

Д.О. Мінченко, К.І. Кубайчук, О.В. Губеня, І.В. Кривдюк, Є.В. Хоменко,  
Р.М. Герасименко, Р.В. Сулік, Н.К. Мурашко, О.Г. Мінченко

## Стрес ендоплазматичного ретикулума та ангіогенез

*Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) – надзвичайно чутлива до змін гомеостазу внутрішньоклітинна органела, що проводить дуже точний контроль якості протеїнів, які проходять тут процес згорання і дозрівання перед переходом їх до апарату Гольджі, причому всі незгорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються й обов'язково знищуються. А тому реакція клітин на незгорнуті в ЕР протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і називається стресом ЕР. Цей стрес є фундаментальним явищем, що надійно захищає клітини від дії різноманітних чинників. Він забезпечує широкий спектр протікання різних фізіологічних процесів розвитку та метаболізму, особливо у деяких спеціалізованих клітинах з високим рівнем синтезу секреторних протеїнів, зокрема таких, як  $\beta$ -клітини, гепатоцити та остеобласти і є необхідним протягом усього життя. Стрес ЕР, як і гіпоксія – обов'язкові компоненти злоякісного росту, вони тісно взаємодіють і контролюють процеси росту та метаболізму, активуючи ангіогенез. Цей стрес опосередковується трьома сенсорно-сигнальними шляхами (PERK, ATF6 та ERN1), причому виключення функції одного з них (ERN1) призводить до зниження інтенсивності росту пухлин за допомогою пригнічення ангіогенезу та процесів проліферації. Аналізуються дані про взаємозв'язок функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 і експресії про- та антиангіогенних генів.*

*Ключові слова: стрес ендоплазматичного ретикулума, ангіогенез, гіпоксія, експресія генів, ERN1, HIF, проліферація.*

### ВСТУП

Детальне вивчення молекулярних механізмів регуляції основних метаболічних циклів і різноманітних процесів як на рівні клітин, так і на рівні організму, ідентифікація окремих ключових факторів сигнальної мережі, відповідальних за ініціацію тих чи інших патологічних процесів, – надзвичайно актуальний напрямок фундаментальних досліджень у біохімії, молекулярній фізіології та інших медико-біологічних науках. Сигнальна мережа клітин представлена численними транскрипційними факторами, протеїнкіназами та протеїнфосфатазами, які є основною складовою регуляторних каскадів клітин і відіграють надзвичайно важливу роль у динамічних механізмах регуляції біохімічних процесів як у нормі, так і за різних патологічних станів.

Протягом останнього десятиліття досить інтенсивно вивчаються молекулярні механізми стресу ендоплазматичного ретикулума (ЕР), як фундаментального явища захисту клітин від дії різноманітних чинників, а також при зміні внутрішньоклітинного та позаклітинного гомеостазу, як і його фізіологічної ролі у протіканні певних процесів у деяких спеціалізованих клітинах, пов'язаних з синтезом великої кількості протеїнів для секреції [16, 33, 78, 98]. Але стрес ЕР задіяний також у розвитку багатьох патологій, зокрема, він є облігатним фактором росту злоякісних пухлин і причетний до розвитку інсулінорезистентності [16, 33, 90].

Велика кількість біохімічних та фізіологічних стимулів, зокрема порушення кальцієвого гомеостазу, оксидативний стрес, підвищений синтез секреторних протеїнів,

© Д.О. Мінченко, К.І. Кубайчук, О.В. Губеня, І.В. Кривдюк, Є.В. Хоменко, Р.М. Герасименко, Р.В. Сулік, Н.К. Мурашко, О.Г. Мінченко

експресія неправильно згорнутих протеїнів, дефіцит глюкози, зміни у глікозилюванні протеїнів або підвищення вмісту холестеролу можуть порушувати гомеостаз ЕР, в результаті чого в його люмені накопичуються незгорнуті або неправильно згорнуті протеїни і розвивається стрес [75, 78, 90].

Велика частина протеїнів після синтезу в цитоплазмі переміщується до ЕР, а це переважно мембранні протеїни та ті, що секретуються, де за допомогою молекулярних шаперонів відбувається їх дозрівання та згортання (фолдинг) до нативної конформації, причому котрансляційні та посттрансляційні модифікації протеїнів, включаючи формування в них дисульфідних містків та N-глікозилювання. Ці посттрансляційні модифікації протеїнів є важливими для їх структури та активності і відіграють значну роль у згортанні протеїнів та формуванні олігомерних комплексів [16, 46, 76]. ЕР забезпечує високоякісний контроль за дозріванням і згортанням трансмембранних і секреторних протеїнів, а тому лише правильно згорнуті протеїни можуть бути транспортовані за межі ЕР, тоді як незгорнуті чи неправильно згорнуті залишаються в ЕР і знищуються [78].

Розвиток стресу ЕР у результаті накопичення в його каналцях незгорнутих протеїнів або протеїнів з помилковою конформацією призводить не лише до зниженого надходження нових протеїнів, а і до посиленої деградації незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [16]. Крім того, стрес ЕР є відповідальним також і за загальне зниження ініціації трансляції на тлі вибіркової трансляції певних мРНК, що кодують синтез залежних від стресу протеїнів [13, 64]. Таким чином, функція стресу ЕР полягає саме у реорганізації метаболічних процесів у клітині для забезпечення їх виживання або знищення клітин через апоптоз у разі наявності незворотних змін [46, 83]. Більше того, реакція клітин на накопичення в ЕР незгорнутих чи помилково згорнутих протеїнів є також дуже важливою реакцією саме для збереження

функціональної його цілості та попережджує розвиток оксидативного стресу [34].

Таким чином, за наявності змін гомеостазу в люмені ЕР порушується згортання протеїнів, а це активує основні сигнальні каскади у ньому, що називається реакцією на незгорнуті протеїни або стресом ЕР. Цей стрес розпізнається трьома основними спеціалізованими сенсорно-сигнальними системами, які розпочинаються з люмену ЕР, де локалізується їх сенсорна частина, і досягають цитоплазми та ядра: PERK (PRK-like ER kinase; подібна до PRK кіназа ЕР), ERN1 (Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1; від ЕР до ядра 1), ензим, який ще називається IRE1 (Inositol Requiring Enzyme-1; залежний від інозитулу ензим-1) та ATF6 (Activating Transcription Factor 6; активуючий транскрипційний фактор 6), але ERN1 є найбільш важливою сенсорно-сигнальною системою стресу ЕР [46, 75, 76, 90].

**Основні сенсорно-сигнальні системи стресу ЕР.** Три основні сенсорно-сигнальні системи стресу ЕР представлені трансмембранними ензимами та транскрипційним фактором, які локалізовані таким чином, що їх сенсорна частина знаходиться в люмені та взаємодіє з шаперонами, основним із яких є HSPA5 (70 кДа протеїн 5 теплового шоку), відомий також як BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein; протеїн, що зв'язується з тяжким ланцюгом імуноглобулінів) або GPR78 (протеїн 78, що регулюється глюкозою) [5, 8]. Шаперон BiP функціонує як негативний регулятор усіх трьох сенсорно-сигнальних ензимів стресу ЕР, оскільки він є асоційованим з усіма трьома сигнальними системами за нормальних умов і відщеплюється від них лише за появи в ньому незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [8].

