

# ОГЛЯДИ

УДК 577.112.7:616

## СТРЕС ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА, ЙОГО СЕНСОРНО-СИГНАЛЬНІ СИСТЕМИ ТА РОЛЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ЗА ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ І ГІПОКСІЇ

О. Г. МІНЧЕНКО, А. П. ХАРЬКОВА, Т. В. БАКАЛЕЦЬ, І. В. КРИВДЮК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: ominchenko@yahoo.com

*Гіпоксія є одним з індукторів експресії великої групи генів, що контролюють гліколіз та процеси проліферації в умовах зниженого рівня кисню або внаслідок зменшеного його споживання. Разом із тим, гіпоксія є одним із чинників, що індукують стрес ендоплазматичного ретикулума, який, як і гіпоксія, є обов'язковим компонентом злоякісного росту і пов'язаний з цитоплазмою та ядром трьома сенсорно-сигнальними системами: PERK, ATF6 та ERN1. Виключення функції ERN1 – основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума – призводить до зниження інтенсивності росту пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії багатьох генів, що контролюють процеси проліферації та гліколізу. Сигнальний шлях ERN1 контролює експресію великої групи генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії, і є важливим фактором росту злоякісних пухлин.*

*Ключові слова: стрес ендоплазматичного ретикулума, гіпоксія, експресія генів, ERN1, HIF, гліколіз, проліферація, злоякісні пухлини.*

Протеїни, що синтезуються в клітині, надходять до ендоплазматичного ретикулума для подальшого їх дозрівання (згортання, або фолдингу) [1]. Нормальний функціональний стан ендоплазматичного ретикулума залежить від чіткої роботи системи шаперонів, які забезпечують правильне згортання синтезованих протеїнів і відіграють ключову роль у попередженні клітини про накопичення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів через високоспецифічну систему сенсорно-сигнальних мереж [1, 2]. Реакція сенсорно-сигнальних шляхів ендоплазматичного ретикулума на накопичення незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів називається «реакцією на незгорнуті протеїни» (unfolded protein response) і такий стан клітин отримав назву «стресу ендоплазматичного ретикулума» [3, 4].

Цей стрес розвивається за дії на клітини різноманітних чинників, у тому числі і гіпоксії, а також дефіциту чи надлишку глюкози, амінокислот, дії різних токсичних речовин внаслідок накопичення в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів. Для протидії накопиченню в

ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих протеїнів у клітинах еукаріот існує комплекс сенсорно-сигнальних шляхів від ендоплазматичного ретикулума до цитоплазми і ядра. На сьогодні ідентифіковано три спеціальні сенсорно-сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулума, які розпізнають незгорнуті або неправильно згорнуті протеїни, що накопичуються в ендоплазматичному ретикулумі: PERK (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума; PRK-like ER kinase), ERN1 (від ендоплазматичного ретикулума до ядра; Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1) ензим, який ще називають IRE1 (залежний від інозитулу ензим-1; Inositol Requiring Enzyme-1) та ATF6 (активуючий транскрипційний фактор 6; Activating Transcription Factor 6), але ERN1 є найважливішою сенсорно-сигнальною системою стресу ендоплазматичного ретикулума [5–8].

На рис. 1 зображені основні сенсорно-сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума. Ці шляхи стресу починаються в люмені ендоплазматичного ретикулума в умовах накопичення в ньому незгорнутих протеїнів і закінчуються в цитоплазмі або



Рис. 1. Схематичне зображення основних сенсорно-сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума (PERK, ATF6 та IRE1), що починаються в люмені ендоплазматичного ретикулума за умов накопичення в ньому незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів й 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. Протеїн BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein; протеїн, що зв'язується з важким ланцюгом імуноглобулінів) являє собою 70 kDa протеїн 5 теплового шоку (HSPA5), який відомий також як протеїн 78, що регулюється глюкозою (GPR78)

ядрі. Індукція стресу ендоплазматичного ретикулума призупиняє входження до ендоплазматичного ретикулума *de novo* синтезованих протеїнів і сприяє як правильному згортанню протеїнів, що вже знаходяться в ендоплазматичному ретикулумі, так і деградації неправильно згорнутих протеїнів для виживання клітин в умовах дії на них чинників, що індукують цей стрес, або їхньої смерті через систему апоптозу, асоційовану з ендоплазматичним ретикулумом [9, 10].

Причиною стресу ендоплазматичного ретикулума можуть бути також зміни в гомеостазі кальцію чи окисно-відновному потенціалі, посилений синтез секреторних протеїнів, експресія протеїнів із помилковою конформацією, а також зміни у глікозилюванні протеїнів [2, 11, 12].

Накопичення незгорнутих протеїнів або протеїнів із помилковою конформацією в каналцях ендоплазматичного ретикулума призводить до розвитку стресу ендоплаз-

матичного ретикулума і забезпечує не лише знижене надходження нових протеїнів та посилену деградацію незгорнутих протеїнів, а також і загальне зниження ініціації трансляції на фоні вибіркової трансляції певних мРНК для синтезу залежних від стресу протеїнів [2]. Функція стресу ендоплазматичного ретикулума полягає саме в реорганізації метаболічних процесів у клітині для забезпечення їх виживання або їх загибелі шляхом апоптозу у разі незворотних змін [13, 14]. Більше того, реакція клітин на накопичення в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих протеїнів є досить важливою також і для збереження функціональної цілісності ендоплазматичного ретикулума та попереджає розвиток оксидативного стресу [15].

Крім того, реакція клітини на накопичення незгорнутих протеїнів у люмені ендоплазматичного ретикулума має широкий спектр і фізіологічних функцій, причому кожен із сенсорно-сигнальних шляхів стре-

су ендоплазматичного ретикулула виконує унікальну і спеціалізовану роль у різних процесах метаболізму та розвитку протягом всього життя еукаріотів: від регуляції процесів диференціації до індукції апоптозу [4]. Це, передусім, стосується спеціалізованих секреторних клітин, зокрема таких як панкреатичні  $\beta$ -клітини, гепатоцити та остеобласти, де високий рівень синтезу секреторних протеїнів потребує надзвичайно досконалого механізму згортання, дозрівання і секреції протеїнів.

### Сенсорно-сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулула

Сенсорно-сигнальні ензими локалізовані в ендоплазматичному ретикулумі і є трансмембранними, причому сенсорна частина цих ензимів знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулула та взаємодіє з низкою шаперонів, головним із яких є BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein; протеїн, що зв'язується з важким ланцюгом імуноглобулінів), відомий також як протеїн 78, що регулюється глюкозою (GPR78), або 70 kDa протеїн 5 теплового шоку (HSPA5) [16, 17]. Шаперон HSPA5 є негативним регулятором всіх трьох сенсорно-сигнальних ензимів ендоплазматичного ретикулула, оскільки за нормальних умов він є асоційованим з усіма трьома сигнальними ензимами і відщеплюється тільки за появи в ендоплазматичному ретикулумі незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів, забезпечуючи, таким чином, одночасну негативну регуляцію роботи всіх сигнальних шляхів відповіді на незгорнуті протеїни [16].

