

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ СИНТЕЗУ СЕРИНУ В НОРМАЛЬНИХ І  
ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ПРИ ІНГІБУВАННІ ERN1**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія та біохімія  
Хіхла Євгена Петровича

Науковий керівник від кафедри  
д-р біол. наук, ст. наук. співроб.  
Андрійчук Т.Р.

Робота виконана у відділі молекулярної біології Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом завідувача відділу  
молекулярної біології, д-ра біол. наук, проф., члена-кореспондента НАН  
України Мінченка Олександра Григоровича

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2026 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ER	–	ендоплазматичний ретикулум;	
CEP	–	стрес ендоплазматичного ретикулума;	
ACTB	–	beta-actin gene (ген бета-актину);	
ATF4	–	activating transcription factor 4 (активуючий транскрипційний фактор 4);	
ATF6	–	activating transcription factor 6 (активуючий транскрипційний фактор 6);	
dnERN1	–	dominant/negative construct ERN1 gene (домінантно/негативна конструкція гена ERN1);	
ER	–	endoplasmic reticulum;	
ERN1	–	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 gene (ген сигналіngu від ендоплазматичного ретикулума до ядра 1);	
HSPAS	–	heat shock protein family A member 5 (білок теплового шоку 5 типу);	
IRE1	–	inositol requiring enzyme-1 (залежний від інозитулу ензим-1);	
PERK	–	PRK-like ER kinase (подібна до PRK кіназа ендоплазматичного ретикулума);	
PHGDH	–	phosphoglycerate dehydrogenase (фосфогліцератдегідрогеназа);	
PSAT1	–	phosphoserine aminotransferase (фосфосеринамінотрансфераза 1);	1
PSPH	–	phosphoserine phosphatase (фосфосеринфосфатаза);	
RIDD	–	regulated IRE1 dependent decay (регульований IRE1 залежний розпад);	
SEM	–	standard error meaning (стандартна похибка середнього);	
SHMT1	–	serine hydroxymethyltransferase (серингідроксиметилтрансфераза 1);	1
XPB1	–	X-box binding protein 1 (X-бокс зв'язуючий білок 1);	

XPB1s – X-box binding protein 1, spliced form (вкорочений альтернативний сплайс-варіант мРНК X-бокс зв'язуючого протеїну 1).

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Стрес ендоплазматичного ретикулума та роль серину у метаболізмі .....	8
1.1. Стрес ендоплазматичного ретикулума.....	8
1.1.1. Сенсорно-сигнальні каскади стресу ендоплазматичного ретикулума .....	8
1.1.2. Основні функції стресу ендоплазматичного ретикулума.....	10
1.1.3. Роль ERN1 у сигнальній відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума .....	12
1.1.4. Отримання культур клітин з модифікаціями ERN1 .....	14
1.1.5. Взаємозв'язок стресу ендоплазматичного ретикулума та розвитку злоякісних пухлин .....	15
1.2. Функціональне значення серину та його метаболізм .....	17
1.2.1. Значення серину у здорових та пухлинних клітинах.....	17
1.2.2. Основні біохімічні ланцюжки синтезу серину .....	18
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень .....	21
2.1. Реактиви, прилади та матеріали .....	21
2.1.1. Реактиви .....	21
2.1.2. Прилади .....	22
2.1.3. Клітинні лінії та умови культивування .....	22
2.2. Методи .....	24
2.2.1. Виділення РНК .....	24
2.2.2. Сайленсінг ERN1 та XBP1 за допомогою міРНК.....	25
2.2.3. Синтез кДНК за допомогою методу зворотної транскрипції.....	26
2.2.4. Кількісний ПЛР аналіз .....	26
2.2.5. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК у агарозному гелі.....	29
2.2.6. Вестерн-блот аналіз.....	29

	5
2.2.7. Статистичний аналіз.....	30
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....</b>	<b>31</b>
3.1. Вплив протеїну ERN1 на експресію генів, залучених у синтез та метаболізм серину .....	31
3.2. Аналіз рівня протеїну PSAT1 у клітинах гліобластоми за умов пригнічення ERN1 .....	38
3.3. Регуляція експресії PSAT1 за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, гіпоксії та дії гідрокортизону .....	40
3.4. Сайленсінг мРНК ERN1 та XBP1 за допомогою специфічних міРНК ....	46
3.5. Обговорення результатів .....	48
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>53</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>54</b>

## ВСТУП

Трансформація пухлинних клітин супроводжується глибокими метаболічними змінами, які забезпечують їх пристосування до несприятливих умов. Одним із механізмів такої адаптації є активація шляхів стресу ендоплазматичного ретикулула (СЕР), що підтримують ріст і проліферацію пухлин [1]. Важливою складовою цієї перебудови є також посилення синтезу серину. Для багатьох злоякісних пухлин цей шлях є необхідним для росту, проліферації та формування стійкості до терапії [2]. Хоча частина пухлин може використовувати позаклітинний серин, багато з них залежать саме від його синтезу *de novo* [1,2].

Одним із ключових компонентів відповіді на незгорнуті білки є ERN1. Пригнічення цього сенсорно-сигнального протеїну в клітинах гліобластоми зменшує ріст і проліферацію пухлин *in vivo* та підвищує їх чутливість до хіміотерапії [3]. ERN1 забезпечує сплайсинг мРНК ХВР1 з утворенням форми ХВР1s, яка кодує транскрипційний фактор, залучений до регуляції фолдингу та деградації неправильно згорнутих протеїнів. Крім того, ERN1 бере участь у деградації інших мРНК через механізм RIDD, зменшуючи синтез менш важливих для клітини білків за умов стресу [4, 5].

Синтез серину *de novo* контролюється ферментами PHGDH, PSAT1 та PSPH [2]. Підвищений рівень *PHGDH* часто виявляється у пухлинах і сприяє їх росту [6]. *PSAT1*, експресія якого регулюється через ATF4, пов'язаний із проліферацією пухлинних клітин [7]. PSPH також бере участь у підтримці пухлинного росту [8]. Важливу роль у метаболізмі серину відіграє і SHMT1, який асоціюється з проліферацією та інвазивністю пухлин [9]. Тому аналіз експресії генів, пов'язаних із синтезом і метаболізмом серину, за умов блокади ERN1 є важливим для розуміння механізмів розвитку пухлин і пошуку нових терапевтичних мішеней.

Метою даної роботи було оцінити вплив пригнічення стресу ендоплазматичного ретикулума на експресію генів, що беруть участь у синтезі та метаболізмі серину.

Основними завданнями роботи є:

1. Вивчити вплив блокади сигнального протеїну ERN1 на експресію генів, відповідальних за метаболізм серину;
2. Дослідити дію міРНК на експресію генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* та *SHMT1* у контрольних клітинах гліобластоми;
3. Оцінити вплив тунікаміцину на експресію досліджуваних генів у культурі клітин гліобластоми з пригніченою ендорибонуклеазною активністю сигнального протеїну ERN1.
4. Проаналізувати регуляцію експресії гена *PSAT1* за умов дії різних стресових факторів, зокрема стресу ендоплазматичного ретикулума, гіпоксії та глюкокортикоїдного гормону гідрокортизону.

Отже, вивчення цієї проблематики є важливим не лише для з'ясування механізмів розвитку онкологічних захворювань, а й для пошуку нових підходів до терапії пухлин.

# РОЗДІЛ 1

## СТРЕС ЕНДОПЛАЗМАТИЧНОГО РЕТИКУЛУМА ТА РОЛЬ СЕРИНУ У МЕТАБОЛІЗМІ

### 1.1. Стрес ендоплазматичного ретикулума

Ендоплазматичний ретикулум (ЕР) виконує в клітині одну з ключових функцій, пов'язаних із забезпеченням правильного згортання новосинтезованих білків. Підтримання цього процесу здійснюється за участю білків-шаперонів, які не лише сприяють коректному фолдингу поліпептидних ланцюгів, але й забезпечують розпізнавання накопичення незгорнутих або аномально згорнутих протеїнів. У разі порушення цього балансу активуються спеціалізовані сенсорно-сигнальні каскади, через які клітина реагує на зміни у стані ендоплазматичного ретикулума. Таку сукупну відповідь на розлади процесів білкового згортання називають стресом ендоплазматичного ретикулума (СЕР) [10–12].

#### 1.1.1. Сенсорно-сигнальні каскади стресу ендоплазматичного ретикулума

Стрес ЕР може розвиватися під впливом багатьох чинників, серед яких як надлишок, так і нестача глюкози, посилений синтез секреторних протеїнів, гіпоксія, порушення окисно-відновного балансу, зміни кальцієвого гомеостазу, а також розлади глікозилювання поліпептидів. Окрім цього, його можуть індукувати токсичні сполуки, дія яких супроводжується накопиченням пошкоджених білків безпосередньо в ендоплазматичному ретикулумі. Щоб обмежити подальше нагромадження дефектних протеїнів,

клітини еукаріотів мають спеціалізовані сенсорно-сигнальні системи, які забезпечують передавання сигналу від ER до цитозоля та ядра.

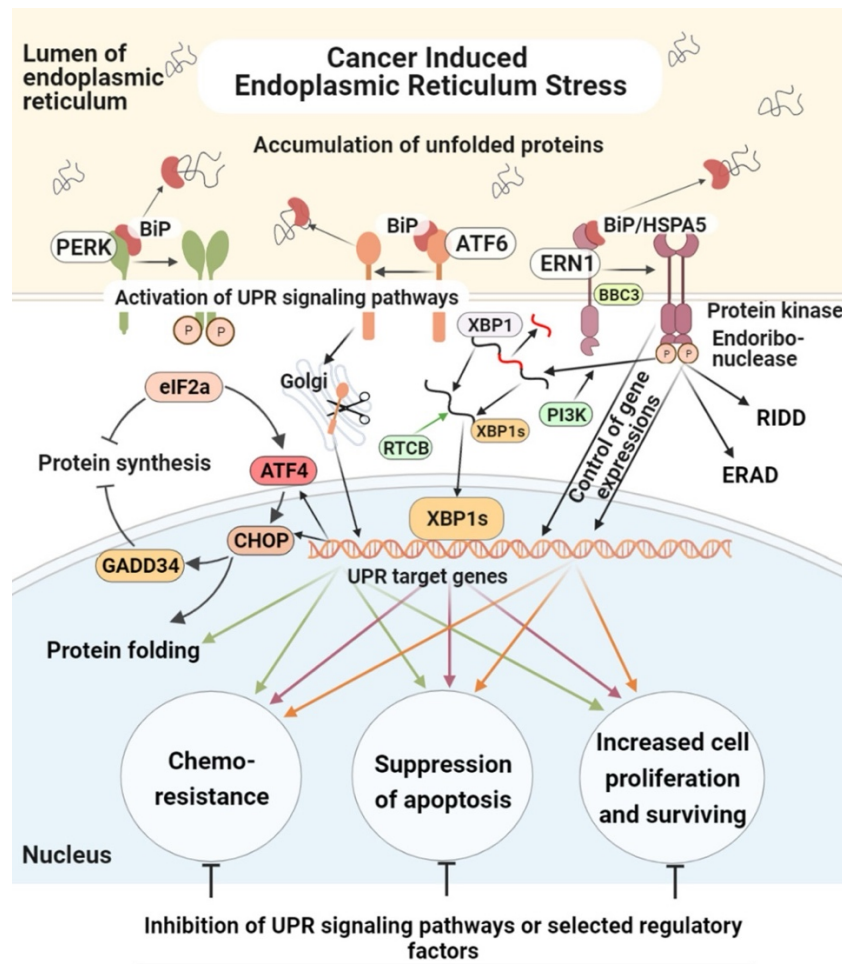
На сьогодні виділяють три основні системи, що здатні розпізнавати незгорнуті, пошкоджені або некоректно згорнуті протеїни, які накопичуються в просвіті ендоплазматичного ретикулума:

- PERK — мембранозв'язану кіназу, споріднену з PRK;
- ERN1/IRE1 — білок, який передає сигнали від ER до ядра;
- ATF6 — фактор активації транскрипції 6.