Таким чином, шаперон HSPA5 забезпечує одночасну негативну регуляцію роботи всіх трьох сигнальних шляхів відповіді на порушення фолдингу протеїнів [8]. Варто відмітити, що за умов стресу ЕР у клітинах запускаються процеси, які спрямовані на регуляцію роботи різних шаперонів. Пока-

зано підвищений рівень експресії шаперону HSPA5 у більшості злоякісних пухлин, що робить його цікавою мішенню для розробки нових і перспективних способів протипухлинної терапії [5,43].

На рис. 1 схематично зображена реакція клітин на стрес ЕР, яка необхідна клітині для пошуку можливих шляхів виходу зі стану стресу, зумовленого накопиченням незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів, і яка опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами, що починаються в люмені ЕР за умов накопичення в ньому незгорнутих протеїнів і закінчуються у цитоплазмі та ядрі [6, 84]. Індукція стресу ЕР призупиняє входження до нього *de novo* синтезованих протеїнів і сприяє як правильному згортанню протеїнів, що уже знаходяться в ньому, так і деградації неправильно згорнутих протеїнів, для виживання клітин за умов дії на них чинників, що індукують цей стрес, або смерті клітин через систему апоптозу, асоційовану з ЕР [84].

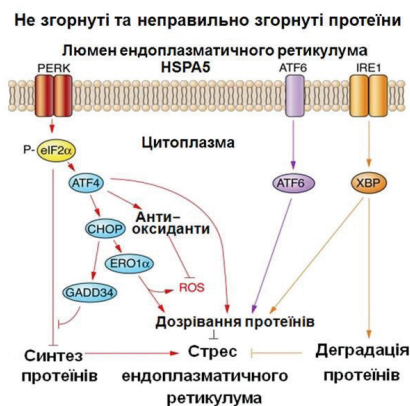


Рис. 1. Основні сенсорно-сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулула (PERK, ATF6 та IRE1), що починаються в його люмені за умов накопичення в ньому незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів і ініціюють тотальну репресію ініціації трансляції, фосфорилуючи  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 (EIF2A), та активацію транскрипції стресозалежних генів шляхом утворення активної форми транскрипційних факторів ATF6 та ATF4, а також альтернативного сплайс-варіанта транскрипційного фактора XBP1 (X-бокс протеїн-1), що контролює експресію сотень генів [17]

Всі три сенсорно-сигнальні ензими стресу ЕР мають трансмембранний домен, що закріплює їх у його мембрані, а також цитоплазматичний домен, який має ензиматичну активність або являє собою транскрипційний фактор, що відіграє роль передачі сигналів з люмену ЕР до з'єднаних з ними сигнальних каскадів цитоплазми та ядра [13, 16, 74, 85].

Сенсорно-сигнальний шлях PERK представлений протеїнкіназою ЕР, подібною до протеїнкінази, що активується дволанцюговою РНК (PRK кінрази; double stranded RNA activated protein kinase) [74]. Протеїнкіназа PERK являє собою кінразу 3  $\alpha$ -субодиниці фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (EIF2AK3; eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3), яка інактивує  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції 2 еукаріот (EIF2A), фосфорилуючи її. Підвищена активність протеїнкінази PERK за дії стресу ЕР призводить до тотальної блокади біосинтезу протеїнів у клітинах швидким пригніченням ініціації трансляції мРНК, а, відповідно, і до зниженого надходження синтезованих протеїнів до ЕР для їх подальшого фолдингу та дозрівання [74].

І хоча фосфорильована форма фактора EIF2A забезпечує тотальне пригнічення трансляції мРНК на рибосомах, біосинтез деяких протеїнів при цьому істотно зростає. Це стосується тих протеїнів, що індукуються сигнальними шляхами стресу ЕР для їх участі у нормалізації фолдингу та дозрівання протеїнів у ньому, а також розщепленні неправильно згорнутих протеїнів. До цих протеїнів відноситься і транскрипційний фактор ATF4 (активуючий транскрипційний фактор 4), який індукується протеїнкіназою PERK і відіграє важливу роль у регуляції багатьох процесів, у тому числі і у диференціації остеобластів та утворенні кістки за допомогою активації експресії необхідних для остеогенезу генів [74].

Більше того, активація експресії транскрипційного фактора ATF4 за умов стресу ЕР, що опосередкована сенсорно-сигнальною

системою PERK, виявилася досить важливою як для росту різних злоякісних пухлин, так і для їх резистентності до гіпоксії [10, 23]. Так, нещодавно було показано, що фосфорилування EIF2A призводить до зниження індукованого статинами апоптозу за допомогою пригнічення стабілізації та транслокації TP53 (Tumor Protein 53; протеїн пухлин 53) до мітохондрій [45]. Крім того, було виявлено, що кіназа фактора EIF2A задіяна в індукції саліцилатом натрію апоптозу та залежних від стресу ER генів [24]. Таким чином, реакція клітин на стрес ER, що опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами, є необхідною клітині для пошуку можливих шляхів виходу із стану стресу, зумовленого накопиченням незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у люмені ER [50].

Активованій стресом ER синтез транскрипційного фактора ATF4 також посилює експресію низки інших генів, включаючи GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34; протеїн 34, який індукується при пошкодженні ДНК і зупиняє ріст) та CHOP (протеїн, гомологічний C/EBP), що називається ще DDIT3 або GADD153. Протеїн CHOP є транскрипційним фактором, що відноситься до родини протеїнів, які зв'язуються з енхансером CCAAT (C/EBP), причому він виконує функцію домінантнегативного інгібітора при формуванні гетеродимерів з іншими членами родини C/EBP. Зокрема, це стосується C/EBPA та LAP (активаторний протеїн печінки). Протеїн CHOP попереджує їх зв'язування з ДНК, що є важливим у регуляції адипогенезу та еритропоезу і сприяє апоптозу [14, 82]. Більше того, транскрипційний комплекс CHOP-C/EBPA пригнічує експресію гена SLC29A1 і транспорт адеозину в ендотеліальних клітинах судин за діабету вагітних через NO-залежний шлях [21]. Встановлено також, що індукція експресії CHOP за стресу ER пригнічується при взаємодії подібних до TOLL-рецепторів (TLR) 3 або 4 з TRIF-залежним сигнальним шляхом [87].

Протеїн GADD34 – регуляторна (інгібіторна) субодиниця 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A), яка є серин/треоніною протеїнфосфатазою і дефосфорилує  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції EIF2A/EIF2S1 [14, 50]. Саме таким чином PPP1R15A знімає виключення ініціації синтезу протеїнів, індукованого стрес-залежними кіназами, та опосередковує вихід клітини зі стресу.

Більше того, протеїнфосфатаза 1 може блокувати сигнальний шлях TGFB1, дефосфорилуючи його. Транскрипційний фактор ATF4 може також активувати апоптоз, індуюючи фосфорилування TP53 по Ser-15, та експресію гена ERO1 $\alpha$ , який відповідає за продукцію активних форм кисню (ROS) і при цьому сприяє згортанню протеїнів. Було також встановлено, що Т-кадгерин істотно послаблює PERK сигнальний шлях стресу ER і таким чином захищає ендотеліальні клітини судин від індукції апоптозу, індукованого цим стресом [42].

