y., Li, J., Wang, D., & Li, W. (2021). Human sperm-associated antigen 4 as a potential prognostic biomarker of lung squamous cell carcinoma. *The Journal of international medical research*, 49(7), 3000605211032807. <https://doi.org/10.1177/03000605211032807>
121. Zhao, J., Liu, B., Yang, J. A., Tang, D., Wang, X., & Chen, Q. (2019). Human sperm-associated antigen 4 as a potential biomarker of glioblastoma progression and prognosis. *Neuroreport*, 30(6), 446–451. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001226>
122. Ji, Y., Jiang, J., Huang, L., Feng, W., Zhang, Z., Jin, L., & Xing, X. (2018). Sperm-associated antigen 4 (SPAG4) as a new cancer marker interacts with Nesprin3 to regulate cell migration in lung carcinoma. *Oncology reports*, 40(2), 783–792. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6473>
123. Matsuda, C., Ishii, K., Nakagawa, Y., Shirai, T., Sasaki, T., Hirokawa, Y. S., Iguchi, K., & Watanabe, M. (2023). Fibroblast-derived exosomal microRNA regulates NKX3-1 expression in androgen-sensitive, androgen receptor-dependent prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 124(8), 1135–1144. <https://doi.org/10.1002/jcb.30435>

124. Qian, D., Zheng, W., Chen, C., Jing, G., & Huang, J. (2020). Roles of CCNB2 and NKX3-1 in Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 35(3), 208–213. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3016>
125. He, J., Wang, J., Li, S., Li, T., Chen, K., & Zhang, S. (2020). Hypoxia-inhibited miR-338-3p suppresses breast cancer progression by directly targeting ZEB2. *Cancer science*, 111(10), 3550–3563. <https://doi.org/10.1111/cas.14589>
126. Fardi, M., Alivand, M., Baradaran, B., Farshdousti Hagh, M., & Solali, S. (2019). The crucial role of ZEB2: From development to epithelial-to-mesenchymal transition and cancer complexity. *Journal of cellular physiology*, 234(9), 14783–14799. <https://doi.org/10.1002/jcp.28277>
127. Kong, L., Yu, Y., Guan, H., Jiang, L., Sun, F., Li, X., Huang, W., & Li, B. (2021). TGIF1 plays a carcinogenic role in esophageal squamous cell carcinoma through the Wnt/ β -catenin and Akt/mTOR signaling pathways. *International journal of molecular medicine*, 47(5), 77. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4910>
128. Stürken, C., Möbus, V., Milde-Langosch, K., Schmatloch, S., Fasching, P. A., Rüschoff, J., Stickeler, E., Henke, R. P., Denkert, C., Hanker, L., Schem, C., Vladimirova, V., Karn, T., Nekljudova, V., Köhne, C. H., Marmé, F., Schumacher, U., Loibl, S., & Müller, V. (2021). TGFB-induced factor homeobox 1 (TGIF) expression in breast cancer. *BMC cancer*, 21(1), 920. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08656-0>
129. Mascarenhas, J. B., Young, K. P., Littlejohn, E. L., Yoo, B. K., Salgia, R., & Lang, D. (2009). PAX6 is expressed in pancreatic cancer and actively participates in cancer progression through activation of the MET tyrosine kinase receptor gene. *The Journal of biological chemistry*, 284(40), 27524–27532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047209>
130. Li, X., Yang, L., Shuai, T., Piao, T., & Wang, R. (2016). MiR-433 inhibits retinoblastoma malignancy by suppressing Notch1 and PAX6 expression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 82, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.003>