Із цих сенсорно-сигнальних шляхів найважливіше значення в реалізації CER має саме каскад, опосередкований ERN1 [11, 13–17].

На рис. 1.1 наведено головні сенсорно-сигнальні системи CER, які активуються за накопичення в його люмені незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів. Після ініціації CER надходження новосинтезованих білків до люмену ER тимчасово обмежується, тоді як уже наявні незгорнуті поліпептиди за участю білків-шаперонів проходять фолдинг. Ті протеїни, які не набули правильної третинної структури, підлягають деградації, що дає змогу клітині зберігати життєздатність. За тривалої або надмірної дії стресових чинників ця адаптивна відповідь може змінюватися переходом до апоптозу [18].

CER є одним із ключових механізмів, що забезпечують нормальне функціонування клітини та підтримання її внутрішнього гомеостазу. Його реалізація відбувається за участю трьох основних сенсорно-сигнальних шляхів, які спільно координують транскрипційні й трансляційні процеси у клітині.



**Рис. 1.1.** Схематичне зображення ключових сенсорно-сигнальних шляхів відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула (ERN1, PERK та ATF6), що активуються у його люмені внаслідок накопичення неправильно або неповністю згорнутих білків. Активація цих шляхів призводить до суттєвого пригнічення ініціації трансляції через фосфорилування  $\alpha$ -субодиниці фактора ініціації трансляції eIF2 $\alpha$ , індукції синтезу молекулярних шаперонів (через ATF6-залежний механізм), деградації мРНК (RIDD), відновлення правильної конформації білків, а також активації транскрипції генів, асоційованих зі стрес-відповіддю, зокрема шляхом утворення активної форми XBP1 (XBP1s) [1]

### 1.1.2. Основні функції стресу ендоплазматичного ретикулула

Стрес ендоплазматичного ретикулула виконує низку взаємопов'язаних функцій, спрямованих на збереження клітинного гомеостазу та адаптацію

клітини до порушень білкового фолдингу. До основних функцій стресу ER належать:

- пригнічення загальної трансляції при одночасному вибіркового синтезі білків, безпосередньо залучених до реалізації адаптивної відповіді на стрес ER;
- запобігання перевантаженню ендоплазматичного ретикулума шляхом обмеження надходження новосинтезованих поліпептидів у його люмен, що знижує ймовірність накопичення надлишкової кількості білків, які потребують згортання;
- розпізнавання та деградація неправильно згорнутих або незгорнутих протеїнів, що накопичуються в ER і можуть чинити токсичний вплив на клітину;
- посилення синтезу білків-шаперонів і компонентів ERAD, що сприяє відновленню протеостазу, коректному фолдингу поліпептидів і видаленню дефектних білків;
- підтримання функціональної цілісності ендоплазматичного ретикулума для нормальної роботи шаперонних систем і попередження повторного надмірного накопичення аномально згорнутих протеїнів;
- перебудова метаболічних процесів, спрямована на забезпечення виживання клітини в умовах стресу, а за неможливості відновлення гомеостазу — ініціація апоптозу;
- запобігання розвитку оксидативного стресу, який може виникати вторинно внаслідок порушень білкового згортання та посиленого утворення реактивних форм кисню;
- активація аутофагії як додаткового адаптивного механізму, що сприяє видаленню пошкоджених клітинних компонентів і підвищує ймовірність виживання клітини за умов тривалого стресу;
- регуляція диференціації спеціалізованих клітин, особливо тих, що характеризуються високою інтенсивністю синтезу протеїнів, зокрема гепатоцитів, остеобластів і панкреатичних  $\beta$ -клітин [11, 14, 18, 19].

### 1.1.3. Роль ERN1 у сигнальній відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулула

Сигнальний шлях ERN1 реалізується за участю трансмембранного протеїну, у будові якого виділяють три основні структурні частини. До них належать люменальна сенсорна ділянка, трансмембранний фрагмент і цитозольний домен, що характеризується наявністю двох ферментативних активностей — серин/треонін-протеїнкіназної та ендорибонуклеазної. Схему будови протеїну ERN1, локалізованого в мембрані ендоплазматичного ретикулула, наведено на рис. 1.2.



**Рис. 1.2.** Схема доменної організації ERN1 — трансмембранного білка ендоплазматичного ретикулула. Його сенсорний N-кінцевий фрагмент локалізований у люмені ЕР, мембранний сегмент проходить крізь мембрану, а в цитозолі міститься біфункціональна каталізуюча частина. Остання включає два функціональні домени: кіназний, розміщений проксимальніше до мембрани, та ендорибонуклеазний, локалізований дистальніше, ближче до С-кінця білка [18]

За умов розвитку СЕР протеїн ERN1 переходить в активний стан унаслідок автофосфорилування його кіназного домену. Це супроводжується

димеризацією молекул ERN1 у мембрані ендоплазматичного ретикулума та одночасною активацією ендорибонуклеазної функції цього білка [16, 20]. Одним із головних наслідків такої активації є специфічне вирізання фрагмента з кодуючої послідовності мРНК транскрипційного фактора XBP1. У результаті формується сплайсований варіант мРНК — XBP1s. Саме ця форма кодує транскрипційний фактор зі зміненим С-кінцем, що виникає внаслідок зсуву рамки зчитування і відрізняється від вихідного білка за структурою.

XBP1s регулює експресію широкого кола генів, продукти яких беруть участь у дозріванні білків, їх правильному згортанні та елімінації аномально згорнутих протеїнів у ER [20]. До цієї групи належать, зокрема, гени білків-шаперонів, необхідних для фолдингу поліпептидів, а також фактори, пов'язані з ангіогенезом, проліферацією і контролем апоптозу. Разом з тим, і досі остаточно не встановлено, яким чином за умов стресу ендоплазматичного ретикулума координується вибір між активацією та пригніченням таких великих груп генів.

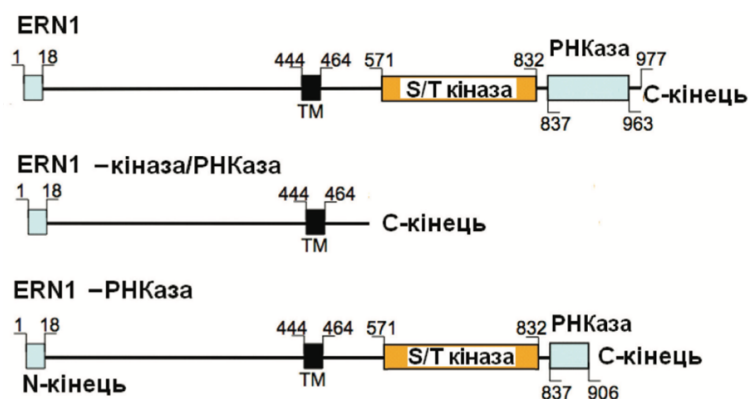
Ще одним важливим проявом функціонування ERN1 є RIDD — контрольована ендорибонуклеазою деградація окремих мРНК під час стресу ER. Завдяки цьому механізму клітина може послаблювати активність сигнальних шляхів, які перешкоджають відновленню її нормального стану. Окрему увагу привертають дані щодо сполук, які здатні селективно пригнічувати протеїназну активність ERN1, але водночас стимулювати його ендорибонуклеазну функцію. Такі ефекти можуть впливати на перебіг метаболічних процесів, що беруть участь у виході клітини зі стану стресу, однак відповідні механізми наразі залишаються недостатньо з'ясованими [21, 22].

Додатковий інтерес викликають результати робіт, у яких показано утворення пептидів унаслідок протеолітичного розщеплення біфункціонального протеїну IRE1. Припускають, що такі пептиди можуть впливати на активність самого білка та підвищувати стійкість клітини до можливого повторного розвитку стресу ендоплазматичного ретикулума [23].

### 1.1.4. Отримання культур клітин з модифікаціями ERN1

Варіант ERN1, у якому була інактивована лише рибонуклеазна активність, одержували шляхом усічення карбокситермінальної ділянки білка. Зокрема, мутант *dnrERN1* конструювали через вставлення послідовності *gatc* у 2812-ту позицію сайту рестрикції *VglII* (фрагмент 2799tctgtcagagatc"gatc"tcctccgagccatgagaaataa2833). Така модифікація спричиняла зсув рамки зчитування, внаслідок чого стоп-кодон з'являвся на 19 нуклеотидів далі. Якщо у IRE1 $\alpha$  дикого типу амінокислотна послідовність у ділянці 896–907 має вигляд -SVRDLLRAMRNK-, то у мутантного білка С-кінцевий фрагмент змінюється на -SVRDRSPPSHEK-COO.

Правильність сформованої кінцевої ділянки підтверджували методом ДНК-секвенування. Після цього модифікований ген субклонували у вектор *pcDNA3.1* і використовували для трансфекції клітин гліобластоми лінії U87. За аналогічним принципом було отримано і мутант *dnERN1*, який повністю позбавлений ензиматичної активності [24, 25]. Схематично результати модифікації протеїну ERN1 наведено на рис. 1.3.



**Рис. 1.3.** Схематичне представлення протеїну ERN1 та його модифікованих варіантів. Форма ERN1–кіназа/РНКаза (*dnERN1*) відповідає конструкції, у якій відсутні обидві ферментативні активності, тоді як ERN1–РНКаза (*dnrERN1*) містить порушення лише в домені ендорибонуклеази. Цифрами позначено окремі амінокислотні позиції в поліпептидному ланцюзі ERN1 [18]

Оцінку ефекту тунікаміцину, інгібітора IRE1, проводили за двома показниками: рівнем фосфорилування ERN1 і експресією сплайсованої форми мРНК XBP1 (XBP1s). У контрольних клітинах гліоми лінії U87 під впливом тунікаміцину спостерігали зростання обох цих показників, тоді як у клітинах dnERN1 подібної відповіді не було виявлено. Також було показано, що клітини з dnERN1 росли більш ніж удвічі повільніше порівняно з контрольними. Водночас у культурі клітин, де була пригнічена тільки ендорибонуклеазна активність ERN1, проліферативна активність виявилася ще нижчою [18].

### **1.1.5. Взаємозв'язок стресу ендоплазматичного ретикулума та розвитку злоякісних пухлин**

Стрес ЕР розглядають як ключову складову процесів, що супроводжують виникнення та подальше прогресування злоякісних пухлин. Його активація створює умови, за яких пухлинні клітини отримують додаткові переваги для росту, оскільки впливає на внутрішньоклітинні системи, пов'язані з метаболічною перебудовою, ангіогенезом і запальною відповіддю. Для трансформованих клітин характерні суттєві відхилення від нормального метаболізму, зокрема посилене споживання глюкози та накопичення продуктів її перетворення, таких як лактат і піруват. Такі зміни можуть бути пов'язані з порушенням роботи ендоплазматичного ретикулума, оскільки механізми СЕР функціонально поєднані з системами, що забезпечують виживання, ріст і проліферацію пухлинних клітин.