Сенсорно-сигнальний шлях стресу ER ATF6 представлений трансмембранним попередником транскрипційного фактора ATF6, який при індукції стресу переходить до апарату Гольджі, де розщеплюється протеазами S1P (site-1-protease, сайт-1-протеаза) та S2P (site-2-protease, сайт-2-протеаза) з утворенням розчинної форми ATF6. Ця форма відповідає за регуляцію транскрипції низки залежних від стресу ER генів, причому ATF6 може працювати як окремо, так і синергічно з іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу [16, 34, 50, 84].

Сенсорно-сигнальний шлях ERN1 представлений біфункціональним трансмембранним ферментом, який має сенсорну частину, локалізовану в люмені ER, а також трансмембранний домен і цитоплазматичну частину з двома ферментативними активностями: серин/треоніною кінази та ендорибонуклеази, що зображено на рис. 2.

За індукції стресу ER активується кіназа, яка аутофосфорилує ERN1, в результаті чого відбувається його активація та димери-

зачія в його мембрані [36, 46, 91]. Основна функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вирізанні короткого фрагмента з кодуєчої частини мРНК транскрипційного фактора ХВР1 (протеїн-1, що зв'язується з Х-боксом), в результаті чого утворюється вкорочений альтернативний сплайс-варіант мРНК ХВР1 (ХВР1s), який кодує синтез більшого за розміром транскрипційного фактора зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця внаслідок порушення рамки зчитування. Саме цей альтернативний сплайс-варіант відповідальний за регуляцію експресії декількох сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також деградації неправильно згорнутих протеїнів [2, 84].

Інша функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вибіркового розщепленні (деградації) певних мРНК за умов стресу ЕР, що мабуть є надзвичайно важливим у виключенні певних сигнальних шляхів, які можуть заважати виходу клітини зі стану стресу [29]. Таким чином, для активації ендорибонуклеази необхідною умовою є аутофосфорилування ERN1 кіназою цього біфункціонального ензиму і його димеризація, але є дані про те, що пригнічення кінази за допомогою специфічного інгібітора активує ендорибонуклеазу і забезпечує клітині протікання найважливіших метаболічних змін для

виходу ЕР із стресового стану [26, 27]. Більше того, якщо його гомеостаз не відновлюється, то запускається шлях апоптозу для знищення клітин, причому у переключенні на апоптоз вирішальну роль відіграє саме ERN1-сигнальний шлях, ендорибонуклеаза якого вибірково розщеплює певні мРНК, зокрема шаперонів, що є одним із пускових механізмів апоптотичної смерті клітин [26, 89]. Водночас високий рівень експресії шаперонів у клітинах злоякісних пухлин значною мірою відповідає за життєздатність пухлинних клітин у результаті пригнічення апоптозу [5, 43].

Недавно було показано, що біфункціональний сенсорно-сигнальний ензим ERN1 має ще одну надзвичайно важливу функцію. Так, було встановлено, що пептиди, які утворюються при розщепленні цього сигнального ензиму мають унікальні властивості і здатні модулювати активність ензиму ERN1, захищаючи клітини від стресу ЕР [12].

**Роль стресу ЕР в ангиогенезі та рості злоякісних пухлин.** Підвищена активність ЕР у процесах згортання, дозрівання та транспорту протеїнів є необхідною умовою злоякісного росту, що асоціюється з гіпоксією, зумовленою, з одного боку, зниженим споживанням кисню, а з іншого – індукцією залежного від гіпоксії фактора HIF через сигнальні шляхи стресу ЕР [19,23, 93]. Але гіпоксія – також важливий фактор росту злоякісних пухлин і також сильний індуктор накопичення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів у ретикулумі та активації відповідних сенсорно-сигнальних шляхів стресу, але ця стресова реакція клітин надає їм резистентності до гіпоксії [10, 22]. Таким чином, наявні експериментальні дані свідчать, що відповідь на стрес ЕР та на гіпоксію є важливим механізмом, за допомогою якого пухлинні клітини підтримують здатність до постійного швидкого поділу та мають високу стійкість до хімотерапії.

ЕР є ключовою органелою у відповіді клітини на гіпоксію, що характерно для більшо-

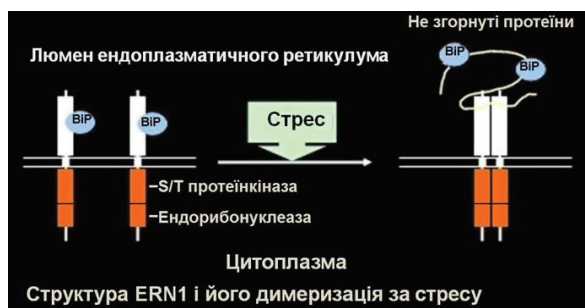


Рис. 2. Структура ERN1 в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР): сенсорна N-кінцева частина знаходиться у люмені ЕР, а біфункціональна ензиматична частина – з цитозольного боку мембрани, причому ближче до трансмембранної частини знаходиться ділянка серин/треонінової кінази, а далі – ендорибонуклеази. За умов стресу ЕР ERN1 димеризується і проявляється ензиматична активність

сті злоякісних пухлин, вірніше, вона – один із обов'язкових факторів злоякісного росту, оскільки виражено активує як процеси ангиогенезу, так і проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу та пентозо-фосфатного циклу через опосередковані транскрипційним фактором HIF (фактор, що індукується за гіпоксії) механізми і тісно пов'язана не лише з ростом пухлин, а і з метастазуванням та резистентністю до лікування [11, 22, 47, 62, 65, 72]. Експресія великої кількості генів, що активуються транскрипційним фактором HIF, збільшується у клітинах злоякісних пухлин: HK2, PFKFB, PFKFB3, PFKFB4, VEGFA, NOTCH1, цикліни, фактори росту та інші, які є потужними проонкогенними чинниками в багатьох злоякісних новоутвореннях, відіграють важливу роль у реалізації ефектів гіпоксії на ангиогенез, проліферацію, інвазивність та хеморезистентність [4, 7, 20, 52, 59–61].

Варто відмітити, що всі три сенсорно-сигнальні шляхи стресу ER, ключової органели клітини у відповіді на незгорнуті чи помилково згорнуті протеїни, є вирішальними як за фізіологічних умов, так і за різноманітних патологій [9, 39]. Стрес ER можна розглядати як один із компонентів реакції пухлинних клітин на гіпоксію [22, 62]. Більше того, зв'язок гіпоксії зі стресом ER є HIF-опосередкованим процесом, у зв'язку з чим саме транскрипційний фактор HIF може бути містком між гіпоксією та стресом ER [47, 62].

Показано, що ефекти гіпоксії на міграцію клітин аденокарциноми грудної залози можуть бути опосередковані сенсорно-сигнальним шляхом стресу ER PERK через ATF4 та LAMP3 [65]. Через PERK-сигнальну систему стресу ER реалізується і гіпоксична регуляція синтезу протеїнів, за якої спостерігається виражена активація фосфорилування  $\alpha$ -субодиниці фактора ініціації трансляції [11].