Разом з тим, в умовах стресу ендоплазматичного ретикулула в клітині запускається низка процесів, спрямованих на регуляцію роботи різних шаперонів, причому підвищена експресія шаперону HSPA5 у багатьох злякисних новоутвореннях робить його цікавою мішенню для пошуку перспективних шляхів розробки способів протипухлинної терапії [17]. Кожен із трьох сенсорно-сигнальних ензимів ендоплазматичного ретикулула має також трансмембранний домен, що закріплює їх у мембрані ендоплазматичного ретикулула, та цитоплазматичний домен, який виявляє ензиматичну або регуляторну роль.

*Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула PERK.* Цей сенсорно-сигнальний шлях представлений протеїнкіназою ендоплазматичного ретикулула, яка подібна до PRK-кінази (протеїнкінази, що активується

дволанцюговою РНК; double stranded RNA activated protein kinase) [7]. Ця протеїнкіназа являє собою кіназу 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) шляхом її фосфорилювання, що призводить до швидкого пригнічення ініціації трансляції і тотальної репресії біосинтезу протеїнів, а також зменшеного їх надходження до ендоплазматичного ретикулула [7].

Недавно було показано, що фосфорильована форма EIF2A посилює синтез транскрипційного фактора ATF4, який відіграє важливу роль в регуляції багатьох процесів, у тому числі і в диференціюванні остеобластів та утворенні кістки шляхом активації експресії важливих для остеогенезу генів [7]. Більше того, активація експресії ATF4, що опосередкована сенсорно-сигнальною системою PERK в умовах стресу ендоплазматичного ретикулула, є досить важлива для росту злякисних пухлин і резистентності до гіпоксії [18, 19]. Недавно було показано, що фосфорилювання EIF2A пригнічує індукований статинами апоптоз шляхом пригнічення стабілізації та транслокації TP53 до мітохондрій [20]. Крім того, кіназа EIF2A задіяна в індукції апоптозу та залежних від стресу ендоплазматичного ретикулула генів саліцилатом натрію [21]. На рис. 2 схематично наведено реакцію клітин на стрес ендоплазматичного ретикулула, яка опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами і є необхідною клітині для пошуку можливих шляхів виходу із стану стресу, зумовленого накопиченням незгорнутих чи неправильно згорнутих протеїнів [22].

Згідно з даними, представленими на рис. 2, активований сенсорно-сигнальний ензим PERK фосфорилує  $\alpha$ -субодиницю еукаріотичного фактора ініціації трансляції-2 ( $\epsilon$ IF2 $\alpha$ ) та пригнічує синтез нових протеїнів. Одночасно PERK індукує синтез транскрипційного фактора ATF4 (активуючий транскрипційний фактор 4), який посилює експресію низки генів, включаючи CHOP (протеїн, гомологічний C/EBP), що має ще й інші назви (DDIT3 та GADD153), та GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 34; протеїн 34, що індукується за пошкодження ДНК і зупиняє ріст). Транскрипційний фактор CHOP належить до родини протеїнів, які зв'язуються з енхансером CCAAT (C/EBP). Він виконує функцію домінантнегативного інгібітору за формування гетеродимерів з

іншими членами родини C/EBP, зокрема такими як C/EBPA та LAP (активаторний протеїн печінки), і попереджає їх зв'язування з ДНК, що є важливим у регуляції адипогенезу та еритропоєзу, активується за стресу ендоплазматичного ретикулула і сприяє апоптозу [23, 24]. Так, транскрипційний комплекс CHOP-C/EBPA пригнічує експресію *SLC29A1* і транспорт аденозину в ендотеліальних клітинах судин за діабету вагітних через NO-залежний шлях [25]. Встановлено також, що індукція експресії CHOP у разі стресу ендоплазматичного ретикулула пригнічується за взаємодії подібних до TOLL-рецепторів (TLR) 3 або 4 з TRIF-залежним сигнальним шляхом [26].

Інший представник PERK сигнального каскаду GADD34 являє собою регуляторну (інгібіторну) субодиницю 15A протеїнфосфатази 1 (PPP1R15A). Ця протеїнфосфатаза є серин/треоніною протеїнфосфатазою, яка дефосфорилує  $\alpha$ -субодиницю фактора ініціації трансляції EIF2A/EIF2S1 і, таким чином, знімає виключення ініціації синтезу протеїнів, індукованого стресозалежними кіназами, та опосередковує вихід клітини із стану стресу [22, 23].

Більше того, протеїнфосфатаза 1 може блокувати сигнальний шлях TGF $\beta$ 1, дефосфо-

рилюючи його. Транскрипційний фактор ATF4 також може активувати апоптоз, індукуючи фосфорилювання TP53 по Ser-15, та експресію ERO1 $\alpha$ , який продукує активні форми кисню (ROS) і при цьому сприяє згортанню протеїнів. Було також встановлено, що T-кадгерін істотно послаблює PERK-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула і, таким чином, захищає ендотеліальні клітини судин від апоптозу, індукованого стресом ендоплазматичного ретикулула [27].

**Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула ATF6.** Цей сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула ATF6 представлений трансмембранним попередником транскрипційного фактора ATF6, який за індукції стресу розщеплюється з утворенням не зв'язаної з мембраною ендоплазматичного ретикулула розчинної форми ATF6 [2, 12]. Ця розчинна форма транскрипційного фактора ATF6 відповідає за регуляцію транскрипції низки залежних від стресу ендоплазматичного ретикулула генів, причому він може працювати як окремо, так і синергічно з іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу ендоплазматичного ретикулула [28]. Більше того, транскрипційний фактор ATF6 може брати