Ендоплазматичний ретикулум відіграє роль одного з основних внутрішньоклітинних центрів, який реагує на дію токсичних агентів і різноманітних стресових чинників, здатних спричиняти накопичення аномально згорнутих протеїнів. Якщо інтенсивність такого накопичення зростає, це стає сигналом для запуску стресу ЕР та активації його трьох

головних сенсорно-сигнальних гілок. Особливе місце серед них у пухлинних процесах посідає ERN1, оскільки саме через цей шлях відбувається координація експресії численних генів, необхідних клітині для адаптації до несприятливих умов, підтримання росту пухлини та її подальшого поширення [26].

Сучасні дані свідчать, що стрес ендоплазматичного ретикулула є не просто супутнім явищем пухлинного росту, а важливим механізмом патологічного перепрограмування клітин. Його розвиток супроводжується глибокими змінами метаболізму, які створюють умови для посилення проліферації, активації ангиогенезу та стимуляції прозапальних сигнальних процесів. Водночас СЕР здатен впливати і на характер імунної відповіді: у багатьох випадках він сприяє формуванню прозапального мікрооточення, залучаючи до цього не лише самі пухлинні клітини, а й прилеглі мієлоїдні елементи, що ускладнює подальше лікування [27–29].

Порушення гомеостазу ендоплазматичного ретикулула пов'язують із широким колом патологічних станів, серед яких важливе місце займають онкологічні захворювання. У таких умовах страждають процеси післятрансляційної модифікації білків, зокрема правильне формування дисульфідних зв'язків, глікозилювання та інші етапи, необхідні для нормального згортання протеїнів [30–33]. Саме тому зміни у функціонуванні ER розглядають як один із чинників, що підтримують прогресування пухлин.

Особливе значення в цьому контексті надають сигнальному шляху ERN1, який вважають одним із головних регуляторів агресивності пухлинних клітин та їх проліферативної активності. Через цей каскад контролюється експресія генів, що кодують медіатори запалення та проангіогенні фактори, зокрема IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 і VEGF-A [34–35]. Однак його роль не обмежується лише цими мішенями. Через транскрипційний фактор XBP1s ERN1 впливає на експресію великої кількості інших генів, які визначають інвазивність пухлинних клітин, темпи їх поділу та загальний характер адаптації до стресових умов. До цієї групи належать гени факторів росту, компонентів

циркадної системи, протеїнази, протеїнофосфатаз, білків-супресорів пухлин, циклінів, циклінзалежних кіназ, шаперонів, проапоптичних молекул і регуляторів обміну вуглеводів [36–39].

Таким чином, шлях ERN1 забезпечує масштабне переналаштування внутрішньоклітинних процесів, унаслідок чого пухлинні клітини не лише краще пристосовуються до несприятливих умов, а й набувають вищого потенціалу до патологічного росту. Отже, стрес ER є одним із ключових механізмів, що підтримують розвиток злоякісних новоутворень. З огляду на це, регуляція активності ERN1 може розглядатися як перспективний напрям протипухлинної терапії, спрямований на обмеження інвазивності пухлин і підвищення ефективності лікування.

## **1.2. Функціональне значення серину та його метаболізм**

### **1.2.1. Значення серину у здорових та пухлинних клітинах**

Серин належить до амінокислот, що мають важливе значення для клітинного метаболізму, оскільки бере участь у низці біохімічних процесів. У нормальних клітинах він входить до складу білків і слугує одним із субстратів для синтезу численних структурних та ферментативних протеїнів. Крім цього, серин використовується як попередник у біосинтезі інших сполук, зокрема гліцерофосфоліпідів, які є важливими компонентами клітинних мембран і забезпечують їх стабільність та функціональні властивості. Важливою є також його участь у фолатному циклі, де серин виступає донором одновуглецевих фрагментів, необхідних для синтезу нуклеотидів, а отже, для поділу клітин і репарації ДНК [40].

Окрім участі в структурних і метаболічних процесах, серин залучений і до регуляції клітинної сигналізації. Зокрема, його гідроксильна група може

бути мішенню для фосфорилювання, що впливає на активність багатьох білків, ферментів і сигнальних каскадів, пов'язаних із ростом та виживанням клітин.

Для злоякісних пухлин характерною є активація шляху синтезу серину, який у багатьох випадках є необхідним для підтримання проліферації та формування терапевтичної стійкості. Хоча окремі типи пухлин здатні задовольняти свої потреби за рахунок позаклітинного серину, інші, зокрема клітини гліоми, зберігають залежність від його *de novo* синтезу навіть за достатнього вмісту цієї амінокислоти в середовищі. Це створює можливість забезпечити підвищену потребу пухлинних клітин у компонентах для синтезу білків і нуклеїнових кислот. Однією з характерних особливостей таких клітин є посилена експресія ферментів, пов'язаних із біосинтезом і метаболізмом серину, насамперед фосфогліцератдегідрогенази [2–5, 41, 42].

Отже, порушення обміну серину є важливим елементом метаболічної перебудови пухлинних клітин, оскільки забезпечує умови для їх активного росту та проліферації. У зв'язку з цим серин-залежні метаболічні шляхи розглядаються як потенційні мішені для розробки нових підходів до протипухлинної терапії.

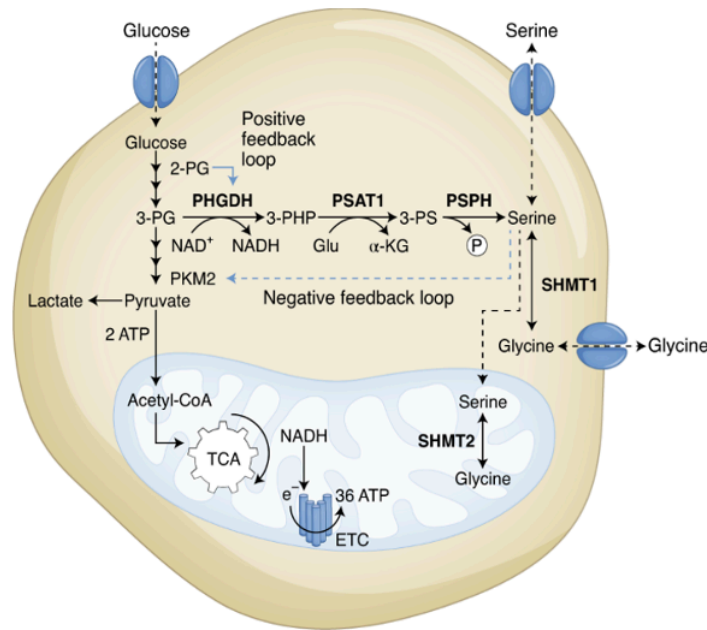
### 1.2.2. Основні біохімічні ланцюжки синтезу серину

Головний шлях утворення серину пов'язаний із проміжними продуктами гліколізу і стартує з 3-фосфогліцерату, який у результаті трьох послідовних ферментативних реакцій перетворюється на L-серин. На першому етапі фосфогліцератдегідрогеназа (PHGDH) каталізує окиснення 3-фосфогліцерату з утворенням 3-фосфогідроксипірувату. Для перебігу цієї реакції необхідний НАД<sup>+</sup>, а в деяких тканинах — НАДФ<sup>+</sup>, який у процесі відновлюється до НАДН або НАДФН, відповідно [6].

Далі в реакцію вступає фосфосеринамінотрансфераза 1 (PSAT1), яка переносить аміногрупу від глутамату на 3-фосфогідроксипіруват. Унаслідок цього утворюються 3-фосфосерин і  $\alpha$ -кетоглутарат. Коферментом для PSAT1 є піридоксальфосфат, який бере участь у перенесенні аміногруп у численних амінотрансферазних реакціях [7]. Завершальний етап каталізує фосфосеринфосфатаза (PSPH), що відщеплює фосфатний залишок від 3-фосфосерину, внаслідок чого формується L-серин [8].

Інтенсивність цього шляху контролюється за механізмом негативного зворотного зв'язку, оскільки серин може інгібувати активність PHGDH та інших ферментів, залучених до його біосинтезу [6].

Окрім цього, серин може утворюватися з гліцину за участю серингідроксиметилтрансферази (SHMT). Даний фермент каталізує оборотну реакцію, що відбувається за участю тетрагідрофолату як кофактора. Цей шлях має важливе значення для функціонування фолатного циклу, який забезпечує синтез нуклеотидів і бере участь у регуляції процесів метилювання в клітині [9]. Загальну схему метаболізму серину наведено на рис. 1.4.



**Рис. 1.4.** Схематичне зображення основних шляхів метаболізму серину. У процесі його *de novo* синтезу 3-фосфогліцерат (3-PG) послідовно перетворюється на 3-фосфогідроксипіруват (3-PHP) за участю фосфогліцератдегідрогенази (PHGDH), далі — на 3-фосфосерин (3-PS) під дією фосфосеринамінотрансферази 1 (PSAT1), після чого внаслідок реакції, каталізованої фосфосеринфосфатазою (PSPH), утворюється серин. Альтернативним джерелом серину є його синтез із гліцину, що відбувається за участю серингідроксиметилтрансферази (SHMT1/2) [43]

У нормальних клітинах рівень серину, як правило, підтримується на відносно сталому рівні, достатньому для забезпечення білкового синтезу та функціонування фолатного циклу. На відміну від цього, у пухлинних клітинах біосинтез серину часто істотно посилюється. Для багатьох типів злоякісних новоутворень характерне підвищення вмісту PHGDH, PSAT1 і PSPH, що розглядають як один із механізмів, що забезпечує швидку проліферацію за рахунок інтенсивнішого синтезу амінокислот і нуклеотидів [6–9].

Розуміння цих процесів має важливе значення для пошуку нових підходів до протипухлинної терапії. Зокрема, перспективним напрямом вважають пригнічення ключових ферментів біосинтезу серину та порушення обміну одноуглецевих фрагментів у трансформованих клітинах.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Реактиви, прилади та матеріали

##### 2.1.1. Реактиви

Під час експерименту використали такі реактиви: поживне модифіковане середовище Dulbecco Eagle (Gibco, Invitrogen, США), ембріональна сироватка телят (10%, Equitech-Bio, Inc., США), стрептоміцин (0,1 мг/мл; Gibco, США) та пеніцилін (100 од./мл; Gibco, США), тризол (Trizol, Thermo Fisher Scientific, США), хлороформ, 2-пропанол, натрій ацетат, етанол, EDTA, тріс-НСl, агароза (Molecular Biology Grade, Eurogentec, Бельгія), вільна від рибонуклеаз вода (Merck), набір для трансфекції клітин міРНК Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, США), набір QuantiTect Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США), праймери для кПЛР (Sigma-Aldrich, США), міРНК до ERN1 (Eurofins MWG Operon, Німеччина), міРНК до ХВР1 та контрольна міРНК (Dharmacon, США), Absolute qPCR SYBRGreen Mix (Thermo Fisher Scientific, Велика Британія), GeneRuler 100-bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, США), барвник SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, США), PBS (phosphate-buffered saline), трипсин-EDTA, Opti-MEM (Gibco, США), L-глутамін, тунікаміцин (Sigma-Aldrich, США), диметилноксалілгліцин (DMOG), гідрокортизон (Sigma-Aldrich, США), генетицин (G418), суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз (Roche, Німеччина), SDS, акриламід/біс-акриламід, ТАЕ-буфер, TBS, TBST, бичачий сироватковий альбумін (BSA).