Стрес ER, будучи одним із центральних необхідних факторів росту злоякісних пухлин, забезпечує такі зміни в метаболізмі клітин, які направлені на активацію ростових і прозапальних процесів, потужно активує

ангиогенез, а також генерує толерантність до гіпоксії, причому як стрес ER, так і прозапальні процеси не залишаються ізольованими у пухлинних клітинах, а поширюються від них до мієлоїдних клітин [9, 39, 48, 49, 72, 73]. Більше того, в більшості випадків дерегуляція гомеостазу ER корелює саме з різними патологічними станами, зокрема з ростом злоякісних новоутворень, що чітко виявляється як на рівні посттрансляційної модифікації протеїнів ретикулула, так і на рівні їх секреції [39, 62].

Крім того, суттєвий вплив на функцію ER мають зміни в мікрооточенні пухлинних клітин, зокрема дефіцит кисню, глюкози чи інших поживних речовин. У різних злоякісних пухлинах дійсно сильно змінюється експресія великої кількості протеїнів, що є резидентами ER, зокрема шаперонів GRP78 (BiP; HSPA5) та GRP94, функціональна роль яких полягає у забезпеченні нормального і правильного згортання протеїнів та у протистоянні проапоптотичним впливам, а також шаперону GRP170, функція якого асоціюється з виходом із пухлинних клітин ендотеліального фактора росту судин VEGF-A для їх виживання за умов гіпоксії [66, 68, 84, 85]. VEGF-A діє як фактор виживання епітеліальних клітин кришталика за умов гіпоксії acts за допомогою збереження сталої експресії протеїну BCL-2, який попереджує транслокацію протеїну BAX із цитозолу до зовнішньої мембрани мітохондрій [66]. Підвищена експресія шаперону HSPA5 у багатьох злоякісних новоутвореннях робить його перспективною мішенню для пошуку нових шляхів протипухлинної терапії [84]. Більше того, саме експресія шаперону HSPA5 значною мірою визначає чутливість до хіміотерапії [63].

Разом з тим численними дослідженнями було встановлено, що основним сенсорно-сигнальним шляхом реалізації ефектів стресу ER на ріст злоякісних пухлин є ERN1, причому він – органічно пов'язаний з гіпоксією та ішемією [20, 56, 58, 62, 72, 73, 84].

Це було чітко продемонстровано переважно на клітинах гліоми, найбільш агресивних із відомих злоякісних пухлин з вираженим ангиогенезом та посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку [54, 55, 59, 62]. Гіпоксія та сигнальний шлях стресу ER тісно пов'язані з процесами ангиогенезу та росту злоякісних пухлин. В експериментах на клітинах гліоми та аденокарциноми легень було встановлено, що повна блокада функції сигнального ензиму ERN1 призводила до вираженого пригнічення росту пухлин із таких клітин на ембріонах курчат та у мозку мишей внаслідок змін в експресії про- та антиангіогенних генів, пухлинних супресорів та циклінів і, відповідно, зниження інтенсивності процесів ангиогенезу та проліферації [4, 20, 31, 32, 40, 41, 53, 57, 59].

Доцільно відмітити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ER ERN1 не є ізольованим у клітині, від тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6), але всі ці шляхи контролюються також низкою важливих протеїнкіназ та факторів [3, 44, 69, 92].

Виключення функції сигнального ензиму ERN1, який контролює процеси апоптозу,



Рис. 3. Структура доміантнегативної ERN1 в ендоплазматичному ретикулумі, в якій видаляється біфункціональна ензиматична частина, що розташована у цитоплазмі

ангіогенезу та росту злоякісних пухлин, було досягнуто за допомогою технології доміантнегативних кДНКових конструкцій, якими проводили трансфекцію клітин з подальшою селекцією клонів. На рис. 3 схематично зображена структура ERN1 у мембрані ER з перекресленою цитоплазматичною частиною, яка була видалена для створення доміантнегативної конструкції без обох ензиматичних активностей [4, 20, 31]. Ефективність пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми оцінювали за вмістом фосфорильованої форми ERN1 та експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1 (ХВР1s) за умов індукованого тунікамідном стресу ER (рис. 4). Так, у контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором, тунікамідин збільшує вміст як фосфорильованої за серином 724 форми ERN1,

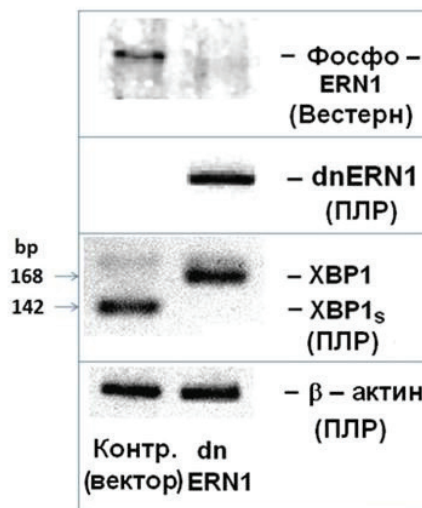


Рис. 4. Ефективність пригнічення сенсорного ензиму ERN1 доміантнегативною конструкцією dnERK1, яку визначали за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, індукованого тунікамідином (0,01 мг/мл – 2 год), за вмістом фосфорильованої форми ERN1 (фосфо-ERK1; вестерн-аналіз), а також за рівнем експресії мРНК доміантнегативної конструкції ERN1 (dnERK1) і транскрипційного фактора (ХВР1) та його альтернативного сплайс-варіанта (ХВР1s) за даними полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфєкованих вектором (Контр.), та у сублінії цих клітин, стабільно трансфєкованих dnERK1 конструкцією [54]

так і альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1, що кодує синтез ключового транскрипційного фактора ERN1 сигналіngu за умов стресу ЕР. Водночас у клітинах гліоми, стабільно трансфектованих домінантнегативною конструкцією ERN1, ефект тунікаміцину не проявляється, а це переконливо свідчить про відсутність у клітинах функціонально активної форми сигнального ензиму ERN1 [59]. Встановлено, що швидкість росту пухлин із клітин гліоми з пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази, на ембріонах курчат знижувалася майже у 4 рази, причому різко знижується і їх васкуляризація (рис. 5) [4, 31].

Варто відмітити, що процес ангіогенезу є досить складним і у різних клітинах експресуються сотні про- та антиангіогенних генів, які утворюють регуляторну його мережу. Так, детальний аналіз клітин меланоми від різних пацієнтів не виявив значного збільшення експресії певних про- чи антиангіогенних генів, а у 97 % пацієнтів ці клітини мали змінену експресію генів, як правило, одного із цих ангіогенних факторів, що переконливо свідчить про досить складну систему контролюючих ангіогенез факторів, причому порушення навіть одного із них може призвести до змін

ангіогенезу [30]. Більше того, транскрипційна і посттранскрипційна регуляція проангіогенних факторів знаходиться під контролем стресу ЕР, що було показано насамперед для ендотеліального фактора росту судин А (VEGF-A) [4, 20, 59, 70].

Найбільш дослідженими із них є VEGF-A та низка інших факторів, зокрема епірегулін (EREG), фактор росту, що зв'язується з гепарином і подібний до епідермального фактора росту (HB-EGF) та фактор росту фібробластів-2 (FGF2) [18, 25, 37, 51, 79, 81]. Як видно з рис. 6, пригнічення функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми лінії U87 різко знижує рівень експресії генів, відповідальних за активацію ангіогенезу: EREG та HB-EGF, а також VEGF-A та VEGF-B [1, 20, 59]. Більше того, за умов гіпоксії також істотно знижується вміст мРНК як EREG, так і HB-EGF у контрольних клітинах гліоми. Водночас у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 ефект гіпоксії на експресію гена EREG значно менший порівняно з контрольними клітинами, а на експресію гена HB-EGF – зовсім відсутній [1].