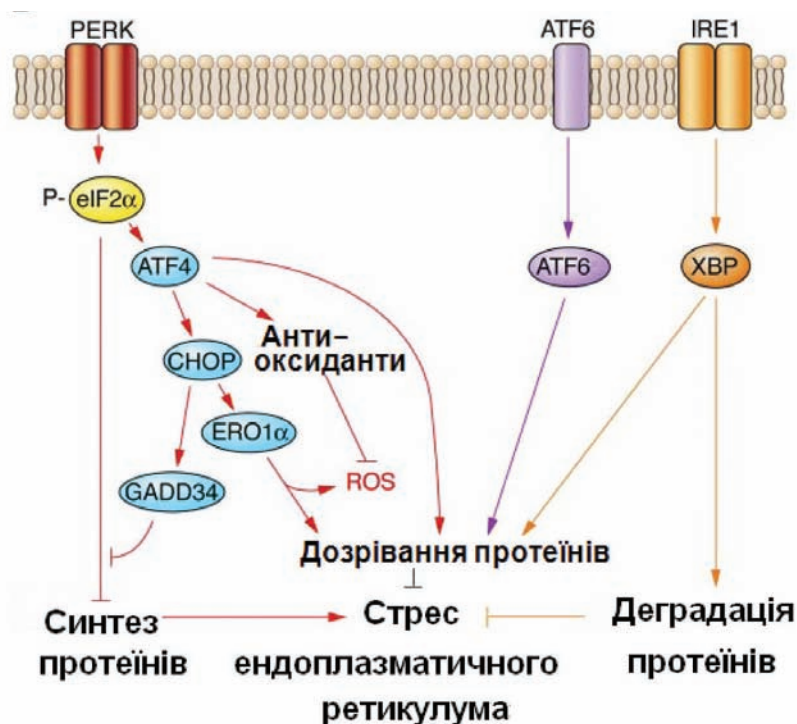


Рис. 2. Опосередкована трьома сенсорно-сигнальними системами реакція клітин на стрес ендоплазматичного ретикулула для пошуку шляхів їх виходу із стресового стану за Lee et al. [20]



участь у комплексній регуляції експресії генів, зокрема транскрипційними факторами NF- $\kappa$ B та YY1.

Виявлені сайти зв'язування транскрипційного фактора ATF6 на промоторах багатьох генів важливих транскрипційних факторів, у тому числі фактора регуляції транскрипції E2F3, який відіграє надзвичайно важливу роль у контролі клітинного циклу та дії пухлинних супресорів. Разом з тим, варто відмітити, що функціональне значення сенсорно-сигнального шляху ATF6 вивчено ще недостатньо у порівнянні із сигнальними шляхами PERK та ERN1.

*Сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума ERN1.* Цей сенсорно-сигнальний шлях ERN1 представлений біфункціональним трансмембранним ензимом, який має сенсорну частину, локалізовану в люмені ендоплазматичного ретикулума, трансмембранний домен та цитоплазматичну частину з активністю двох ензимів: серин/треонінової кінази і ендорибонуклеази (рис. 3).

За індукції стресу ендоплазматичного ретикулума активується кіназа, яка автофосфорилує ERN1, внаслідок чого відбувається його активація та димеризація в мембрані ендоплазматичного ретикулума, що призводить до активації ендорибонуклеази [8, 28, 29]. Основна функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вирізання короткого фрагмента з кодуєчої частини мРНК транскрипційного фактора ХВР1 (протеїн-1, що зв'язується з Х-боксом), з утворенням вкороченого альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1 (ХВР1s), який кодує синтез транскрипційного фактора, більшого за розміром і зі зміненою амінокислотною послідовністю С-кінця, внаслідок зміни рамки зчитування.

Саме цей альтернативний сплайс-варіант транскрипційного фактора ХВР1 є відповідальним за регуляцію експресії сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, а також до деградації неправильно згорнутих протеїнів [28, 30]. Ці гени є відповідальними за синтез шаперонів, що контролюють процеси фолдингу протеїнів в ендоплазматичному ретикулумі, пропроліферативних, проангіогенних, проапоптотичних та антиапоптотичних факторів, але існує досить складна і мало досліджена система контролю включення та виключення певних груп генів за різних форм стресу ендоплазматичного ретикулума.



Рис. 3. Схематичне зображення структури ERN1 в ендоплазматичному ретикулумі: сенсорна N-кінцева частина знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулума, а біфункціональна ензиматична частина розташована з цитозольного боку мембрани, причому ближче до трансмембранної частини знаходиться ділянка серин/треонінової кінази, а далі — ендорибонуклеази

Інша функція ендорибонуклеази ERN1 полягає у вибіркового розщепленні (деградації) певних мРНК в умовах стресу ендоплазматичного ретикулума, що, мабуть, є надзвичайно важливим у швидкому виключенні певних сигнальних шляхів, які можуть заважати виходу клітини із стану стресу [31]. Таким чином, для активації ендорибонуклеази необхідною умовою є автофосфорилування ERN1 кіназою цього біфункціонального ензиму і його димеризація, але не зовсім зрозумілі дані про те, що пригнічення кінази за допомогою специфічного інгібітора також активує ендорибонуклеазу і забезпечує клітині протікання найважливіших метаболічних змін для виходу ендоплазматичного ретикулума зі стресового стану [32].

Надзвичайно цікавими виявилися дослідження ролі продуктів протеолітичного розщеплення ERN1. Було встановлено, що пептиди, які утворюються з біфункціонального сигнального ензиму ERN1 в процесі протеолізу цього протеїну мають здатність модулювати активність біфункціонального ензиму ERN1 і захищати клітини від стресу ендоплазматичного ретикулума [33].

### Роль стресу ендоплазматичного ретикулума та гіпоксії в рості злоякісних пухлин

Гіпоксія є характерною рисою більшості злоякісних пухлин і тісно пов'язана не лише з ростом пухлин, а і з метастазуванням та резистентністю до лікування [19, 34–36]. Гіпоксія є одним із обов'язкових факторів злоякісного росту, оскільки виражено активує процеси проліферації, зокрема за рахунок активації гліколізу і пентозо-фосфатного циклу, через що пухлинні клітини характеризуються посиленням гліколізом та високим рівнем лактату і пірувату, що корелює зі збільшеним рівнем експресії ензимів гліколізу та переносників глюкози завдяки механізмам опосередкованих транскрипційним фактором HIF (фактор, що індукується за гіпоксії) [37–40]. Більше того, було встановлено, що NOTCH1, який є потужним проонкогенним чинником в багатьох злоякісних новоутвореннях, відіграє важливу роль в реалізації ефектів гіпоксії, в тому числі і фактора HIF, на проліферацію, інвазивність та резистентність до хіміотерапії [41].

Доцільно відмітити, що ендоплазматичний ретикулум є ключовою органелою у відповіді клітини на гіпоксію, ішемію та дію деяких сполук, які індуюють стрес ендоплазматичного ретикулума, причому всі сигнальні шляхи стресу на незгорнуті або помилково згорнуті протеїни є вирішальними як за фізіологічних умов, так і за різноманітних патологій [42, 43]. Крім того, стрес ендоплазматичного ретикулума можна розглядати як один із компонентів реакції пухлинних клітин на гіпоксію [42].