### 2.1.2. Прилади

Апарат «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» (Applied Biosystems, США), NanoDrop Spectrophotometer ND1000 (PEQLAB, Biotechnologie GmbH), система для електрофорезу Mupid-Exu (Mupid CO., LTD, Японія), система для електрофорезу білків (Bio-Rad, США), система напівсухого блотингу, ультрафіолетовий транслюмінатор, система інфрачервоного сканування Odyssey (LI-COR Biosciences, США).

### 2.1.3. Клітинні лінії та умови культивування

Лінію клітин гліобластоми людини U87MG отримували з колекції ATCC (США). Клітини культивували у середовищі Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) з високим вмістом глюкози (4,5 г/л), доповненому L-глутаміном (2 мМ), ембріональною сироваткою телят (10%, Equitech-Bio, Inc.), а також антибіотиками — пеніциліном (100 од./мл; Gibco) і стрептоміцином (0,1 мг/мл; Gibco). Культивування здійснювали за стандартних умов при температурі 37°C у середовищі з 5% CO<sub>2</sub> у культуральних чашках діаметром 10 см («Greiner Bio-One», Німеччина).

У дослідженні застосовували три варіанти клітин лінії U87, які відрізнялися функціональним станом сигнального протеїну ERN1. Контрольні клітини являли собою сублінію, трансфіковану порожнім вектором pcDNA3.1. Інші дві сублінії були отримані шляхом селекції стабільно трансфікованих клонів: одна з них експресувала домінантно-негативну форму ERN1 (dnERN1), що призводить до пригнічення як кіназної, так і ендорибонуклеазної активностей білка, тоді як інша містила мутацію в ендорибонуклеазному домені (dnrERN1), внаслідок чого зберігалася лише кіназна активність. Для індукції стресу ендоплазматичного ретикулума клітини обробляли тунікаміцином у концентрації 0,2 мкг/мл протягом 4 год.

Встановлено, що клітини з модифікованою активністю ERN1 (dnER1 та dnER1) характеризуються зниженою проліферативною здатністю та відсутністю експресії сплайсованої форми XBP1 — ключового транскрипційного фактора сигнального шляху ERN1. Крім того, після індукції ER-стресу тунікаміцином у цих клітинах не виявляється фосфорильована форма ERN1. Аналіз змін експресії генів, залучених до метаболізму серину (*PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SHMT1* та *ATF4*), проводили шляхом порівняння клітин із порушеною функцією ERN1 з контрольними клітинами, трансфікованими порожнім вектором pcDNA3.1.

Усі досліджувані сублінії підтримували в культурі у присутності генетицину (G418), що забезпечувало селекційний тиск, оскільки клітини містили вектор pcDNA3.1 з геном резистентності до даного антибіотика. У роботі також використовували лінію нормальних астроцитів людини NHA/TS. Клітини вирощували у стандартних умовах культивування при температурі 37°C та 5% CO<sub>2</sub> у поживному середовищі DMEM, доповненому 10% ембріональної сироватки телят, L-глутаміном та антибіотиками.

Для дослідження регуляції експресії гена *PSAT1* клітини піддавали впливу різних стресових факторів. ER-стрес індукували шляхом додавання тунікаміцину (0,5 мкг/мл) протягом 4 год. Гіпоксію моделювали за допомогою диметилноксалілгліцину (DMOG, 0,5 мМ), який є інгібітором пролілгідроксилаз та стабілізує фактор гіпоксії HIF-1 $\alpha$ . Експозиція клітин до DMOG проводилася протягом 4 год. Для дослідження впливу глюкокортикоїдів використовували гідрокортизон (10 мкМ) у водорозчинній формі (Sigma-Aldrich, США).

Дослідження експресії гена *PSAT1* проводили у восьми експериментальних групах як для нормальних астроцитів, так і для клітин гліобластоми:

- 1 – контрольні клітини;
- 2 – дія гідрокортизону;
- 3 – дія гіпоксії;

- 4 – дія тунікаміцину;
- 5 – комбінована дія гідрокортизону та гіпоксії;
- 6 – комбінована дія тунікаміцину та гідрокортизону;
- 7 – комбінована дія тунікаміцину та гіпоксії;
- 8 – одночасна дія тунікаміцину, гідрокортизону та гіпоксії.

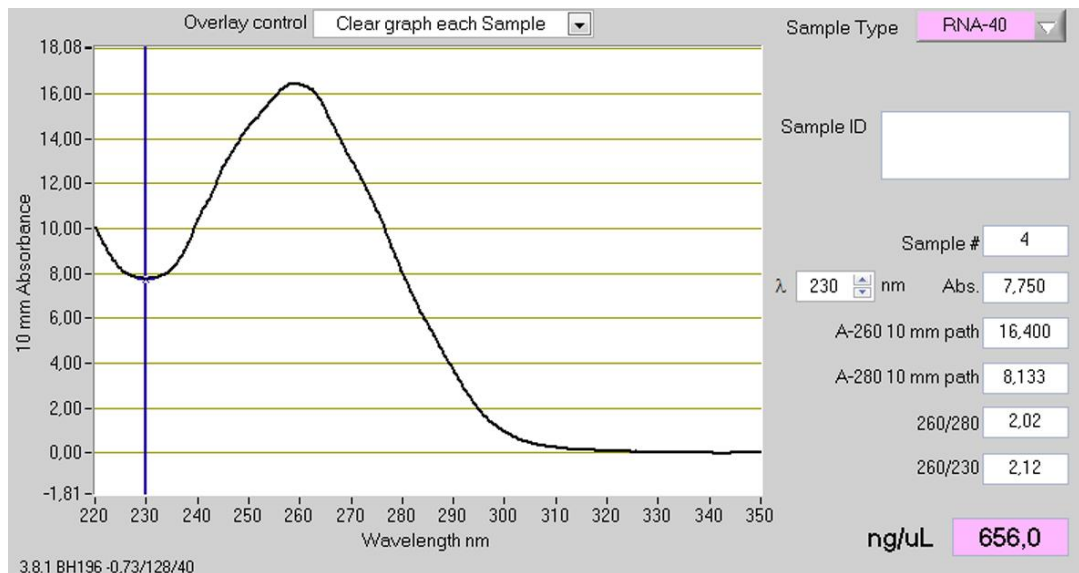
## **2.2. Методи**

### **2.2.1. Виділення РНК**

Тотальну РНК із клітин виділяли з використанням реагенту Trizol згідно з інструкцією виробника (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США). Клітини лізували у присутності реагенту Trizol, після чого для розділення фаз до зразків додавали хлороформ у співвідношенні 1:4. Суміш інкубували на льоду протягом 5 хв і центрифугували 10 хв при 12 000 g.

Після відокремлення супернатанту до суміші додавали рівний об'єм 2-пропанолу для осадження РНК, яке проводили при температурі  $-30^{\circ}\text{C}$  протягом 2 год. Осаджені зразки піддавали повторному центрифугуванню за аналогічних умов із подальшою промивкою. Отриманий осад РНК промивали 75% етанолом та ресуспендували у воді, вільній від рибонуклеаз.

З метою додаткового очищення РНК проводили повторне осадження у присутності 0,2 М натрій ацетату та 95% етанолу з подальшим розчиненням осаду у вільній від нуклеаз воді. Концентрацію та чистоту отриманої РНК оцінювали спектрофотометрично; типові спектри поглинання представлені на рис. 2.1.



**Рис. 2.1.** Типовий спектр поглинання розчину РНК, виділеної із клітин гліоми, в ультрафіолетовому діапазоні

### 2.2.2. Сайленсінг ERN1 та XBP1 за допомогою міРНК

Для проведення трансфекції клітини лінії U87MG висівали у 6-лункові планшети з початковою щільністю  $1 \times 10^5$  клітин на лунку та культивували протягом 24 год при  $37^\circ\text{C}$  у середовищі з 5%  $\text{CO}_2$  до досягнення приблизно 50% конфлюентності.

Комплекс siRNA–Lipofectamine готували безпосередньо перед трансфекцією шляхом змішування 6 мкл реагенту Lipofectamine RNAiMAX із siRNA (кінцева концентрація 100 нМ), попередньо розведеною у 150 мкл Opti-MEM. Отриману суміш інкубували протягом 5 хв при кімнатній температурі для формування комплексів.

Перед внесенням трансфекційної суміші культуральне середовище замінювали на 800 мкл Opti-MEM, після чого додавали підготовлений комплекс siRNA–Lipofectamine. Клітини інкубували протягом 6 год за стандартних умов ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), після чого середовище змінювали на повноцінне DMEM, доповнене 10% FBS, і продовжували культивування ще протягом 48 год.

### 2.2.3. Синтез кДНК за допомогою методу зворотної транскрипції

Виділену тотальну РНК використовували як матрицю для синтезу кДНК методом зворотної транскрипції з використанням набору QuantiTect Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Перед проведенням реакції зразки піддавали обробці для видалення залишків геномної ДНК: до 1 мкг РНК додавали буфер gDNA Wipeout та інкубували при 42°C протягом 2 хв.

Після цього до реакційної суміші об'ємом 14 мкл вносили 1 мкл зворотної транскриптази Quantiscript, 1 мкл суміші праймерів (Primers mix) та 4 мкл буфера Quantiscript RT Buffer, що містить інгібітор рибонуклеаз. Реакцію зворотної транскрипції проводили при температурі 42°C протягом 15 хв.

Для інактивації ферменту реакційну суміш нагрівали до 95°C протягом 3 хв із подальшим швидким охолодженням на льоду. Синтезовану кДНК використовували у подальшому для аналізу рівня експресії генів методом кількісної ПЛР.

### 2.2.4. Кількісний ПЛР аналіз

Рівень експресії мРНК генів, залучених у синтез та метаболізм серину, визначали методом кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR) із використанням барвника SYBR Green у клітинах гліоми U87 (контрольних та з пригніченою функцією ERN1), а також у нормальних астроцитах людини.

Для нормалізації результатів використовували ген *ACTB* ( $\beta$ -актин) як внутрішній контроль. Олігонуклеотидні праймери, специфічні до досліджуваних генів, підбирали за допомогою онлайн-ресурсу Primer3web version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>), а їх синтез здійснювали у компанії Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США).