131. Wang, D., Jin, X., Lei, M., Jiang, Y., Liu, Y., Yu, F., Guo, Y., Han, B., Yang, Y., Sun, W., Liu, Y., Zeng, G., Liu, F., Hu, J., & Chen, X. (2022). USF1-ATRAP-PBX3 Axis Promote Breast Cancer Glycolysis and Malignant Phenotype by Activating AKT/mTOR Signaling. *International journal of biological sciences*, 18(6), 2452–2471. <https://doi.org/10.7150/ijbs.69134>
132. Wang, S., Li, C., Wang, W., & Xing, C. (2016). PBX3 promotes gastric cancer invasion and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncology letters*, 12(5), 3485–3491. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5305>
133. Khumukcham, S. S., & Manavathi, B. (2021). Two decades of a protooncogene HPIP/PBXIP1: Uncovering the tale from germ cell to cancer. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1876(1), 188576. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188576>
134. van Vuurden, D. G., Aronica, E., Hulleman, E., Wedekind, L. E., Biesmans, D., Malekzadeh, A., Bugiani, M., Geerts, D., Noske, D. P., Vandertop, W. P., Kaspers, G. J., Cloos, J., Würdinger, T., & van der Stoop, P. P. (2014). Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 is overexpressed in astrocytoma and promotes tumor cell growth and migration. *Neuro-oncology*, 16(7), 946–959. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not308>
135. Gao, J., Ma, K., Zhang, L., Li, T., Zhao, B., & Jiang, Y. (2022). Paired related homeobox 1 attenuates autophagy via acetyl-CoA carboxylase 1-regulated fatty acid metabolism in salivary adenoid cystic carcinoma. *FEBS open bio*, 12(5), 1006–1016. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13367>
136. Zhang, W. L., Wang, S. S., Jiang, Y. P., Liu, Y., Yu, X. H., Wu, J. B., Wang, K., Pang, X., Liao, P., Liang, X. H., & Tang, Y. L. (2020). Fatty acid synthase contributes to epithelial-mesenchymal transition and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma through PRRX1/Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(19), 11465–11476. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15760>
137. Minchenko, A., & Caro, J. (2000). Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia

- responsive element. *Molecular and cellular biochemistry*, 208(1-2), 53–62.
<https://doi.org/10.1023/a:1007042729486>
138. Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., & Caro, J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *The Journal of biological chemistry*, 277(8), 6183–6187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110978200>
139. Semenza G. L. (2017). A compendium of proteins that interact with HIF-1 α . *Experimental cell research*, 356(2), 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.041>
140. Wang, L., Zhou, Y., Cao, C., Lin, S., Zhi, W., Zhang, D., Li, J., Wei, R., Jiang, G., Xu, H., Wang, X., Xi, L., & Wu, P. (2022). The exon 12-containing LHX6 isoforms promote cervical cancer cell proliferation by regulating the MAPK signaling pathway. *Cancer medicine*, 11(19), 3657–3673.
<https://doi.org/10.1002/cam4.4734>
141. Liang, T. S., Zheng, Y. J., Wang, J., Zhao, J. Y., Yang, D. K., & Liu, Z. S. (2019). MicroRNA-506 inhibits tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma through the inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by down-regulating LHX2. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 38(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1023-4>
142. Ren, D., Wang, M., Guo, W., Huang, S., Wang, Z., Zhao, X., Du, H., Song, L., & Peng, X. (2014). Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. *Cell and tissue research*, 358(3), 763–778.
<https://doi.org/10.1007/s00441-014-2001-y>
143. Huang, B. S., Luo, Q. Z., Han, Y., Li, X. B., Cao, L. J., & Wu, L. X. (2013). microRNA-223 promotes the growth and invasion of glioblastoma cells by targeting tumor suppressor PAX6. *Oncology reports*, 30(5), 2263–2269.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2683>