Цікаво, що зв'язок гіпоксії зі стресом ендоплазматичного ретикулума є HIF-опосередкованим процесом, що, можливо, може бути містком між гіпоксією та стресом ендоплазматичного ретикулума, їх взаємозв'язку [44, 45]. Так, нещодавно було показано, що ефекти гіпоксії на міграцію клітин аденокарциноми грудної залози можуть бути опосередковані сенсорно-сигнальним шляхом стресу ендоплазматичного ретикулума PERK через ATF4 та LAMP3 [46]. Саме через цей сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулума реалізується і регуляція синтезу протеїнів за гіпоксії, яка виражено активує фосфорилювання  $\alpha$ -субодиниці фактора ініціації трансляції [47].

Таким чином, хоча гіпоксія є індуктором стресу ендоплазматичного ретикулума, цей стрес може виявляти також і зворотний ефект, обумовлювати появу ефектів гіпоксії за

механізмами, що не залежать від кисню, істотно посилюючи експресію транскрипційного фактора HIF через регуляторні каскади різних сигнальних систем стресу ендоплазматичного ретикулума.

Дослідження останніх років переконливо свідчать про те, що стрес ендоплазматичного ретикулума є одним із центральних облігатних факторів росту злоякісних пухлин, оскільки він забезпечує такі зміни в метаболізмі клітин, які направлені на активацію ростових та прозапальних процесів, активує ангиогенез, а також толерантність до гіпоксії, причому як стрес ендоплазматичного ретикулума, так і прозапальні процеси поширюються від пухлинних до мієлоїдних клітин [48–58]. Здебільшого дерегуляція гомеостазу ендоплазматичного ретикулума корелює з різними патологічними станами і з ростом злоякісних новоутворень, причому ці ефекти виявляються на різних рівнях, в тому числі на рівні посттрансляційної модифікації протеїнів ендоплазматичного ретикулума або шляхом порушення їх секреції [45, 49].

Крім того, істотний вплив на функцію ендоплазматичного ретикулума 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 ендоплазматичного ретикулума, зокрема шаперонів GRP78(BiP; HSPA5) та GRP94, функціональна роль яких полягає в забезпеченні нормального і правильного згортання протеїнів та у протистоянні проапоптотичним впливам. До цих процесів причетний також шаперон GRP170, функція якого асоціюється з виходом із пухлинних клітин ендотеліального фактора росту судин VEGF-A для їх виживання за гіпоксичних умов [16, 59, 60]. Цей фактор росту судин в умовах гіпоксії діє також як фактор виживання епітеліальних клітин кришталика шляхом збереження сталої експресії протеїну BCL-2, який попереджає транслокацію протеїну BAX із цитозоля до зовнішньої мембрани мітохондрій [60]. Підвищена експресія шаперону HSPA5 у багатьох злоякісних новоутвореннях, який значною мірою визначає також чутливість пухлинних клітин до хіміотерапії, робить його перспективною мішенню для пошуку нових шляхів протипухлинної терапії [17, 61].

Разом з тим, основним сенсорно-сигнальним шляхом реалізації ефектів стресу ендоплазматичного ретикулума на ріст злоякісних

пухлин є ERN1, причому він дуже тісно пов'язаний також із гіпоксією та ішемією [17, 49, 50, 55, 57, 62, 63]. Це було чітко продемонстровано на клітинах гліоми, найагресивніших із відомих злоякісних пухлин із вираженим ангиогенезом та посиленою інвазією клітин у нормальну паренхіму головного мозку [45, 53, 64, 65]. Цей сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула є тісно пов'язаним не лише з гіпоксією та ішемією, а і з процесами проліферації та росту злоякісних пухлин. В експериментах на клітинах гліоми та аденокарциноми легені шляхом повної блокади функції сигнального ензиму ERN1 було виявлено різке пригнічення росту пухлин із таких клітин, як клітини ембріонів курчат, так і мозку мишей, за рахунок змін в експресії проангіогенних та антиангіогенних генів, пухлинних супресорів та циклінів і, відповідно, зниження інтенсивності процесів ангиогенезу та проліферації [53, 57, 64, 66, 67].

Виключення функції сигнального ензиму ERN1 було досягнуто за допомогою технології доміантнегативних кДНК-конструкцій, якими проводили трансфекцію клітин з подальшою селекцією клонів. На рис. 4 наведено схематичне зображення структури комплементарної ДНК ERN1 та її змінених варіантів: без ензиматичної активності та з мутацією в ендорибонуклеазному домені на основі раніше опублікованих даних [62, 66].

Ефективність пригнічення функції сигнального ензиму ERN1 у клітинах гліоми оцінювали за рівнем фосфорильованої форми ERN1 та експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1 (ХВР1s) в умовах стресу ендоплазматичного ретикулула, індукованого тунікаміцином. Як видно з даних, наведених на рис. 5, А, в контрольних клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором, тунікаміцин збільшує рівень як фосфорильованої за серином 724 форми ERN1, так і альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1, що кодує синтез ключового транскрипційного фактора сигналіну ERN1 за стресу ендоплазматичного ретикулула. В той самий час, у клітинах гліоми, стабільно трансфікованих доміантнегативною конструкцією ERN1, ефект тунікаміцину не виявляється, що переконливо свідчить про відсутність у цих клітинах функціонально активної форми сигнального ензиму ERN1 [66]. У клітинах гліоми з мутантним за ендорибонуклеазою ензимом ERN1 також не було виявлено альтернативного сплайс-варіанта мРНК ХВР1 за індукції стресу ендоплазматичного ретикулула тунікаміцином (рис. 5, Б). Швидкість росту клітин із пригніченою активністю як кінази, так і ендорибонуклеази, знижувалася більше ніж удвічі, але клітини гліоми з мутантною ендорибонуклеазою росли ще повільніше, що переконливо свідчить про важливість ERN1-