Послідовності праймерів наведені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

## Характеристики праймерів для кількісної ПЛР у реальному часі

Символ гена	Назва гена	Послідовність праймерів	Номери нуклеотидів у послідовності	GeneBank номер
<i>PHGDH</i>	Phosphoglycerate dehydrogenase	F: 5'- tcagttcgtggacatggtga R: 5'- tcttcaggaggccgacaat	992–1011 1231–1212	NM_006623.4
<i>PSAT1</i>	Phosphoserine aminotransferase 1	F: 5'- tgcaaggagcagctactgg R: 5'- gcctgcacctgtattccag	587–606 787–768	NM_021154.5
<i>PSPH</i>	Phosphoserine phosphatase	F: 5'- agcactggagaaacgaggaa R: 5'- agagcagcttgaaaggcac	566–585 783–764	NM_004577.4
<i>SHMT1</i>	Serine hydroxymethyltransferase 1	F: 5'- tctgccacgtccatcttctt R: 5'- cgggcatattccaggttctg	679-698 836-817	NM_004169.5
<i>ATF4</i>	Activating transcription factor 4	F: 5'- gtccctccaacaacagcaag R: 5'- actttctgggagatggccaa	1093–1112 1328–1309	NM_005749.4

## Продовження таблиці 2.1

Символ гена	Назва гена	Послідовність праймерів	Номери нуклеотидів у послідовності	GeneBank номер
<i>ERNI</i>	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	F: 5'- ccatgccgaagttcagatgg R: 5'- gtgaggccgcatagtcaaag	437-456 671-652	NM_001433.5
<i>XBP1</i>	X-box binding protein 1	F: 5'- tgtcaccctccagaacatc R: 5'- aaggaggctggaaggaac	584-603 779-760	NM_005080.4
<i>ACTB</i>	Beta-actin	F: 5'- catccgcaaagacctgtacg R: 5'- cctgcttgctgatccacatc	948-967 1165-1146	NM_001101.5

Для проведення ампліфікації синтезовану кДНК (5 мкг/мкл) попередньо розводили у 20 разів, після чого 1 мкл отриманого розчину використовували як матрицю для ПЛР. До реакційної суміші додавали 2× Absolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Велика Британія), специфічні праймери (Sigma-Aldrich, США) та воду до кінцевого об'єму 20 мкл.

Ампліфікація усіх досліджених генів проводилася протягом 40 циклів за наступних параметрів:

- Денатурація дволанцюгової ДНК: 95°C, 30 с;
- «Відпал» олігонуклеотидних праймерів: 55°C, 30 с;
- Синтез ДНК: 72°C, 30 с.

### **2.2.5. Електрофорез ампліфікованих фрагментів ДНК у агарозному гелі**

Аналіз продуктів ампліфікації, отриманих у результаті кількісної ПЛР, проводили методом електрофорезу в 2% агарозному гелі з використанням трис-ацетатного буфера, що містить EDTA. Розділення фрагментів здійснювали протягом 1 год при напрузі 10 В/см.

Для оцінки розміру ампліфікованих продуктів застосовували маркер молекулярної маси GeneRuler 100-bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific). Візуалізацію ДНК-фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 310 нм) із використанням барвника SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies).

### **2.2.6. Вестерн-блот аналіз**

Екстракцію білків здійснювали у присутності суміші інгібіторів протеаз та фосфатаз (Roche, Mannheim, Germany). Отримані білки розділяли методом електрофорезу у 12% SDS-поліакриламідному гелі з наступним перенесенням на нітроцелюлозну мембрану (Bio-Rad Lab., Germany) за допомогою системи напівсухого блотингу. Для верифікації молекулярної маси білків використовували маркер Thermo Scientific Page Ruler Prestained Protein Ladder (#26617). Неспецифічну адсорбцію на мембрані блокували буфером Interscept Blocking Buffer TBS (LI-COR Biosciences, USA).

Мембрани інкубували з первинними мишачими поліклональними антитілами проти PSAT1 (Novus Biologicals, [H00029968-A01]) у розведенні 1:500. Для контролю рівномірності завантаження зразків (loading control) використовували мишачі моноклональні антитіла до  $\beta$ -актину (ACTB) у розведенні 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778). Детекцію первинних антитіл здійснювали за допомогою вторинних антитіл anti-mouse IgG, кон'югованих з флуорофором Alexa Fluor 680 (ab175775, Santa Cruz

Biotechnology). Візуалізацію проводили на системі інфрачервоного сканування Odyssey (LI-COR Biosciences). Денситометричний аналіз та кількісну оцінку отриманих результатів виконували за допомогою програмного забезпечення Image Studio Lite Ver. 5.2.

### 2.2.7. Статистичний аналіз

Кількісний ПЛР аналіз був проведений з використанням спеціального додатку «Differential Expression Calculator». Статистичний аналіз даних за допомогою додатку Excel та програмного забезпечення OriginPro 7.5.

Для порівняння середніх значень використовували двобічний t-критерій Стьюдента. Значення  $p < 0,05$  було прийняте статистично значущим у всіх випадках. Значення експресії обраних для дослідження генів були нормовані відповідно до експресії *ACTB* та представлені у відсотках від контролю, де значення експресії конкретного гена у контрольних клітинах було прийнято за 100%. Усі значення представлені як середнє значення  $\pm$  середня квадратична похибка (SEM) з потрійних вимірювань, що були проведені у 4 незалежних експериментах.

Експериментальні дані кількісної ПЛР проаналізовані на нормальність розподілу за допомогою графіка нормальної імовірності та гістограми. Усі проаналізовані набори даних показали нормальний розподіл.

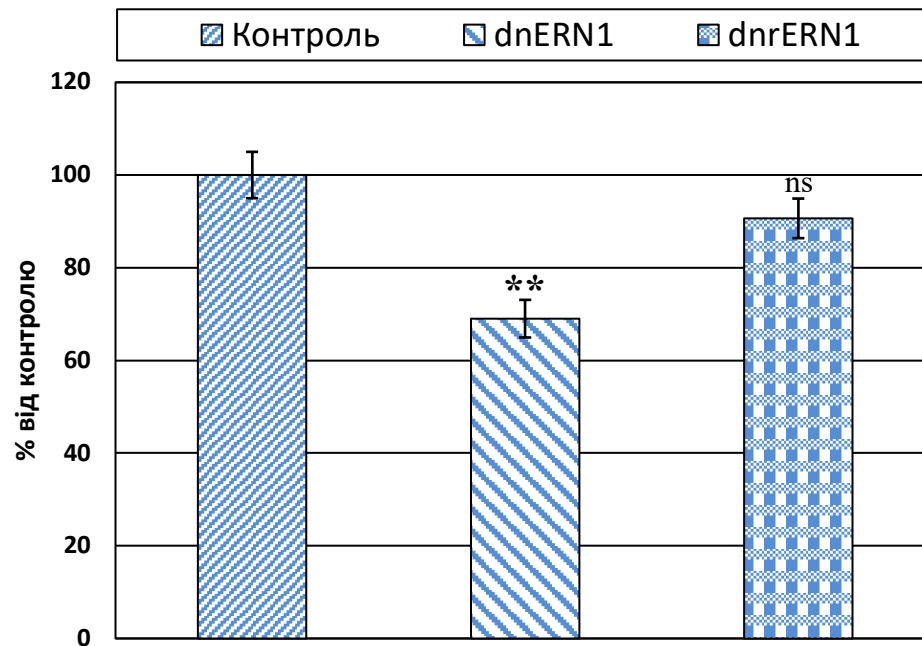
## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Вплив протеїну ERN1 на експресію генів, залучених у синтез та метаболізм серину

Для дослідження ролі різних ензиматичних активностей сенсорно-сигнального протеїну ERN1 у регуляції експресії генів, залучених у синтез та метаболічні перетворення серину, було порівняно рівень мРНК досліджених генів за допомогою кПЛР у реальному часі. Для експерименту були використані контрольні клітини (з пустим вектором), а також клітини сублінії dnERN1 та dnrERN1. Також було перевірено вплив інших шляхів стресу ER на рівень експресії досліджуваних генів за рахунок впливу тунікаміцину на клітини, у яких видалено ендорибонуклеазний домен протеїну ERN1.

На рис. 3.1 продемонстровано, що за умови видалення лише ендорибонуклеазної активності протеїну ERN1 зміни в рівні експресії гена *PHGDH* не є значущими, проте у клітинах, де були видалені обидві ензиматичні активності протеїну ERN1, спостерігалось зниження рівня експресії на 31 %.



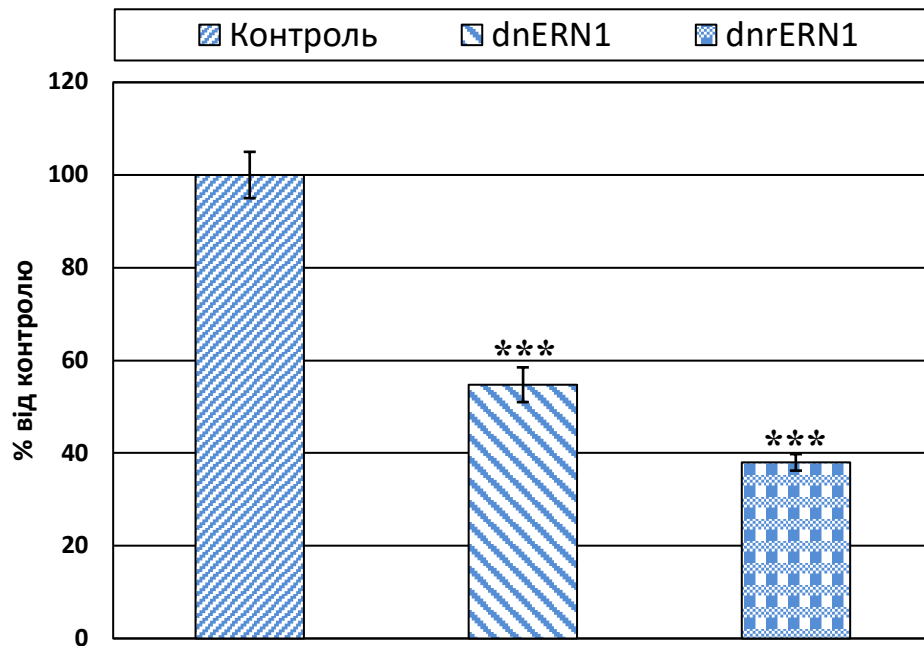
**Рис. 3.1.** Рівень експресії гена фосфогліцератдегідрогенази (*PHGDH*). Контроль – клітини гліоми U87 з вставкою порожнього вектора pcDNA3.1; dnERN1 – клітини гліоми U87 з блокадою протеїну ERN1; dnrERN1 – клітини гліоми U87 з блокадою лише рибонуклеазної активності протеїну ERN1.

Значення експресії *PHGDH* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

ns – не значимо

На рис. 3.2 представлено дані, які можуть свідчити про те, що вимкнення обох ферментативних активностей протеїну ERN1 призводить до значного (-45 %) зниження рівня експресії гена *PSAT1* у клітинах гліобластоми U87MG. Проте пригнічення лише ендорибонуклеази протеїну ERN1 призводить до ще більшого пригнічення рівня експресії гена фосфосеринаміотрансферази 1 (-62 %).