144. Ma, B., Ma, J., Yang, Y., He, X., Pan, X., Wang, Z., & Qian, Y. (2020). Effects of miR-330-3p on Invasion, Migration and EMT of Gastric Cancer Cells by Targeting PRRX1-Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *OncoTargets and therapy*, 13, 3411–3423. <https://doi.org/10.2147/OTT.S238665> (Retraction published *Onco Targets Ther.* 2024 Apr 05;17:299-300)
145. Lee, Y. J., Kang, C. W., Oh, J. H., Kim, J., Park, J. P., Moon, J. H., Kim, E. H., Lee, S., Kim, S. H., Ku, C. R., & Lee, E. J. (2021). Downregulation of miR-216a-5p and miR-652-3p is associated with growth and invasion by targeting JAK2 and PRRX1 in GH-producing pituitary tumours. *Journal of molecular endocrinology*, 68(1), 51–62. <https://doi.org/10.1530/JME-21-0070>
146. He, Y., Zheng, L., Yuan, M., Fan, J., Rong, L., Zhan, T., & Zhang, J. (2022). Exosomal circPRRX1 functions as a ceRNA for miR-596 to promote the proliferation, migration, invasion, and reduce radiation sensitivity of gastric cancer cells via the upregulation of NF- κ B activating protein. *Anti-cancer drugs*, 33(10), 1114–1125. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001358>
147. Dong, C. G., Wu, W. K., Feng, S. Y., Wang, X. J., Shao, J. F., & Qiao, J. (2012). Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. *International journal of oncology*, 41(3), 1005–1012. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1542>
148. Hu, X., Chen, D., Cui, Y., Li, Z., & Huang, J. (2013). Targeting microRNA-23a to inhibit glioma cell invasion via HOXD10. *Scientific reports*, 3, 3423. <https://doi.org/10.1038/srep03423>
149. Huang, X., Wang, Z., Hou, S., Yue, C., Li, Z., Hu, W., & Lu, H. (2022). Long non-coding RNA DSCAM-AS1 promotes pancreatic cancer progression via regulating the miR-136-5p/PBX3 axis. *Bioengineered*, 13(2), 4153–4165. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2016326>
150. Cheng, B., Zhang, Y., Wu, Z. W., Cui, Z. C., & Li, W. L. (2020). MiR-144 inhibits colorectal cancer cell migration and invasion by regulating PBX3. *European*

- review for medical and pharmacological sciences, 24(18), 9361–9369. https://doi.org/10.26355/eurrev_202009_23019
151. Ooki, A., Dinalankara, W., Marchionni, L., Tsay, J. J., Goparaju, C., Maleki, Z., Rom, W. N., Pass, H. I., & Hoque, M. O. (2018). Epigenetically regulated PAX6 drives cancer cells toward a stem-like state via GLI-SOX2 signaling axis in lung adenocarcinoma. *Oncogene*, 37(45), 5967–5981. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0373-2>
 152. Chen, H. Q., Zhao, J., Li, Y., Huang, Y. J., Chen, D. J., He, L. X., Wang, L. Q., Zheng, C. F., Wang, J., Cao, J., Shu, W. Q., Liu, J. Y., & Liu, W. B. (2019). Epigenetic inactivation of LHX6 mediated microcystin-LR induced hepatocarcinogenesis via the Wnt/ β -catenin and P53 signaling pathways. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 252(Pt A), 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.049>
 153. Kim, S. H., Lim, K. H., Yang, S., & Joo, J. Y. (2021). Long non-coding RNAs in brain tumors: roles and potential as therapeutic targets. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01088-0>
 154. DeSouza, P. A., Qu, X., Chen, H., Patel, B., Maher, C. A., & Kim, A. H. (2021). Long, Noncoding RNA Dysregulation in Glioblastoma. *Cancers*, 13(7), 1604. <https://doi.org/10.3390/cancers13071604>
 155. Lu, C., Wei, Y., Wang, X., Zhang, Z., Yin, J., Li, W., Chen, L., Lyu, X., Shi, Z., Yan, W., & You, Y. (2020). DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Molecular cancer*, 19(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1137-5>
 156. Roh, J., Im, M., Kang, J., Youn, B., & Kim, W. (2023). Long non-coding RNA in glioma: novel genetic players in temozolomide resistance. *Animal cells and systems*, 27(1), 19–28. <https://doi.org/10.1080/19768354.2023.2175497>
 157. Shahzad, U., Krumholtz, S., Rutka, J. T., & Das, S. (2021). Noncoding RNAs in Glioblastoma: Emerging Biological Concepts and Potential Therapeutic Implications. *Cancers*, 13(7), 1555. <https://doi.org/10.3390/cancers13071555>