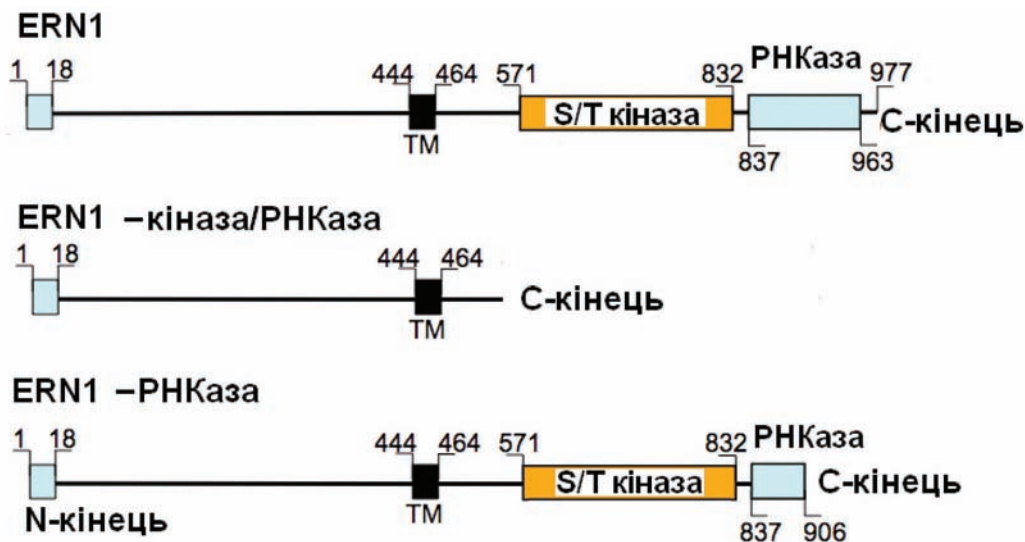


Рис. 4. Схематичне зображення структури комплементарної ДНК ERN1 (ERN1) та її змінених варіантів: без ензиматичної активності (ERN1 – кіназа/PHKаза) та з мутацією в ендорибонуклеазному домені (ERN1 – PHKаза) конструкцій ERN1. Цифрами позначено амінокислотні залишки в послідовності ERN1. На схемі позначені N-кінцева частина (N-кінцев), трансмембранна частина (TM), ділянки серин/треонінової кіназної активності (S/T кіназа) та ендорибонуклеазної активності (PHKаза), а також C-кінцева частина (C-кінцев) [66]



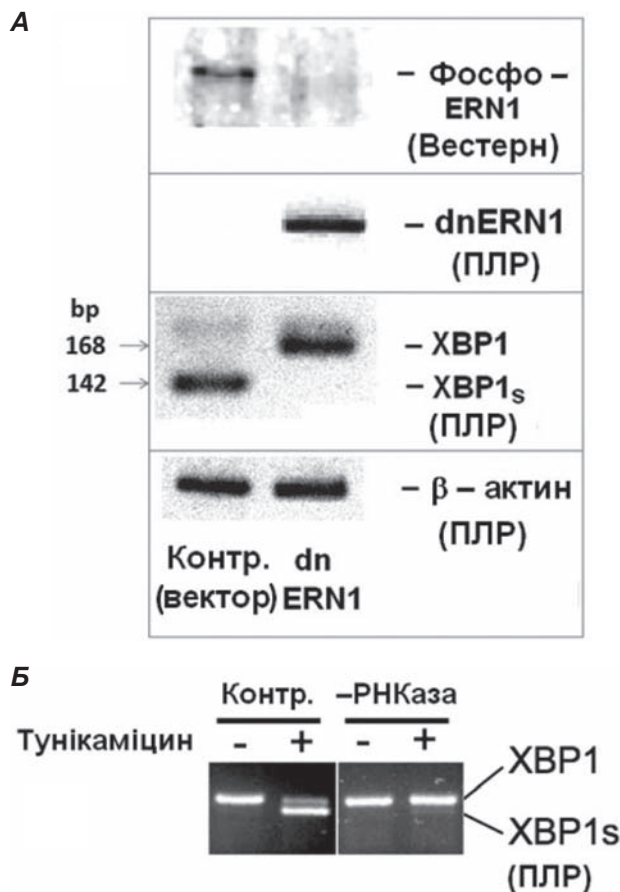


Рис. 5. Вплив тунікаміцину (0,01 мг/мл – 2 год) на: А – рівень фосфорильованої форми ERN1 (фосфо-ERН1), визначеної за допомогою вестерн-блот аналізу), а також на рівень експресії мРНК домінантнегативної конструкції ERN1 (dnERN1) і транскрипційного фактора (XBP1) та його альтернативного сплайс-варіанта (XBP1s) за даними полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у клітинах гліоми лінії U87, трансфікованих вектором (контр.), та в сублінії цих клітин, стабільно трансфікованих dnERN1-конструкцією; Б – рівень експресії мРНК XBP1 та XBP1s у клітинах гліоми лінії U87, стабільно трансфікованих мутантною за ендорибонуклеазою конструкцією ERN1 (РНКаза) [66]

сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула для росту злоякісних пухлин, зокрема гліоми (рис. 6).

Доцільно відмітити, що сенсорно-сигнальний шлях стресу ендоплазматичного ретикулула ERN1 не є ізольованим у клітині, він тісно взаємодіє з обома іншими сенсорно-сигнальними шляхами стресу (PERK та ATF6), але всі ці шляхи стресу ендоплазматичного ре-

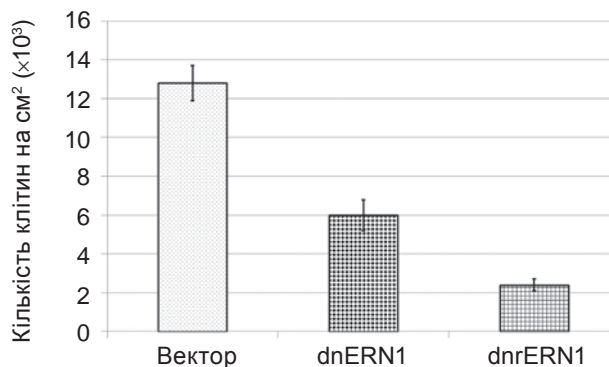


Рис. 6. Ріст клітин гліоми лінії U87, трансфікованих вектором, та в сублінії цих клітин із пригніченою функцією ERN1, трансфікованих dnERN1 (без ензиматичної активності) або dnrERN1 (з мутантною ендорибонуклеазою) [66]

тикулула також контролюються низкою важливих протеїнкіназ та факторів [68–70].

Таким чином, сенсорно-сигнальний шлях ERN1 є ключовим модулятором злоякісного росту, оскільки саме він забезпечує основну регуляцію експресії низки проангіогенних факторів, серед яких VEGF-A, IL-6 (інтерлейкін-6), IL-1β та IL-8 [53]. Цей шлях регулює експресію сотень генів, які контролюють процеси проліферації та інвазивності пухлинних клітин через транскрипційний фактор XBP1. До них належать гени ростових і ангіогенних факторів, генів біологічного годинника, протеїнкіназ та протеїнфосфатаз, транскрипційних факторів і пухлинних супресорів, циклінів і циклінзалежних кіназ, генів шаперонів і проапоптотичних факторів, транспорту та метаболізму глюкози та багато інших [13, 30, 53, 62, 63, 71–76].

Так, недавно було встановлено, що рівень експресії всіх основних генів біологічного годинника в клітинах гліоми лінії U87 істотно залежить від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1, оскільки виключення цього сигнального шляху стресу ендоплазматичного ретикулула в клітинах гліоми призводило до різних за величиною і напрямленням змін в експресії циркадіальних генів [75]. Причому експресія трьох із них (PER1, PER3 та CLOCK) істотно зростала, а експресія інших (PER2, BMAL1, BMAL2, CRY1 та DEC2) – знижувалася. Оскільки функція біологічного годинника в злоякісних пухлинах є порушеною, то збільшення рівня експресії генів, що виявляють значну протипухлинну дію, в клітинах



гліоми у разі виключення сенсорно-сигнального ензиму ERN1 може бути причетним до опосередкованого стресом ендоплазматичного ретикулула посилення проліферативних процесів у злюкисних пухлинах і узгоджується з даними про значне пригнічення росту пухлин *in vivo* із клітин гліоми без функціонального активного ERN1 [74, 75].