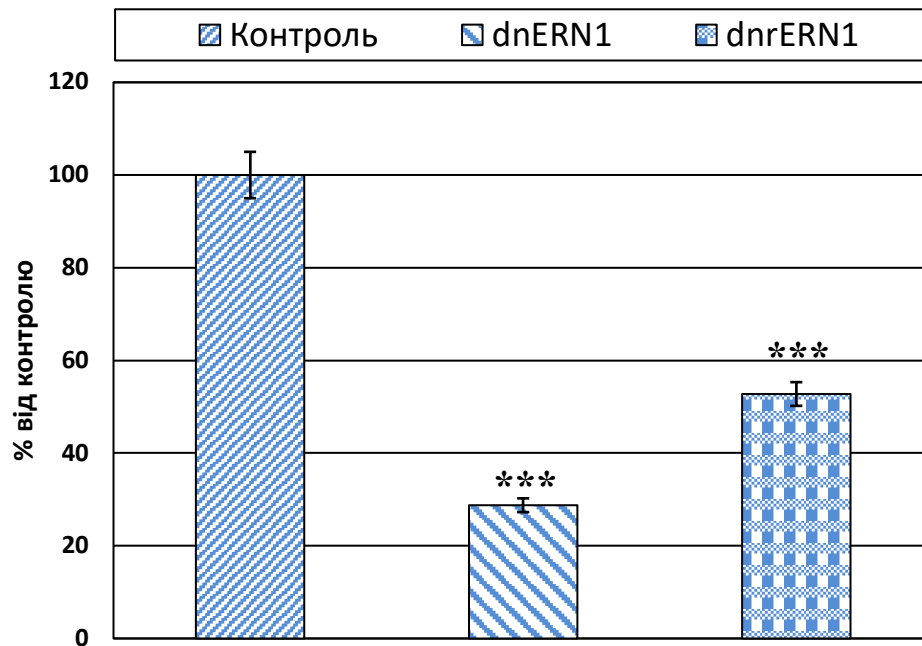
**Рис. 3.2.** Рівень експресії гена фосфосеринамінотрансферази 1 (*PSAT1*).

Підписи як до рис. 3.1.

Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Наступні експериментальні дослідження, змодельовані за умови видалення ендорибонуклеазного домена протеїну ERN1, продемонстрували значне зниження рівня експресії гена фосфосеринфосфатази (-47%). Проте пригнічення обох активностей ERN1 спричиняє більш виражений вплив на експресію гена *PSPH*, знижуючи її на 61 % порівняно з контрольними клітинами, що показано на рис. 3.3.



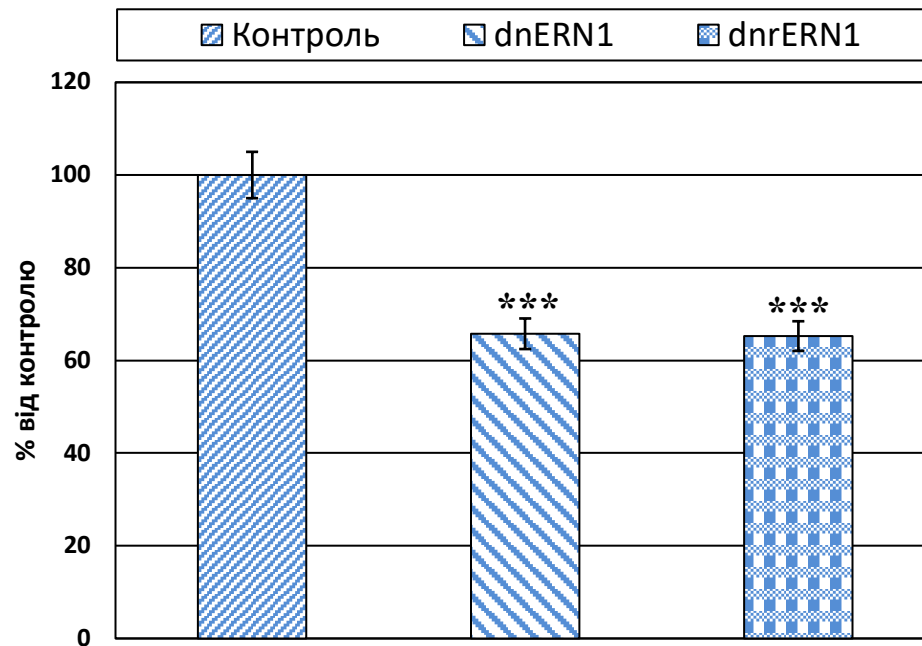
**Рис. 3.3.** Рівень експресії гена фосфосеринфосфатази (*PSPH*).

Підписи як до рис. 3.1.

Значення експресії *PSPH* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Рис. 3.4 демонструє, що експресія гена *ATF4* значно знижується (-35 %) як у клітинах, де був видалений лише ендорибонуклеазний домен протеїну ERN1, так і у клітинах, у яких були пригнічені обидві ферментативні активності сенсорно-сигнального протеїну ERN1.



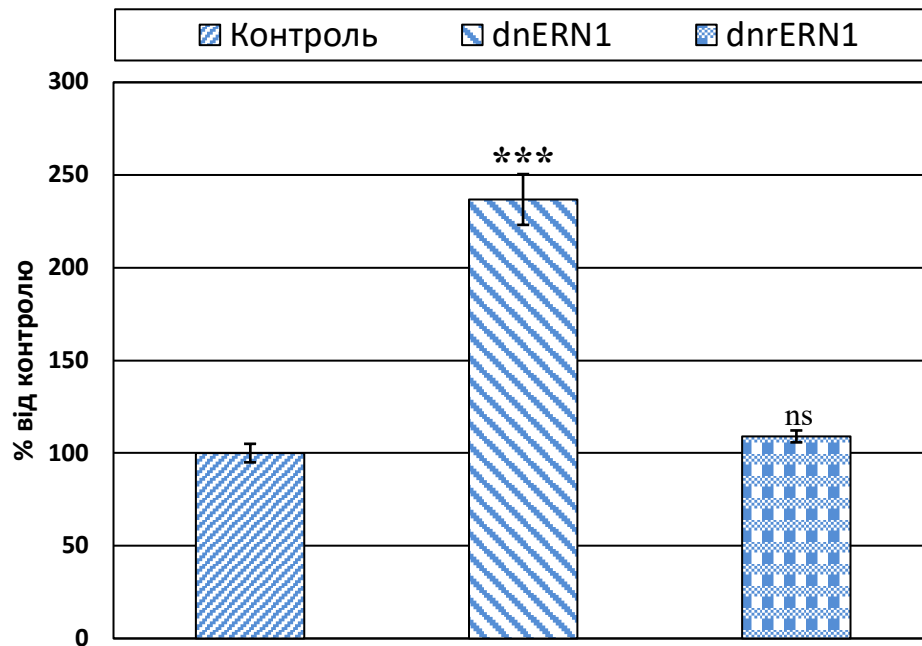
**Рис. 3.4.** Рівень експресії гена фактора активації транскрипції 4 (*ATF4*).

Підписи як до рис. 3.1.

Значення експресії *ATF4* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

На рис. 3.5 представлено, що у клітинах, де була вимкнена лише ендорибонуклеаза протеїну ERN1, не спостерігалось значних змін рівня експресії гена *SHMT1*. Проте у клітинах сублінії dnERN1 відмічається значне підвищення рівня експресії гена серингідроксиметилтрансферази 1 (+137 %).



**Рис. 3.5.** Рівень експресії серингідроксиметилтрансферази 1 (*SHMT1*).

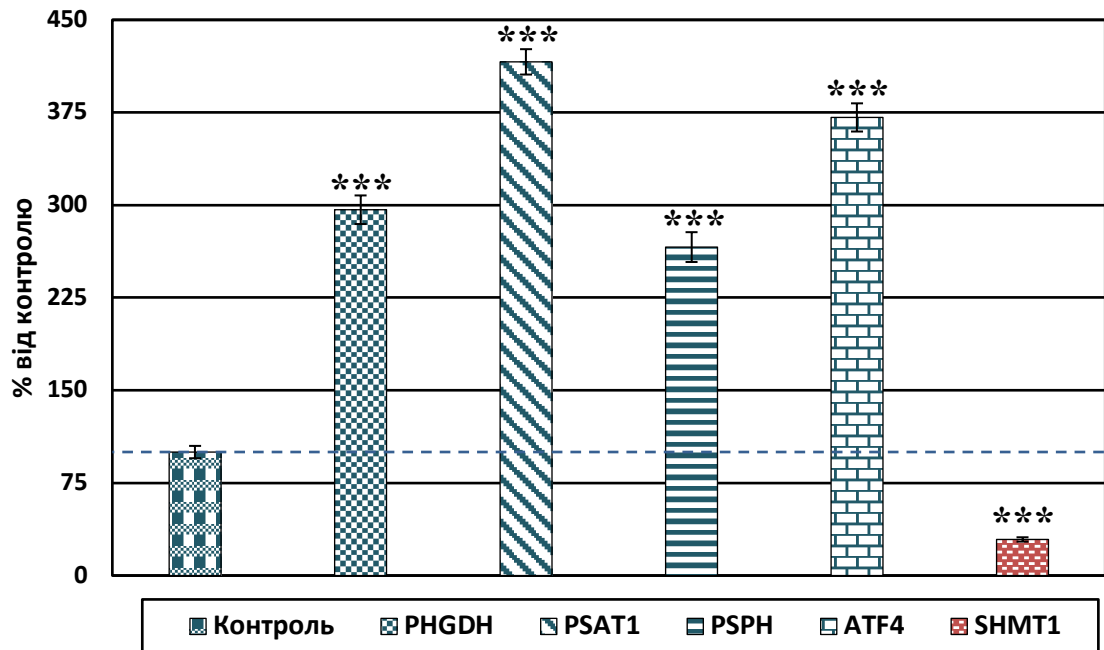
Підписи як до рис. 3.1.

Значення експресії *SHMT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем;

ns – не значимо

Також на рис. 3.6 було продемонстровано, що внаслідок обробки клітин гліобластоми сублінії dnRERN1 тунікаміцином відбулося сильне зростання рівня експресії генів *PHGDH* (+196 %), *PSAT1* (+316 %), *PSPH* (+166 %) та *ATF4* (+271 %), проте також спостерігалось значне зниження рівня експресії *SHMT1* (-71 %).



**Рис. 3.6.** Вплив тунікаміцину на експресію генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* та *SHMT1* у клітинах гліобластоми U87MG з нокдауном ERN1 за допомогою трансгена *dnrERN1* порівняно з контрольними клітинами. Значення експресії генів були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$ . Горизонтальна пунктирна лінія відповідає 100 %.

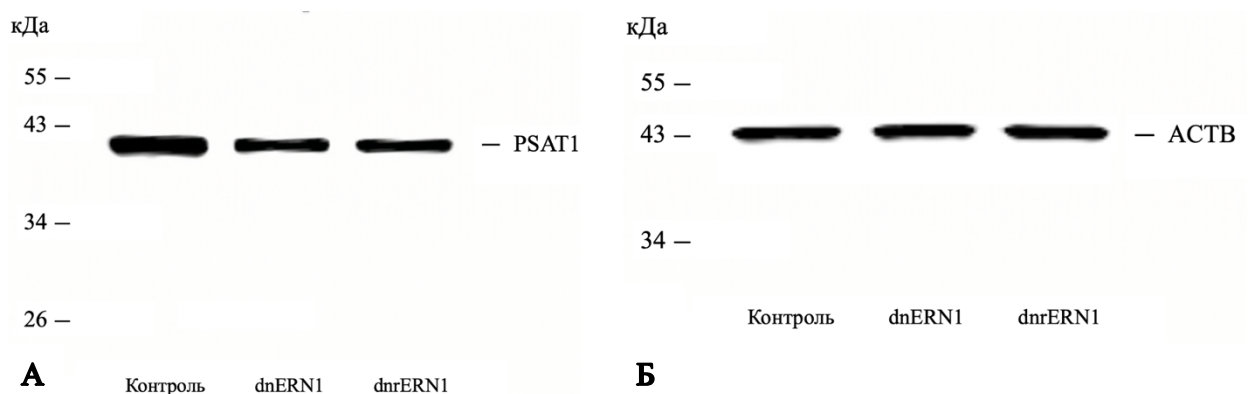
\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з *dnrERN1*

Отримані дані свідчать про те, що експресія генів, які беруть участь у синтезі та метаболізмі серину, регулюється сенсорно-сигнальним протеїном ERN1, при цьому різні гени регулюються різними ферментативними активностями даного протеїну. Також показано, що за впливу тунікаміцину у регуляції експресії досліджуваних генів беруть участь інші сенсорно-сигнальні шляхи СЕР.