- 158.Minchenko O, Opentanova I, Minchenko D, Ogura T, & Esumi H. (2004). Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Letters*, 576, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.053>
- 159.Rudnytska OV, Khita OO, Minchenko, Tsymbal DO, Yefimova YV, Sliusar MY, & Minchenko OH. (2021). The low doses of SWCNTs exhibit a genotoxic effect on the normal human astrocytes by disrupting the functional integrity of the genome. *Curr Res Toxicol*, 2, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2021.02.001>
- 160.Krasnytska D.A., Khita O.O., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Halkin O.V., Rudnytska O.V., Hoian S.L., Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. *Endocr Reg.* 2024, 58(1): 47-56. doi:10.2478/enr-202 4-0006.
- 161.Iovino M, Colonval M, Wilkin C, L'homme L, Lassence C, Campas M, Peulen O, de Tullio P, Piette J, & Legrand-Poels S. (2023). Novel XBP1s-independent function of IRE1 RNase in HIF-1alpha-mediated glycolysis upregulation in human macrophages upon stimulation with LPS or saturated fatty acid. *Front Immunol*, 14, 1204126. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1204126>.
- 162.Knaup KX, Monti J, Hackenbeck T, Jobst-Schwan T, Klanke B, Schietke RE, Wacker I, Behrens J, Amann K, Eckardt KU, Warnecke C, & Wiesener MS. (2014). Hypoxia regulates the sperm associated antigen 4 (SPAG4) via HIF, which is expressed in renal clear cell carcinoma and promotes migration and invasion in vitro. *Mol Carcinog*, 53(12), 970-978. <https://doi.org/10.1002/mc.22065>.
- 163.Krasnytska D.A., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Oksiom N.S., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on *PBX3*, *PBXIP1*, *PAX6*, *MEIS1*, and *MEIS2* gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2023, 57 (1): 37-47. doi:10.2478/enr-2023-0005.
- 164.Krasnytska D.A., Khita O.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Bezrodnyi B.H., Minchenko D.O. The impact of

glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2022, 56, 38-47. doi:10.2478/enr-2022-0005.

165. Minchenko D.O., Krasnytska D.A., Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Hoian S.L., Minchenko O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. *J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia.* 2023, 1:1-10. doi:10.59657/jedr.brs.23.004.

Додаток 1

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Tsymbal D.O., Luzina O.Y., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Bezrodny B.H., Minchenko D.O. The impact of glutamine deprivation on the expression of *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1*, *LHX2*, and *LHX6* genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2022, 56 (1): 38-47. doi:10.2478/enr-2022-0005. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *MEIS3*, *SPAG4*, *LHX1* та *LHX6*, обробка даних та участь у написанні статті). Анастасія Чередниченко і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS3*. Дарія Цимбал, Ольга Лузіна, Дмитро Мінченко, Галина Козинкевич та Борис Безродний приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

2. **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Minchenko D.O., Khita O.O., Tsymbal D.O., Cherednychenko A.A., Kozynkevych H.E., Oksiom N.S., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on *PBX3*, *PBXIP1*, *PAX6*, *MEIS1*, and *MEIS2* gene expressions in U87 glioma cells. *Endocr Reg.* 2023, 57 (1): 37-47. doi:10.2478/enr-2023-0005. (Особистий внесок здобувача –