Значне зниження рівня експресії у клітинах гліоми з блокадою функції ензиму

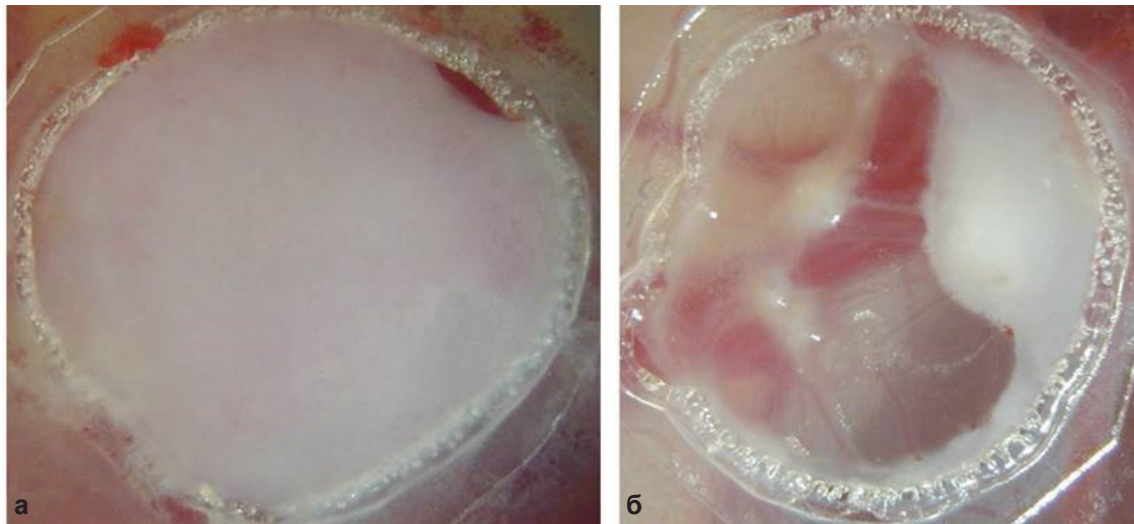


Рис. 5. Ріст пухлин із контрольних клітин гліоми (а) та клітин з пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази (б) на ембріонах курчат; 4 доби [71]



ERN1 було показано також для генів FGF2 та ADAM металопептидази 5 з мотивом тромбоспондину типу 1 (ADAMTS5), що задіяні у посиленні ангиогенезу, але гіпоксія мала протилежну дію на експресію цих генів: знижувала експресію гена FGF2 і посилювала експресію гена ADAMTS5 [40]. Таким чином, результати цих досліджень відкрили деякі сторони молекулярних механізмів пригнічення росту гліоми за умов виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 через різке зниження експресії проангіогенних генів EREG, HB-EGF, ADAMTS5, VEGF та FGF2, причому за цих експериментальних умов знижується або блокується і ефект гіпоксії на експресію більшості цих генів.

У регуляторній сітці регуляції ангиогенезу вагоме місце займають численні антиангіогенні фактори, зокрема такі, як інгібітор металопептидази 2 та 3 (TIMP2, TIMP3), тромбоспондин 1 та 2 (THBS1 та THBS2), а також інгібітор ангиогенезу-2, специфічний для мозку, (BAI2) та кислий і збагачений на

цистеїн протеїн, що секретується (SPARC). Деякі із них мають плейотропні властивості і в залежності від ситуації, що складається у клітині, можуть проявляти не лише анти-, а і проангіогенні властивості [35, 67, 71, 77]. Так, TIMP2 проявляє свою антиангіогенну та пухлино-супресорну дію через взаємодію з рецептором інтегрину  $\alpha 3 \beta 1$ , а через індукцію експресії генів пригнічує клітинний цикл та міграцію клітин [77].

Надзвичайно цікавими є результати дослідження експресії генів антиангіогенних факторів у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1 [40]. Так, значне посилення експресії генів було виявлено у клітинах гліоми за умов пригнічення функції ензиму ERN1 для таких антиангіогенних факторів, як TIMP2, TIMP3, THBS1, THBS2, SPARC та специфічний для мозку інгібітор ангиогенезу BAI2. На рис. 7 представлені дані про експресію генів TIMP2 та TIMP3 у клітинах гліоми з виключеною функцією ензиму ERN1, а також за умов гіпоксії. Експресія обох TIMP-генів посилювалася за гіпоксії у нормальних клітинах гліоми, а клітинах з пригніченим геном ERN1 збільшувалася

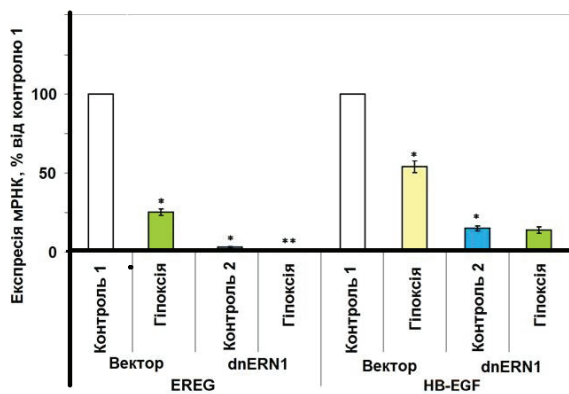


Рис. 6. Ефект гіпоксії (3 % кисню протягом 16 год) на рівень експресії мРНК епірегуліну (EREG) та фактора росту, що зв'язується з гепарином і є подібним до епідермального фактора росту (HB-EGF), у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та її варіанта з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERIN1). Величину експресії генів HB-EGF та EREG визначали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції, нормалізували за рівнем транскриптів  $\beta$ -актину і представляли як відсоток від контролю 1. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем 1, \*\* $P < 0,05$  – з контролем 2 [88]

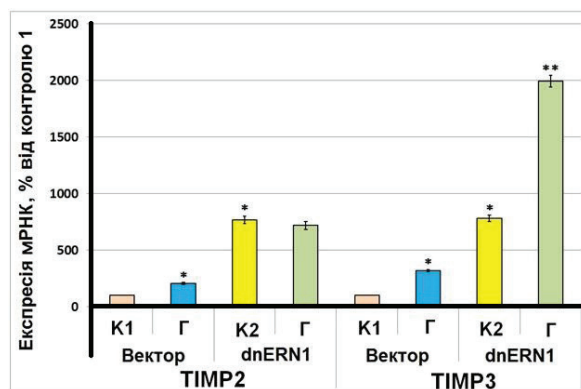


Рис. 7. Вплив гіпоксії на рівень експресії мРНК інгібітора металопептидази TIMP 2 та 3 (TIMP2 та TIMP3) у клітинах гліоми лінії U87 (Вектор) та її варіанта з пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 (dnERIN1). Значення експресії мРНК TIMP2 та TIMP3 нормалізували за експресією мРНК  $\beta$ -актину і представляли як відсоток від контролю 1. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем 1, \*\* $P < 0,05$  – з контролем 2 [74]

експресія лише гена TIMP3. Тобто блокада функції гена ERN1 знімала повністю залежність експресії гена TIMP2 від гіпоксії [40].