### 3.2. Аналіз рівня протеїну PSAT1 у клітинах гліобластоми за умов пригнічення ERN1

Для підтвердження даних закономірностей, виявлених на рівні експресії мРНК, було проведено вестерн-блот аналіз рівня протеїну PSAT1 у клітинах гліобластоми з різними типами пригнічення функції ERN1 (dnER1 та dnrER1). Результати аналізу продемонстрували, що інгібування лише ендорибонуклеазної або обох ферментативних активностей (ендорибонуклеазної та кіназної) протеїну ERN1 призводить до суттєвого зниження вмісту протеїну PSAT1 порівняно з контрольними клітинами, трансфікованими порожнім вектором.

Як показано на імуноблотах (рис. 3.7, А, Б), інтенсивність смуг, що відповідають протеїну PSAT1, значно зменшується у зразках клітин dnER1 та dnrER1 порівняно з контролем, при цьому рівень  $\beta$ -актину (ACTB) залишався стабільним.

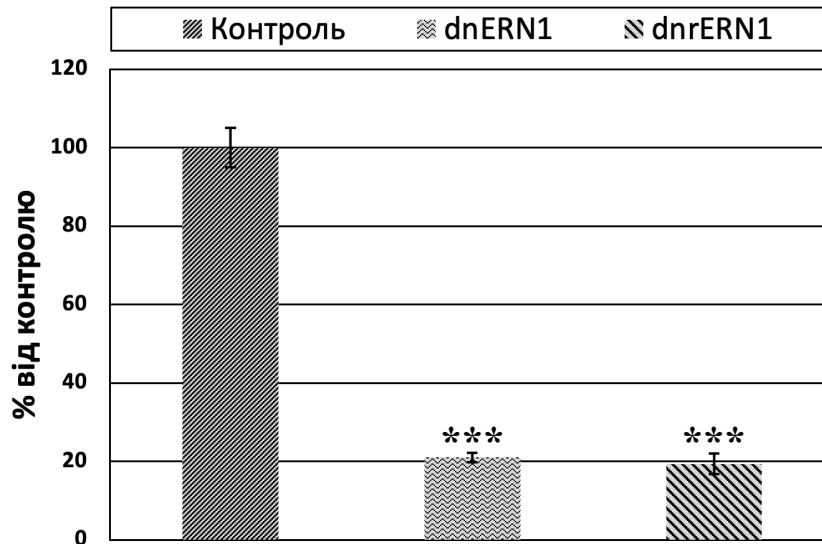


**Рис 3.7.** Блотограма рівнів протеїнів PSAT1 (А) та  $\beta$ -актину (Б) у контрольних клітинах гліобластоми лінії U87 та за умов пригнічення ферментативних активностей ERN1

Підписи як до рис. 3.1

Денситометричний аналіз та подальша кількісна оцінка (рис. 3.8) підтвердили статистично значуще зниження відносного рівня протеїну

PSAT1: у обох лініях клітин із пригніченими ферментативними активностями ERN1 (як dnERN1 так і dnrERN1) рівень протеїну знизився до приблизно 20% від контрольних значень.



**Рис 3.8.** Денситометричний аналіз відносного рівня протеїну PSAT1 у контрольних клітинах гліобластоми лінії U87 та за умов пригнічення ферментативних активностей ERN1.

Підписи як до рис. 3.1.

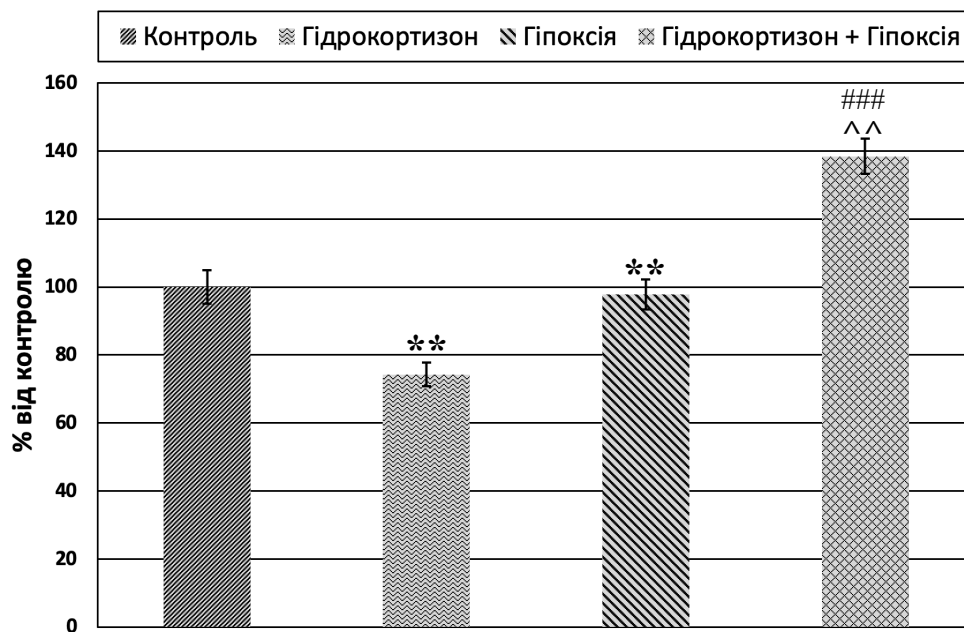
Значення рівня протеїну були нормалізовані до рівня  $\beta$ -актину (ACTB) та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 3$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем

Отримані дані корелюють із результатами аналізу експресії відповідних генів і свідчать про те, що зниження рівня PSAT1 у клітинах гліобластоми за умов пригнічення сигнального шляху ERN1 відбувається на посттранскрипційному рівні та є наслідком зниження концентрації відповідних мРНК.

### 3.3. Регуляція експресії *PSAT1* за умов стресу ендоплазматичного ретикулума, гіпоксії та дії гідрокортизону

Як показано на рис. 3.9, тунікамідин знижує рівень експресії гена *PSAT1* на 32% порівняно з контролем ( $p < 0,01$ ). Гідрокортизон має подібний інгібуючий ефект (-28%,  $p < 0,01$ ). При їх комбінованій дії рівень експресії *PSAT1* підвищується на 32% порівняно з дією одного тунікамідину ( $p < 0,05$ ) та майже відновлюється до контрольного рівня. Таким чином, гідрокортизон частково компенсує інгібуючий ефект ER-стресу у нормальних астроцитах.



**Рис. 3.9.** Рівень експресії гена *PSAT1* у нормальних астроцитах людини за дії гідрокортизону та гіпоксії.

Контроль – інтактні клітини; Гідрокортизон – клітини, оброблені гідрокортизоном; Гіпоксія – клітини в умовах гіпоксії; Гідрокортизон + Гіпоксія – клітини за комбінованої дії гідрокортизону та гіпоксії.

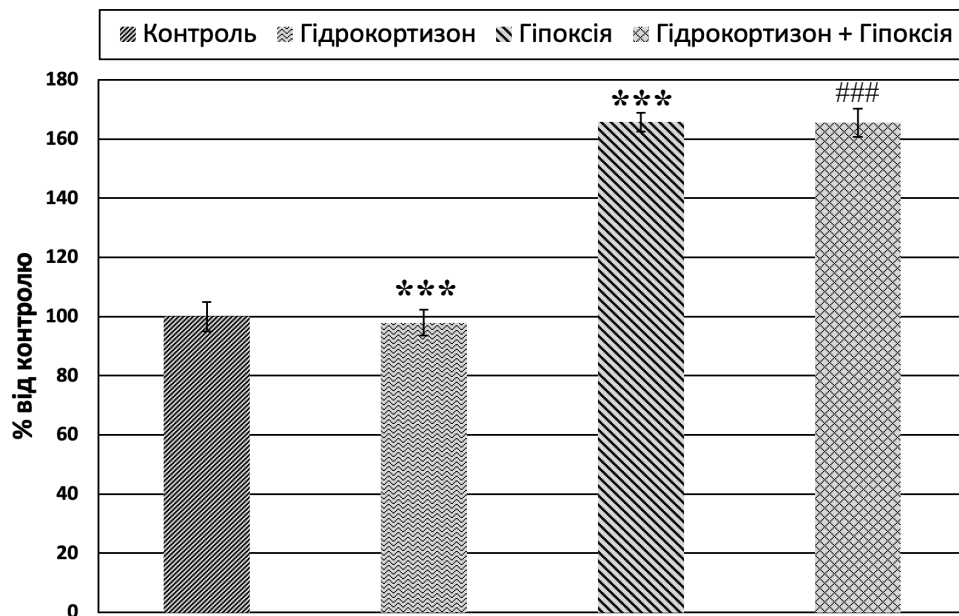
Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

### –  $p < 0,001$  у порівнянні з гідрокортизоном;

^^ –  $p < 0,01$  у порівнянні з гіпоксією

На рис. 3.10 видно, що у клітинах гліобластоми гідрокортизон не спричиняє суттєвих змін експресії гена *PSAT1*, тоді як гіпоксія підвищує його рівень приблизно на 68% відносно контролю. За умов комбінованого впливу гіпоксії та гідрокортизону експресія гена зростає на 66% порівняно з контролем та на 69% відносно дії самого гідрокортизону, що свідчить про резистентність гліобластомних клітин до глюкокортикоїду та домінуючу роль гіпоксії в регуляції *PSAT1*.



**Рис. 3.10.** Рівень експресії гена *PSAT1* у клітинах гліобластоми U87 за дії гідрокортизону та гіпоксії.

Підписи як до рис. 3.8.

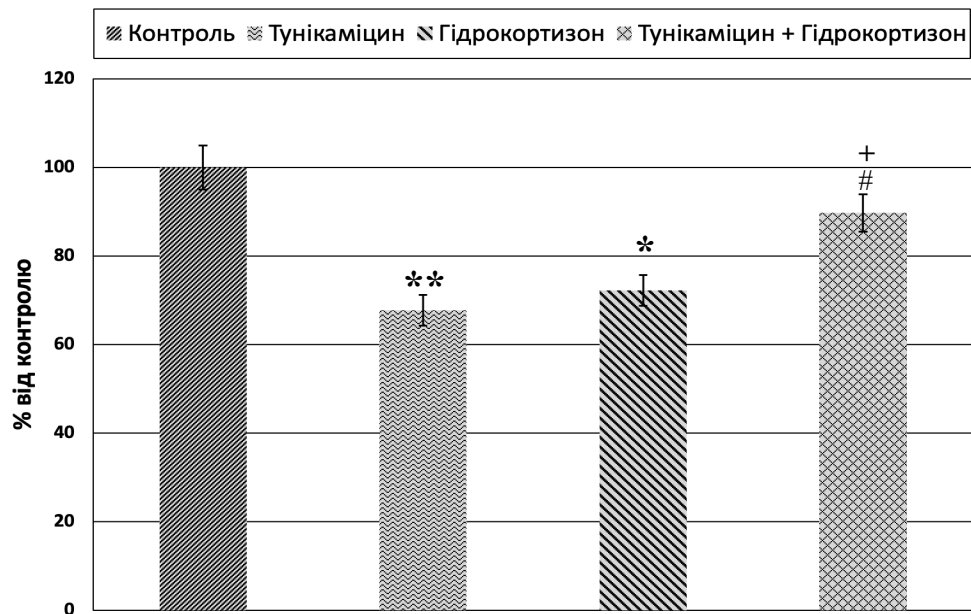
Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем;

### –  $p < 0,001$  у порівнянні з гідрокортизоном

На рис. 3.11 продемонстровано, що у нормальних астроцитах індукція ER-стресу тунікаміцином супроводжується зниженням експресії гена *PSAT1* на 32% порівняно з контролем, при цьому гідрокортизон окремо також зменшує його рівень приблизно на 28%. Водночас поєднання тунікаміцину з

гідрокортизоном призводить до підвищення експресії на 32% відносно дії самого тунікаміцину та фактично відновлює її до контрольного рівня, що вказує на часткову компенсацію інгібуючого ефекту ER-стресу під впливом стероїдного гормону.