Великий інтерес викликають також дані досліджень експресії генів *RBI* (ретинобластома 1) та *RBL1* (подібний до ретинобластоми 1), а також генів, що кодують синтез асоційованих з ними протеїнів, у клітинах гліоми з виключеною функцією гену *ERN1* [67]. Протеїни, що кодуються генами *RBI* та *RBL1*, є пухлинними супресорами і збільшення їх експресії, як і більшості асоційованих із ретинобластою протеїнів, а особливо транскрипційного фактора *E2F1*, повністю узгоджується із пригніченням проліферативних процесів в умовах виключення функції гену *ERN1*.

Представлені вище дані свідчать про залежність експресії основних генів біологічного годинника та групи генів пухлинного супресора *RBI* від стресу ендоплазматичного ретикулула, а саме від сенсорно-сигнального шляху ERN1, і розкривають деякі сторони молекулярних механізмів впливу стресу ендоплазматичного ретикулула на процеси проліферації та росту злюкисних пухлин. А це відкриває можливості ідентифікації нових генів-мішеней для пошуку перспективних шляхів впливу на ріст різних злюкисних новоутворень.

За вивчення ефектів гіпоксії на експресію великого числа генів, залежних від функції сенсорно-сигнального шляху ERN1, було показано, що більшість клітин гліоми є залежними від гіпоксії і що величина ефекту гіпоксії на їх експресію, а інколи і на спрямованість змін, здебільшого істотно залежать від функціональної активності ERN1 [62, 63, 65–67, 71–73, 79]. Так, за дослідження впливу гіпоксії на експресію генів у контрольних клітинах гліоми лінії U87 та клітинах гліоми із пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1 за гіпоксії було виявлено три різних варіанти змін в експресії генів. Це можна продемонструвати на прикладі генів *RBL1*, *E2F1* та *PFKL*. Типовим варіантом змін в експресії генів за гіпоксії є зміни одного спрямування в обох типах клітин гліоми, причому виключення функції гену *ERN1* зменшує ефект гіпоксії, що характерно, зокрема, для гена *RBL1*.

Іншими варіантами гіпоксичної регуляції є наявність змін в експресії генів (як по-

силення, так і зменшення) лише в одному із варіантів клітин: у контрольних клітинах гліоми лінії U87 або лише у клітинах гліоми із пригніченою функцією сигнального ензиму ERN1. Так, гіпоксія впливає на експресію гену *E2F1* лише в клітинах із виключеною функцією сигнального ензиму ERN1, а експресія гену *PFKL* – лише в контрольних клітинах гліоми. Варто зазначити, що різке збільшення експресії гену *PFKL*, ключового гену гліколізу, в контрольних клітинах гліоми в умовах гіпоксії повністю узгоджується з агресивним характером росту гліом та залежністю інтенсивності їх росту від гіпоксії і гліколізу, причому виключення функції сигнального ензиму ERN1 повністю блокує ефекти гіпоксії на гліколіз [34, 37, 40, 80].

Таким чином, виключення функції ERN1, основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулула, призводить до пригнічення росту пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії генів, що контролюють процеси гліколізу, ангиогенезу та проліферації [53, 66, 67, 71–73, 77–81]. Залежність гіпоксичної регуляції експресії генів від функції сенсорно-сигнального ензиму ERN1 можна пояснити тим, що ефекти гіпоксії здебільшого опосередковані транскрипційним фактором HIF, а його рівень залежить не лише від рівня кисню, а і від сигнальних шляхів, що опосередковують процеси проліферації, зокрема від PI3K (фосфоінозитид-3-кінази), MAPK (протеїнкіназ, що активуються міогеном) та протеїнкінази AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, що являє собою протеїнкіназу B, PKB) шляхів, які, в свою чергу, залежать від сигнального шляху ERN1 [82].

Стрес ендоплазматичного ретикулула відіграє важливу роль не лише в рості злюкисних пухлин, а і в розвитку цілої низки інших захворювань, серед яких: нейродегенерація, захворювання серця, метаболічні захворювання і, зокрема, ожиріння та цукровий діабет [10, 28, 43, 56]. І хоча ERN1-опосередкований сигнальний каскад є найконсервативнішим з усіх трьох, показано, що регуляція стресу ендоплазматичного ретикулула може мати тканинносPECIFIC характер через формування індивідуальних динамічних регуляторних комплексів протеїнів та селективну активацію каталітичних властивостей ERN1 пептидами, продуктами його специфічного розщеплення, які захищають клітини від стресу [33]. Більше того, ERN1-залежний шлях апоптозу клітин може мати також додаткову регуляцію з боку певних, пов'язаних

з апоптозом протеїнів, які, як було встановлено, взаємодіють з ERN1 і регулюють його активність, зміщуючи сигналінг у напрямку запуску смерті клітини чи пристосування до стресу [10].

Ендоплазматичний ретикулум є надзвичайно чутливою до змін гомеостазу внутрішньоклітинною органелою, що проводить надзвичайно точний контроль якості протеїнів, які проходять тут процес згортання і дозрівання перед переходом їх до апарату Гольджі, причому всі незгорнуті чи неправильно згорнуті протеїни затримуються і обов'язково знищуються [22]. А тому реакція клітин на незгорнуті в ендоплазматичному ретикулумі протеїни є необхідною для збереження його функціональної цілісності і попереджає оксидативний стрес [15].

Таким чином, гіпоксія є одним із чинників, що індукують стрес ендоплазматичного ретикулума, причому як гіпоксія, так і стрес ендоплазматичного ретикулума є необхідними компонентами росту злоякісних пухлин і значною мірою контролюють процеси метаболізму в них. Всі три сенсорно-сигнальні системи стресу є важливими в регуляції злоякісного росту, причому вони тісно взаємодіють між собою, а також із гіпоксією. Виключення функції ERN1 – основного сенсорно-сигнального ензиму стресу ендоплазматичного ретикулума – знижує інтенсивність росту пухлин і змінює характер гіпоксичної регуляції експресії багатьох генів, які контролюють процеси проліферації та гліколізу. Сенсорно-сигнальний шлях ERN1 контролює експресію великої групи генів, залежних від стресу ендоплазматичного ретикулума, а також і від гіпоксії, і є важливим фактором росту злоякісних пухлин.