Таким чином, сенсорно-сигнальний шлях ERN1 є ключовим модулятором злоякісного росту, оскільки саме він забезпечує основну регуляцію експресії сотень генів, серед яких гени про- та антиангіогенних факторів, гени, які контролюють процеси проліферації, апоптозу та інвазивності пухлинних клітин, причому регулює він експресію цих генів переважно через транскрипційний фактор ХВР1. Сюди відносяться гени ростових і ангіогенних факторів, генів біологічного годинника, протеїнази та протеїнофосфатаз, транскрипційних факторів і пухлинних супресорів, циклінів і циклінозалежних кіназ, генів шаперонів і апоптотичних факторів, ензимів і регуляторів транспорту та метаболізму глюкози тощо [2, 4, 8, 32, 40, 53, 56, 58].

Варто відмітити також, що всі три сенсорно-сигнальні шляхи стресу ER тісно взаємодіють, в тому числі і в регуляції ангиогенезу, і при виключенні одного із них інші два частково компенсують його відсутність. Більше того, різні фактори регуляції ангиогенезу знаходяться в одній сітці регуляції і також дуже тісно взаємодіють. Так, TIMPs інгібують металопротеїнази матриксу, які розщеплюють CTGF (фактор росту сполучної тканини, який ще має назву IGFBP8, протеїн 8, що зв'язується з подібним до інсуліну фактором росту) і таким чином реактивують VEGF [28]. Виключення функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ER, пригнічує ріст пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії генів, що контролюють процеси гліколізу, ангиогенезу та проліферації [31, 32, 40, 41, 53, 55–59]. Залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 можна пояснити тим, що ефекти гіпоксії здебільшого опосередковані транскрипційним фактором HIF, а його вміст залежить не лише від вмісту кисню, а і від сигнальних шляхів, що опосередковують процеси проліферації,

зокрема від PI3K, AKT та MAPK шляхів, які в свою чергу залежать від ERN1 сигнального шляху [3].

**Д.А. Минченко, Е.И. Кубайчук, Е.В. Губеня, И.В. Кривдюк, Е.В. Хоменко, Р.Н Герасименко, Р.В. Сулик., Н.К. Мурашко, А.Г. Минченко**

## **СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И АНГИОГЕНЕЗ**

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) – чрезвычайно чувствительная к изменениям гомеостаза внутриклеточная органелла, что проводит очень точный контроль качества протеинов, которые проходят здесь процесс сворачивания и созревания перед переходом их в аппарат Гольджи, причем все несвернутые или неправильно протеины задерживаются и обязательно уничтожаются. Поэтому реакция клеток на несвернутые в ЭР протеины необходима для сохранения его функциональной целостности и называется стрессом ЭР. Этот стресс – фундаментальное явление, которое надежно защищает клетки от действия различных факторов. Он обеспечивает также широкий спектр протекания различных физиологических процессов развития и метаболизма, особенно в некоторых специализированных клетках с высоким уровнем синтеза секреторных протеинов, в частности таких, как β-клетки, гепатоциты и остеобласты, и необходим на протяжении всей жизни. Стресс ЭР, как и гипоксия, являются обязательными компонентами злокачественного роста, они тесно взаимодействуют и контролируют процессы роста и метаболизма, активируя процессы ангиогенеза. Этот стресс опосредуется тремя сенсорно-сигнальными путями (PERK, ATF6 и ERN1), причем выключение функции одного из них (ERN1) приводит к снижению интенсивности роста опухолей путем угнетения ангиогенеза и процессов пролиферации. Анализируются данные о взаимосвязи функции сигнального энзима ERN1 и экспрессии про- и антиангиогенных генов.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума, ангиогенез, гипоксия, экспрессия генов, ERN1, HIF, пролиферация.

**D.O. Minchenko, K.I. Kubaichuk, O.V. Hubenia, I.V. Kryvdiuk, E.V. Khomenko, R.M. Herasymenko, R.V. Sulik, N.K. Murashko, O.H. Minchenko**

## **ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS AND ANGIOGENESIS**

The endoplasmic reticulum is a dynamic intracellular organelle with exquisite sensitivity to alterations in homeostasis, and provides stringent quality control systems to ensure that the only correctly folded proteins transit to the Golgi and unfolded or misfolded proteins are retained and ultimately

degraded. The endoplasmic reticulum stress represents the unfolded protein response to cope with the accumulation of unfolded or misfolded proteins and is required to maintain the functional integrity of the endoplasmic reticulum. The endoplasmic reticulum stress is a fundamental phenomenon which provides a secure protection of the cells from different factors. This stress provides a wide spectrum of physiological roles in diverse developmental and metabolic processes, especially for professional secretory cells with high-level secretory protein synthesis, such as pancreatic beta cells, hepatocytes and osteoblasts and is required throughout the entire life. The endoplasmic reticulum stress and hypoxia are the obligate components of malignant tumor growth, are interconnected and activate angiogenesis via growth and metabolism control. The endoplasmic reticulum stress is mediated by three by three sensor and signaling pathways (PERK, ATF6 and ERN1), besides that blockade one (ERN1) leads to a decrease of tumor growth through suppression of angiogenesis and proliferation. The data concerning the interaction of signaling enzyme ERN1 and pro- and anti-angiogenic gene expressions is analyzed. Key words: endoplasmic reticulum stress, angiogenesis, hypoxia, gene expressions, ERN1, HIF, proliferation.

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*Bogomolets National Medical University, Kyiv;*

*Shupik National Medical Academy of Post-Graduate Education, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Кубайчук К., Мінченко Д., Ратушна О., Мінченко О. Вплив гіпоксії та ішемії на експресію проангіогенних генів у клітині гліоми U87 з пригніченою функцією гена ERN1 // Вісн. КНУ ім. Т. Шевченка. – 2012. – **58**. – С. 46–50.
- Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Mol. Cell.* – 2007. – **27**, № 1. – P. 53–66.
- Agani F., Jiang B.H. Oxygen-independent regulation of HIF-1: novel involvement of PI3K/AKT/mTOR pathway in cancer // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2013. – **13**, №3. – P. 245–251.
- Auf G., Jabouille A., Guerit S. et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**, № 35. – P. 15553–15558.
- Backer M. V., Backer J. M., Chinnaiyan P. Targeting the unfolded protein response in cancer therapy // *Methods Enzymol.* – 2011. – **491**. – P. 37–56.
- Badiola N., Penas C., Minano-Molina A. et al. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12 // *Cell death & disease.* – 2011. – **2**. – P. e149.
- Bartrons R., Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – **39**, № 3. – P. 223–229.
- Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L. M. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response // *Nature Cell Biol.* – 2000. – **2**, № 6. – P. 326–332.
- Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth // *EMBO J.* – 2005. – **24**, № 19. – P. 3470–3481.
- Blais J. D., Filipenko V., Bi M. et al. Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – **24**, № 17. – P. 7469–7482.
- Bobrovnikova-Marjon E., Grigoriadou C., Pytel D. et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage // *Oncogene.* — 2010. — **29**, № 27. — P. 3881–3895.
- Bouchecareilh M., Higa A., Fribourg S., Moenner M. et al. Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1alpha modulate IRE1alpha activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress // *FASEB J.* – 2011. – **25**, № 9. – P. 3115–3129.
- Bravo R., Parra V., Gatica D. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* – 2013. – **301**. – P. 215–290.
- Cao J., Dai D.L., Yao L. et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway // *Mol. Cell. Biochem.* – 2012. – **364**, № 1–2. – P. 115–129.
- Cao S.S., Kaufman R.J. Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2013. – **17**, № 4. – P. 437–448.
- Chakrabarti A., Chen A.W., Varner J.D. A review of the mammalian unfolded protein response // *Biotechnol. Bioengineer.* – 2011. – **108**, № 12. – P. 2777–2793.
- Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2006. – **9**, № 5. – P. 535–539.
- Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – **7**, № 7. – P. 505–516.
- Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – **8**, № 9. – P. 705–713.
- Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T. et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Res.* – 2007. – **67**. – P. 6700–6707.
- Farias M., Puebla C., Westermeier F. et al. Nitric oxide reduces SLC29A1 promoter activity and adenosine transport involving transcription factor complex hCHOP-C/EBPalpha in human umbilical vein endothelial cells from gestational diabetes // *Cardiovascular. Res.* – 2010. – **86**, № 1. – P. 45–54.
- Feldman D. E., Chauhan V., Koong A. C. The unfolded

- protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors // *Mol. Cancer Res.* – 2005. – **3**, № 11. – P. 597–605.
23. Fels D.R., Koumenis C. The PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth // *Cancer Biol. Therap.* – 2006. – **5**, № 7. – P. 723–728.
  24. Gentz S.H., Bertollo C.M., Souza-Fagundes E.M., da Silva A.M. Implication of eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2013. – **65**, № 3. – P. 430–440.
  25. Giltaire S., Lambert S., Poumay Y. HB-EGF synthesis and release induced by cholesterol depletion of human epidermal keratinocytes is controlled by extracellular ATP and involves both p38 and ERK1/2 signaling pathways // *J. Cell. Physiol.* – 2011. – **226**, № 6. – P. 1651–1659.
  26. Han D., Lerner A.G., Vande Walle L.V. et al. IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates // *Cell.* – 2009. – **138**, № 3. – P. 562–575.
  27. Han D., Upton J. P., Hagen A. et al. A kinase inhibitor activates the IRE1 $\alpha$  RNase to confer cytoprotection against ER stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – **365**, № 4. – P. 777–783.
  28. Hashimoto G., Inoki I., Fujii Y. et al. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165 // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 39. – P. 36288–36295.
  29. Hollien J., Lin J. H., Li H. et al. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *J. Cell Biol.* – 2009. – **186**, № 3. – P. 323–331.
  30. Hose D., Moreaux J., Meissner T. et al. Induction of angiogenesis by normal and malignant plasma cells. // *Blood.* – 2009. – **114**, № 1. – P. 128–143.
  31. Jabouille A., Auf G., Guérit S., Pineau R., Favereaux A., Maitre M., Gaiser T., von Deimling A., Minchenko O.H., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. IRE1 in glioma angiogenesis and invasiveness // In: *Angiogenesis.* – Helsinki, Finland. – 2009. – P. 24.
  32. Karbovskiy L.L., Minchenko D.O., Danilovskiy S. et al. Endoplasmic reticulum–nuclei signaling enzyme-1 knockdown modulates effect of hypoxia and ischemia on the expression of circadian genes in glioma cells // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, № 2. – P. 37–50.
  33. Kaufman R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease // *J. Clin. Invest.* – 2002. – **110**, № 10. – P. 1389–1398.
  34. Kaufman R. J., Back S. H., Song B. et al. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in beta-cells // *Diabetes, obesity & metabolism.* – 2010. – **12**, Suppl. 2. – P. 99–107.
  35. Kee H.J., Koh J.T., Kim M.Y. et al. Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) in normal and ischemic brain: involvement of BAI2 in the ischemia-induced brain angiogenesis // *J. Cerebral Blood Flow Metab.* – 2002. – **22**, № 9. – P. 1054–1067.
  36. Korenykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A. et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 // *Nature.* – 2009. – **457**, № 7230. – P. 687–693.
  37. Koshikawa N., Mizushima H., Minegishi T. et al. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells // *Cancer Sci.* – 2011. – **10**, № 1. – P. 111–116.
  38. Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression // *Curr. Mol. Med.* – 2006. – **6**, № 1. – P. 55–69.
  39. Koumenis C., Naczki C., Koritzinsky M. et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – **22**, № 21. – P. 7405–7416.
  40. Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Danilovskiy S.V. et al. Hypoxic regulation of the expression of anti-angiogenic genes in U87 glioma cells with ERN1 signaling enzyme loss of function // *Studia Biologica.* – 2012. – **6**, № 3. – P. 15–28.
  41. Kubaichuk K.I., Minchenko D.O., Moenner M., Minchenko O.H. Blockade of ERN1 induces anti-angiogenic gene expressions and suppresses tumor growth. – In: *Molecular and Cellular Mechanisms in Angiogenesis.* Capri, Italy. – 2012. – P. 75.
  42. Kyriakakis E., Philippova M., Joshi M.B. et al. T-cadherin attenuates the PERK branch of the unfolded protein response and protects vascular endothelial cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis // *Cell. Signall.* – 2010. – **22**. – P. 1308–1316.
  43. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 8. – P. 3496–3499.
  44. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis // *Nat Med.* – 2011. – **17**, № 10. – P. 1251–1260.
  45. Lee S.K., Kim Y.S. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  attenuates statin-induced apoptosis by inhibiting the stabilization and translocation of p53 to the mitochondria // *Int. J. Oncol.* – 2013. – **42**, № 3. – P. 810–816.
  46. Liu C.Y., Kaufman R.J. The unfolded protein response // *J. Cell Sci.* – 2003. – **116**, Pt 10. – P. 1861–1862.
  47. Magagnin M. G., Koritzinsky M., Wouters B. G. Patterns of tumor oxygenation and their influence on the cellular hypoxic response and hypoxia-directed therapies // *Drug Resistance Updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* – 2006. – **9**, № 4–5. – P. 185–197.
  48. Mahadevan N. R., Rodvold J., Sepulveda H. et al. Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – **108**, № 16. – P. 6561–6566.
  49. Mahadevan N. R., Zanetti M. Tumor stress inside out: cell-extrinsic effects of the unfolded protein response in tumor cells modulate the immunological landscape of the