дослідження експресії генів *MEIS1*, *TBXIP1*, *TBX3*, *PAX6* і *MEIS2*, обробка даних та участь у написанні статті). Анастасія Чередниченко, Наталія Оксіом і Олена Хіта допомагали у вивченні експресії гена *MEIS2*. Дарія Цимбал, Юлія Вілецька, Дмитро Мінченко та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

Scopus i PubMed

3. Minchenko D.O., **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Rudnytska O.V., Kozynkevych H.E., Hoian S.L., Minchenko O.H. Knockdown of ERN1 modifies the impact of glutamine deprivation on *TGIF1*, *ZEB2*, *NKX3-1*, *PRRX1*, and *SLC1A5* gene expressions in U87 glioblastoma cells. J Endocr Diabetes Res, BioRes Scientia. 2023, 1:1-10. doi:10.59657/jedr.brs.23.004. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *TGIF1*, *ZEB2*, *PRRX1* та *SLC1A5*, обробка даних та участь у написанні статті). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *NKX3-1*, *PRRX1* та *SLC1A5*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Галина Козинкевич приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку.

4. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Viletska Y.M., Minchenko D.O., Halkin O.V., Rudnytska O.V., Hoian S.L., Minchenko O.H. ERN1 knockdown modifies the hypoxic regulation of homeobox gene expression in U87MG glioblastoma cells. Endocr Reg. 2024, 58(1): 47-56. doi:10.2478/enr-2024-0006. (Особистий внесок здобувача – дослідження експресії генів *MEIS1*, *MEIS2*, *MEIS3*, *LHX6* і *SPAG4*, обробка даних та участь у написанні статті). Софія Гоян і Дмитро Мінченко допомагали у вивченні експресії генів *MEIS3* та *LHX6*. Олена Хіта, Юлія Вілецька, Ольга Рудницька та Олег Галкін приймали участь в обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку. Олександр Мінченко керував проведенням досліджень і представляв статтю до друку. **Scopus i PubMed**

5. **Krasnytska D.A.**, Khita O.O., Minchenko D.O., Viletska Y.M., Minchenko O.H. ERN1 dependent impact of glucose and glutamine deprivations on homeobox gene expressions in ERN1 knockdown glioma cells. FEBS-IUBMB-ENABLE 1st Int. Mol. Biosciences PhD and Postdoc Conference, 16-18 Nov, 2022, The Institute of Biomedicine of Seville, Spain, 2022: 118.

6. **Krasnytska D.A.**, Minchenko D.O., Khita O.O., Minchenko O.H. Glutamine deprivation effect on the expression of homeobox genes in ERN1 knockdown U87 glioma cells. 4th RECOOP Int. Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sci. Conf., April 6-9, 2022, Prague, Czech Republic: 133.

7. **Красницька Д.**, Слюсар М., Галкін О., Мінченко О. Залежна від стресу ендоплазматичного ретикулума регуляція експресії генів транскрипційних факторів родини Номеобок у клітинах гліоми. 6-а Міжнародна наукова конференція “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, Дніпро, 6-7.10, 2022. Дніпро, вид. “Ліра”, 2022: 33-34.

8. Minchenko D.O., Khita O.O., Sliusar M.Y., **Krasnytska D.A.**, Viletska Y.M., Cherednychenko A.A., Khikhlo Y., Minchenko O.H. Hydrocortisone modifies the impact of tunicamycin, thapsigargin, and hypoxia on the expression of ATF3 and other transcription factors in normal human astrocytes and U87MG cells. 1-st International meeting of the Enlight Cancer network “Enlight Cancer Days”, September 28-29, 2023. BRIC, Bordeaux University; Talence, France, 2023: 73.

9. **Krasnytska D.A.**, Sliusar M.Y., Minchenko O.H. ERN1 inhibition modifies the hypoxic regulation of the expression of homeobox genes in U87MG glioblastoma cells. Abstract book of the Bukovinian International Medical Congress 2024, BIMCO Journal, Chernivtsi, 2024: 110.