### **СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА, ЕГО СЕНСОРНО-СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ И РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ РОСТЕ И ГИПОКСИИ**

*А. Г. Минченко, А. П. Харьковская,  
Т. В. Бакалец, И. В. Кривдюк*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев,  
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Гипоксия является одним из индукторов экспрессии большой группы генов, которые контролируют гликолиз и процессы пролифе-

рации в условиях сниженного уровня кислорода или уменьшенного его потребления. Вместе с тем, гипоксия является одним из факторов, индуцирующих стресс эндоплазматического ретикулума, который, как и гипоксия, является обязательным компонентом злокачественного роста и связан с цитоплазмой и ядром тремя сенсорно-сигнальными системами: PERK, ATF6 та ERN1. Выключение функции ERN1 – основного сенсорно-сигнального энзима стресса эндоплазматического ретикулума – приводит к снижению интенсивности роста опухолей и меняет характер гипоксической регуляции экспрессии многих генов, контролирующих процессы пролиферации и гликолиза. Сенсорно-сигнальный путь ERN1 контролирует экспрессию большой группы генов, зависимых от стресса эндоплазматического ретикулума, а также и гипоксии, и является важным фактором роста злокачественных опухолей.

**Ключевые слова:** стресс эндоплазматического ретикулума, гипоксия, экспрессия генов, ERN1, HIF, гликолиз, пролиферация, злокачественные опухоли.

### **ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS, ITS SENSOR AND SIGNALLING SYSTEMS AND THE ROLE IN REGULATION OF GENE EXPRESSION AT MALIGNANT TUMOR GROWTH AND HYPOXIA**

*O. H. Minchenko, A. P. Kharkovska,  
T. V. Bakalets, I. V. Kryvdiuk*

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Hypoxia is one of the inducers of the expression of a large group of genes, which control glycolysis and proliferation processes in low oxygen conditions or as a result of low oxygen consumption. Moreover, hypoxia is one of the factors which induce the endoplasmic reticulum stress which, like hypoxia, is an obligatory component of malignant tumor growth and is connected with cytoplasm and nuclei through three sensor and signalling systems: PERK, ATF6 and ERN1. The suppression of ERN1, the main sensing and signalling enzyme of endoplasmic reticulum stress, leads to a decrease of tumor growth and changes the character of hypoxic regulation of many genes responsible for the control of proliferation and glycolysis. ERN1 sensing and signalling system controls the expression of a large set of genes, which

are dependent on endoplasmic reticulum stress as well as hypoxia. Moreover, this signalling pathway is an important factor of malignant tumor growth.

**Key words:** endoplasmic reticulum stress, hypoxia, gene expressions, ERN1, HIF, glycolysis, proliferation, malignant tumors.

1. Kaufman R. J. // J. Clin. Invest. – 2002. – **110**, N 10. – P. 1389–1398.
2. Chakrabarti A., Chen A. W., Varner J. D. // Biotechnol. Bioengineer. – 2011. – **108**, N 12. – P. 2777–2793.
3. Shen X., Zhang K., Kaufman R. J. // J. Chem. Neuroanat. – 2004. – **28**, N 1–2. – P. 79–92.
4. Wu J., Kaufman R. J. // Cell Death Differ. – 2006. – **13**, N 3. – P. 374–384.
5. Hetz C., Glimcher L. H. // Mol. Cell. – 2009. – **35**, N 5. – P. 551–561.
6. Luo D., He Y., Zhang H., Yu L. et al. // J. Biol. Chem. – 2010. – **283**, N 18. – P. 11905–11912.
7. Saito A., Ochiai K., Kondo S. et al. // J. Biol. Chem. – 2011. – **286**, N 6. – P. 4809–4818.
8. Korennykh A. V., Egea P. F., Korostelev A. A. et al. // Nature. – 2009. – **457**, N 7230. – P. 687–693.
9. Badiola N., Penas C., Minano-Molina A. et al. // Cell Death Disease. – 2011. – **2**. – P. e149.
10. Woehlbier U., Hetz C. // Trends Biochem. Sci. 2011. – **36**, N 6. – P. 329–337.
11. Park S. W., Zhou Y., Lee J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – **107**, N 45. – P. 19320–19325.
12. Schröder M. // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – **65**, N 6. – P. 862–894.
13. Aragyn T., van Anken E., Pincus D. et al. // Nature. – 2009. – **457**, N 7230. – P. 736–740.
14. Liu C. Y., Kaufman R. J. // J. Cell Sci. – 2003. – **116**, Pt 10. – P. 1861–1862.
15. Kaufman R. J., Back S. H., Song B. et al. // Diabetes Obes. Metab. – 2010. – **12**, Suppl. 2. – P. 99–107.
16. Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L. M. et al. // Nat. Cell Biol. – 2000. – **2**, N 6. – P. 326–332.
17. Backer M. V., Backer J. M., Chinnaiyan P. // Methods Enzymol. – 2011. – **491**. – P. 37–56.
18. Blais J. D., Filipenko V., Bi M. et al. // Mol. Cell. Biol. – 2004. – **24**, 17. – P. 7469–7482.
19. Fels D. R., Koumenis C. // Cancer Biol. Therap. – 2006. – **5**, N 7. – P. 723–728.
20. Lee S. K., Kim Y. S. // Int. J. Oncol. – 2013. – **42**, N 3. – P. 810–816.
21. Gentz S. H., Bertollo C. M., Souza-Fagundes E. M., da Silva A. M. // J. Pharm. Pharmacol. – 2013. – **65**, N 3. – P. 430–440.
22. Marciniak S. J., Ron D. // Physiol. Rev. – 2006. – **86**. – P. 1133–1149.
23. Cao J., Dai D. L., Yao L. et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2012. – **364**, N 1–2. – P. 115–129.
24. Wang M., Ye R., Barron E. et al. // Cell Death Differ. – 2010. – **17**, N 3. – P. 488–498.
25. Farias M., Puebla C., Westermeier F. et al. // Cardiovasc. Res. – 2010. – **86**, N 1. – P. 45–54.
26. Woo C. W., Cui D., Arellano J. et al. // Nat. Cell Biol. – 2009. – **11**, N 12. – P. 1473–1480.
27. Kyriakakis E., Philippova M., Joshi M. B. et al. // Cell. Signall. – 2010. – **22**. – P. 1308–1316.
28. Wang S., Kaufman R. J. // J. Cell. Biol. – 2012. – **197**, N 7. – P. 857–867.
29. Zhou J., Liu C. Y., Back S. H. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**, N 39. – P. 14343–14348.
30. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A. et al. // Mol. Cell. – 2007. – **27**, N 1. – P. 53–66.
31. Hollien J., Lin J. H., Li H. et al. // J. Cell Biol. – 2009. – **186**, N 3. – P. 323–331.
32. Han D., Upton J. P., Hagen A. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2008. – **365**, N 4. – P. 777–783.
33. Bouche-careilh M., Higa A., Fribourg S., Moenner M. // FASEB J. – 2011. – **25**, N 9. – P. 3115–3129.
34. Denko N. C. // Nat. Rev. Cancer. – 2008. – **8**, N 9. – P. 705–713.
35. Wolf A., Agnihotri S., Micallef J. et al. // J. Exp. Medicine. – 2011. – **208**, N 2. – P. 313–326.
36. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. L. et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 8. – P. 6183–6187.
37. Bartrons R., Caro J. // J. Bioenerg. Biomembr. – 2007. – **39**, N 3. – P. 223–229.
38. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. // FEBS Lett. – 2004. – **576**, N 1. – P. 14–20.
39. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I.L. et al. // Biochimie. – 2005. – **87**, N 11. – P. 1005–1010.
40. Chesney J. // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2006. – **9**, N 5. – P. 535–539.
41. Zou J., Li P., Lu F. et al. // J. Hematol. Oncol. – 2013. – **6**, N 1. – P. 3.
42. Feldman D. E., Chauhan V., Koong A. C. // Mol. Cancer Res. – 2005. – **3**, N 11. – P. 597–605.
43. Zhang K., Kaufman R. J. // Neurology. – 2006. – **66**, N 2 Suppl 1. – P. S102–S109.
44. Magagnin M. G., Koritzinsky M., Wouters B. G. // Drug Resist. Updat. – 2006. – **9**, N 4–5. – P. 185–197.