- tumor microenvironment // *J. Immunol.* – 2011. – **187**, № 9. – P. 4403–4409.
50. Marciniak S.J., Ron D. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Disease // *Physiol. Rev.* – 2006. – **86**. – P. 1133–1149.
  51. McIntyre E., Blackburn E., Brown P.J. et al. The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – **122**. – P. 105–110.
  52. Minchenko A.G., Leshchinsky I., Opentanova I.L. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, № 8. – P. 6183–6187.
  53. Minchenko D., Hubenya O., Terletsky B. et al. Blockade of the endoplasmic reticulum stress sensor inositol requiring enzyme-1 changes the expression of cyclin and growth arrest-specific genes in glioma cells // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska.* – 2010. – **23**, № 3. – P. 179–184.
  54. Minchenko D.O., Hubenya O.V., Terletsky B.M. et al. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of cyclin and cyclin-dependent kinase genes in glioma cell line U87 and its subline with suppressed activity of signaling enzyme endoplasmic reticulum-nuclei-1 // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2011. – **83**, № 1. – P. 18–29.
  55. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S. V. et al. Effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation on the expression of retinoblastoma and retinoblastoma-related genes in ERN1 knockdown glioma U87 cell line // *Amer. J. Mol. Biol.* – 2012. – **2**, № 1. – P. 21–31.
  56. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danilovskiy S.V. Kharkova A.P., Minchenko O.H. Expression of casein kinase genes in glioma cell line U87: effect of hypoxia and glucose or glutamine deprivation // *Nat. Sci.* – 2012. – **4**, № 1. – P. 38–46.
  57. Minchenko D.O., Karbovskiy L.L., Danylovskiy S.V. et al. Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of mRNA of the retinoblastoma binding proteins in glioma cells // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, № 1. – P. 57–68.
  58. Minchenko D.O., Kharkova A.P., Hubenya O.V., Minchenko O.H. Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRA D, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation // *Endocr. regulation.* – 2013. – **47**, № 1. – P. 15–26.
  59. Minchenko D.O., Kubajchuk K.I., Ratushna O.O. et al. The effect of hypoxia and ischemic condition on the expression of VEGF genes in glioma U87 cells is dependent from ERN1 knockdown // *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – **2**, № 2, 198–206.
  60. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I.L. Ogura T., Minchenko D.O., Caro J., Komisarenko S.V., Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors // *Biochimie.* – 2005. – **87**, № 11. – P. 1005–1010.
  61. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *FEBS Lett.* – 2004. – **576**, № 1. – P. 14–20.
  62. Moenner M., Pluquet O., Bouche-careilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 22. – P. 10631–10634.
  63. Mozos A., Roue G., Lopez-Guillermo A. The expression of the endoplasmic reticulum stress sensor BiP/GRP78 predicts response to chemotherapy and determines the efficacy of proteasome inhibitors in diffuse large b-cell lymphoma // *Am. J. Pathol.* – 2011. – **179**, № 5. – P. 2601–2610.
  64. Muaddi H., Majumder M., Peidis P. et al. Phosphorylation of eIF2α at serine 51 is an important determinant of cell survival and adaptation to glucose deficiency // *Mol. Biol. Cell.* – 2010. – **21**, № 18. – P. 3220–3231.
  65. Nagelkerke A., Bussink J., Mujcic H. et al. Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response // *Breast Cancer Res.* – 2013. – **15**, № 1. – P. R2.
  66. Neelam S., Brooks M.M., Cammarata P.R. Lenticular cytoprotection. Part 1: The role of hypoxia inducible factors-1α and -2α and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell survival in hypoxia // *Mol. Vis.* – 2013. – **19**. – P. 1–15.
  67. Neill T., Painter H., Buraschi S. et al. Decorin antagonizes the angiogenic network: concurrent inhibition of Met, hypoxia inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor A, and induction of thrombospondin-1 and TIMP3 // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, № 8. – P. 5492–5506.
  68. Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M. et al. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, № 10. – P. 6397–6404.
  69. Park S.W., Zhou Y., Lee J. et al. The regulatory subunits of PI3K, p85alpha and p85beta, interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation // *Nat Med.* – 2010. – **16**, № 4. – P. 429–437.
  70. Pereira E.R., Liao N., Neale G.A., Hendershot L.M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of proangiogenic factors by the unfolded protein response // *PLoS One.* – 2010. – **5**, № 9. – P. e12521.
  71. Rivera L.B., Bradshaw A.D., Brekken R.A. The regulatory function of SPARC in vascular biology // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – **68**, № 19. – P. 3165–3173.
  72. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth // *Cancer Research.* – 2004. – **64**. – P. 5943–5947.
  73. Romero-Ramirez L., Cao H., Regalado M.P. et al. X box-binding protein 1 regulates angiogenesis in human pancreatic adenocarcinomas // *Translat. Oncology.* – 2009. – **2**, № 1. – P. 31–38.
  74. Saito A., Ochiai K., Kondo S. et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-

- ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2 // *J. Biol. Chem.* – 2011. – **286**, № 6. – P. 4809–4818.
75. Schröder M. Endoplasmic reticulum stress responses // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – **65**, № 6. – P. 862–894.
76. Schröder M., Kaufman R.J. The mammalian unfolded protein response // *Annu. Rev. Biochem.* – 2005. – **74**. – P. 739–789.
77. Seo D.W., Saxinger W.C., Guedez L. et al. An integrin-binding N-terminal peptide region of TIMP-2 retains potent angio-inhibitory and anti-tumorigenic activity in vivo // *Peptides*. – 2011. – **32**, № 9. – P. 1840–1848.
78. Shen X., Zhang K., Kaufman R.J. The unfolded protein response – a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum // *J. Chem. Neuroanat.* – 2004. – **28**, № 1–2. – P. 79–92.
79. Svensson K.J., Kucharzewska P., Christianson H.C. et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – **108**, № 32. – P. 13147–13152.
80. Thorpe J.A., Schwarze S.R. IRE1 $\alpha$  controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1 // *Cell Stress & Chaperones*. – 2010. – **15**, № 5. – P. 497–508.
81. Tolino M.A., Block E.R., Klarlund J.K. Brief treatment with heparin-binding EGF-like growth factor, but not with EGF, is sufficient to accelerate epithelial wound healing // *Biochim. and Biophys. Acta.* – 2011. – **1810**, № 9. – P. 875–878.
82. Wang M., Ye R., Barron E. et al. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2010. – **17**, № 3. – P. 488–498.
83. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease // *J. Cell. Biol.* – 2012. – **197**, № 7. – P. 857–867.
84. Wang S., Kaufman R.J. The impact of the unfolded protein response on human disease // *J. Cell. Biol.* – 2012. – **197**, № 7. – P. 857–867.
85. Woehlbier U., Hetz C. Modulating stress responses by the UP $\alpha$ osome: a matter of life and death // *Trends Biochem. Sci.* – 2011. – **36**, № 6. – P. 329–337.
86. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J. et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme // *J. Exp. Med.* – 2011. – **208**, № 2. – P. 313–326.
87. Woo C.W., Cui D., Arellano J. et al. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – **11**, № 12. – P. 1473–1480.
88. Wu J., Kaufman R.J. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response // *Cell Death Differ.* – 2006. – **13**, № 3. – P. 374–384.
89. Yuzefovych L.V., Musiyenko S.I., Wilson G.L., Rachek L.I. Mitochondrial DNA damage and dysfunction, and oxidative stress are associated with endoplasmic reticulum stress, protein degradation and apoptosis in high fat diet-induced insulin resistance mice // *PLoS One*. – 2013. – **8**, № 1. – P. e54059.
90. Zhang K., Kaufman R.J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease // *Neurology*. – 2006. – **66**, № 2. – Suppl 1. – S102–S109.
91. Zhou J., Liu C.Y., Back S.H. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – **103**, № 39. – P. 14343–14348.
92. Zhou Y., Lee J., Reno C.M. et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. // *Nat. Med.* – 2011. – **17**, № 3. – P. 356–365.
93. Zou J., Li P., Lu F. et al. Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells // *J. Hematol. Oncol.* – 2013. – **6**, № 1. – P. 3.

*Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ;  
Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Нац. мед. академія післядиплом. освіти ім. П.Л. Шупика, Київ  
E-mail: ominchenko@yahoo.com*

*Матеріал надійшов до  
редакції 10.04.2013.*