45. Moenner M., Pluquet O., Bouche-careilh M., Chevet E. // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, N 22. – P. 10631–10634.
46. Nagelkerke A., Bussink J., Mujcic H. et al. // *Breast Cancer Res.* – 2013. – **15**, N 1. – P. R2. [Epub ahead of print].
47. Bobrovnikova-Marjon E., Grigoriadou C., Pytel D. et al. // *Oncogene.* – 2010. – **29**, N 27. – P. 3881–3895.
48. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D. et al. // *Cancer Res.* – 2004. – **64**. – P. 5943–5947.
49. Koumenis C. E. // *Curr. Mol. Med.* – 2006. – **6**, N 1. – P. 55–69.
50. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M. et al. // *EMBO J.* – 2005. – **24**, N 19. – P. 3470–3481.
51. Mahadevan N. R., Rodvold J., Sepulveda H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – **108**, N 16. – P. 6561–6566.
52. Mahadevan N. R., Zanetti M. // *J. Immunol.* – 2011. – **187**, N 9. – P. 4403–4409.
53. Auf G., Jabouille A., Guerit S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – **107**, N 35. – P. 15553–15558.
54. Romero-Ramirez L., Cao H., Regalado M. P. et al. // *Translat. Oncology.* – 2009. – **2**, N 1. – P. 31–38.
55. Thorpe J. A., Schwarze S. R. // *Cell Stress Chaperones.* – 2010. – **15**, N 5. – P. 497–508.
56. Cao S. S., Kaufman R. J. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2013. – Jan 17. [Epub ahead of print].
57. Drogat B., Bouche-careilh M., North S. et al. // *J. Cell. Physiol.* – 2007. – **212**. – P. 463–472.
58. Koumenis C., Naczki C., Koritzinsky M. et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – **22**, N 21. – P. 7405–7416.
59. Ozawa K., Kuwabara K., Tamatani M. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N 10. – P. 6397–6404.
60. Neelam S., Brooks M.M., Cammarata P. R. // *Mol. Vis.* – 2013. – **19**. – P. 1–15.
61. Mozos A., Roue G., Lopez-Guillermo A. et al. // *Am. J. Pathol.* – 2011. – **179**, N 5. – P. 2601–2610.
62. Minchenko D. O., Karbovskiy L. L., Danilovskiy S. V. et al. // *Nat. Sci.* – 2012. – **4**, N 1. – P. 38–46.
63. Minchenko D. O., Kharkova A. P., Hubenia O. V., Minchenko O. H. // *Endocr. Regul.* – 2013. – **47** (1). – P. 15–26.
64. Drogat B., Auguste P., Nguyen D. T. et al. // *Cancer Res.* – 2007. – **67**. – P. 6700–6707.
65. Minchenko D. O., Hubenya O. V., Terletsky B. M. et al. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 1. – С. 18–29.
66. Minchenko D. O., Kubajchuk K. I., Ratushna O. O. et al. // *Adv. Biol. Chem.* – 2011. – **2**, N 2. – P. 198–206.
67. Minchenko D. O., Karbovskiy L. L., Danilovskiy S. V. et al. // *Am. J. Mol. Biol.* – 2012. – **2**, N 1. – P. 21–31.
68. Lee J., Sun C., Zhou Y. et al. // *Nat. Med.* – 2011. – **17**. – P. 1251–1260.
69. Park S. W., Zhou Y., Lee J. et al. // *Nat. Med.* – 2010. – **16**. – P. 429–437.
70. Zhou Y., Lee J., Reno C. M. et al. // *Nat. Med.* – 2011. – **17**. – P. 356–365.
71. Minchenko D., Hubenya O., Terletsky B. et al. // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska.* – 2010. – **23**, N 3. – P. 179–184.
72. Minchenko D. O., Hubenya O. V., Terletsky B. M. et al. // *Physics Alive.* – 2010. – **18**, N 2. – P. 110–120.
73. Minchenko D. O., Karbovskiy L. L., Danylovskiy S. V. et al. // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, N 1. – P. 57–68.
74. Карбовський Л. Л., Мінченко Д. О., Гармаш Я. А., Мінченко О. Г. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 2. – С. 5–24.
75. Karbovskiy L. L., Minchenko D. O., Danylovskiy S. V. et al. // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, N 2. – P. 37–50.
76. Мінченко Д. О., Губеня О. В., Харькова А. П. та ін. // *Наук. вісник НМУ ім. О. О. Богомольця.* – 2011. – № 1(32). – С. 26–34.
77. Lyrova N. M., Minchenko D. O., Kubaichuk K. I., Minchenko O. H. // *Physics Alive.* – 2011. – **19**, N 1. – P. 40–51.
78. Minchenko D. O., Marunych R. Y., Khomenko E. V. et al. // *Studia Biologica.* – 2011. – **5**, N 3. – P. 5–18.
79. Kubaichuk K. I., Minchenko D. O., Danilovskiy S. V. et al. // *Studia Biologica.* – 2012. – **6**, N 3. – P. 15–28.
80. Kang F. W., Gao Y., Que L. et al. // *Exp. Ther. Med.* – 2013. – **5**, N 1. – P. 112–118.
81. Agani F., Jiang B. H. // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2013. – Jan 2. [Epub ahead of print]
82. Marunych R. Y., Minchenko D. M., Kubaichuk K. I. et al. // *Physics Alive.* – 2011. – **19**, N 1. – P. 52–60.

Отримано 20.03.2013