**Рис. 3.11.** Рівень експресії гена *PSAT1* у нормальних астроцитах людини за дії тунікаміцину та гідрокортизону.

Контроль – інтактні клітини; Гідрокортизон – клітини, оброблені гідрокортизоном; Тунікаміцин – клітини, оброблені тунікаміцином; Тунікаміцин + Гідрокортизон – клітини за комбінованої дії гідрокортизону та тунікаміцину.

Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем;

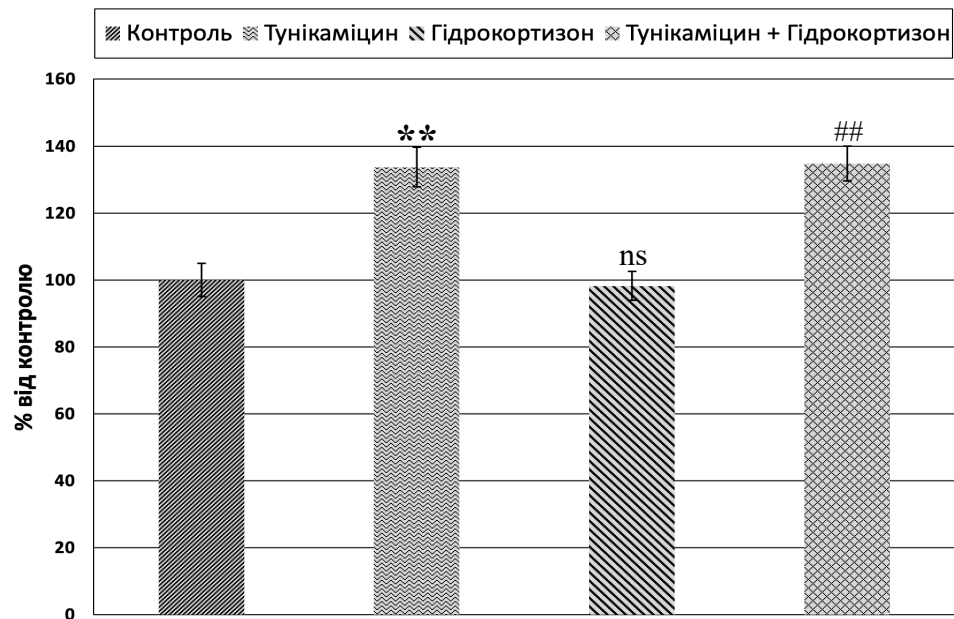
\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

# –  $p < 0,05$  у порівнянні з гідрокортизоном;

+ –  $p < 0,05$  у порівнянні з тунікаміцином

Як показано на рис. 3.12, у клітинах гліобластоми тунікаміцин, на відміну від нормальних астроцитів, підвищує експресію гена *PSAT1* приблизно на 34%

у порівнянні з контролем, що свідчить про активацію цього гена в умовах ER-стресу. Гідрокортизон не демонструє значущого впливу ні за відсутності, ні за наявності тунікаміцину, а комбінована дія цих факторів не змінює характер відповіді порівняно з одним ER-стресом, що підтверджує стійкість гліобластомних клітин до гормональної регуляції.



**Рис. 3.12.** Рівень експресії гена *PSAT1* у клітинах гліобластоми U87 за дії тунікаміцину та гідрокортизону.

Підписи як до рис. 3.10.

Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

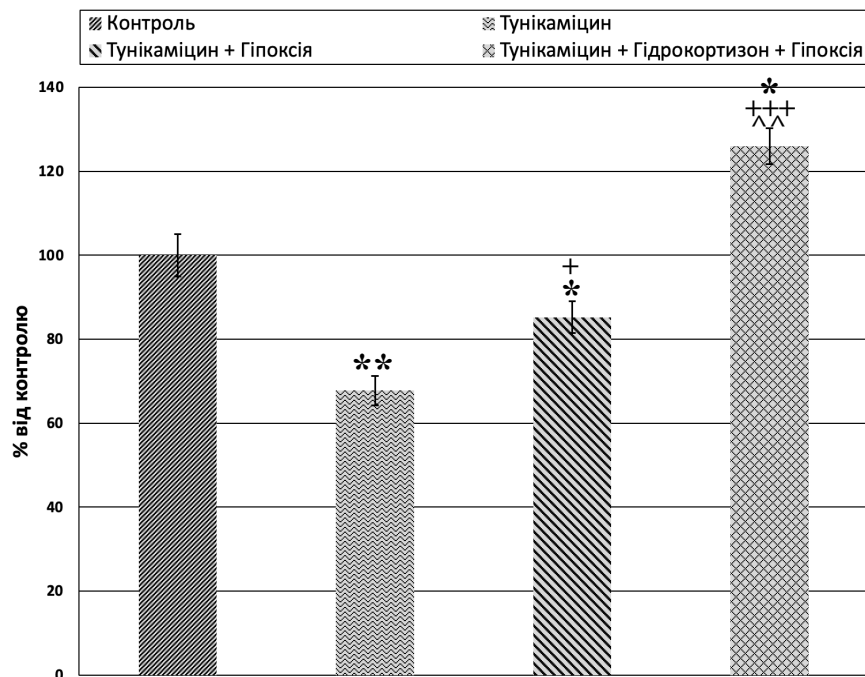
ns – не значимо

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

## –  $p < 0,05$  у порівнянні з гідрокортизоном

На рис. 3.13 представлено, що у нормальних астроцитах гіпоксія в умовах стресу ER викликає помірне підвищення експресії *PSAT1* на 18% порівняно з дією одного тунікаміцину, однак одночасний вплив тунікаміцину, гіпоксії та гідрокортизону спричиняє значно вираженіший ефект — підвищення на 85% відносно тунікаміцину та на 56% порівняно з комбінацією тунікаміцину й

гіпоксії, що свідчить про синергічну взаємодію гіпоксії та гідрокортизону в умовах стресу ендоплазматичного ретикулула.



**Рис. 3.13.** Рівень експресії гена *PSAT1* у нормальних астроцитах людини за дії тунікаміцину, гіпоксії та гідрокортизону.

Контроль – інтактні клітини; Тунікаміцин – клітини, оброблені Тунікаміцином; Тунікаміцин + Гіпоксія – клітини за комбінованої дії гіпоксії та тунікаміцину; Тунікаміцин + Гідрокортизон + Гіпоксія – клітини за комбінованої дії тунікаміцину, гідрокортизону та гіпоксії.

Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем;

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

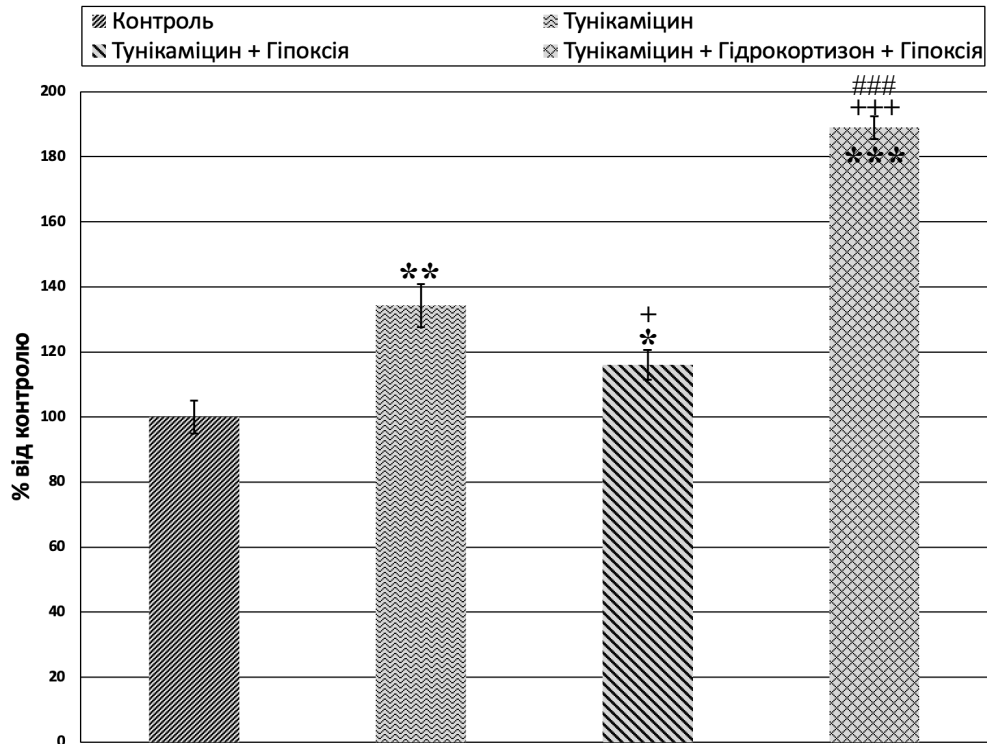
^^ –  $p < 0,01$  у порівнянні з гіпоксією;

+ –  $p < 0,05$  у порівнянні з тунікаміцином;

+++ –  $p < 0,001$  у порівнянні з тунікаміцином

На рис. 3.14 показано, що у гліобластомних клітинах гіпоксія на тлі ER-стресу дещо знижує експресію *PSAT1* — приблизно на 13% порівняно з одним

тунікаміцином, проте додавання гідрокортизону до цієї комбінації призводить до різкого підвищення рівня експресії: на 89% відносно контролю, на 41% порівняно з тунікаміцином і на 63% порівняно з поєднанням тунікаміцину та гіпоксії, що вказує на потужний стимулюючий ефект трьох факторів разом.



**Рис. 3.14.** Рівень експресії гена *PSAT1* у клітинах гліобластоми U87 за дії тунікаміцину, гіпоксії та гідрокортизону.

Підписи як до рис. 3.12.

Значення експресії *PSAT1* були нормалізовані до рівня *ACTB* та представлені у відсотках від контролю (100 %);  $M \pm m$ ,  $n = 4$

\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з контролем;

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

\*\*\* –  $p < 0,001$  у порівнянні з контролем;

^^^ –  $p < 0,001$  у порівнянні з гіпоксією;

# –  $p < 0,05$  у порівнянні з тунікаміцином;

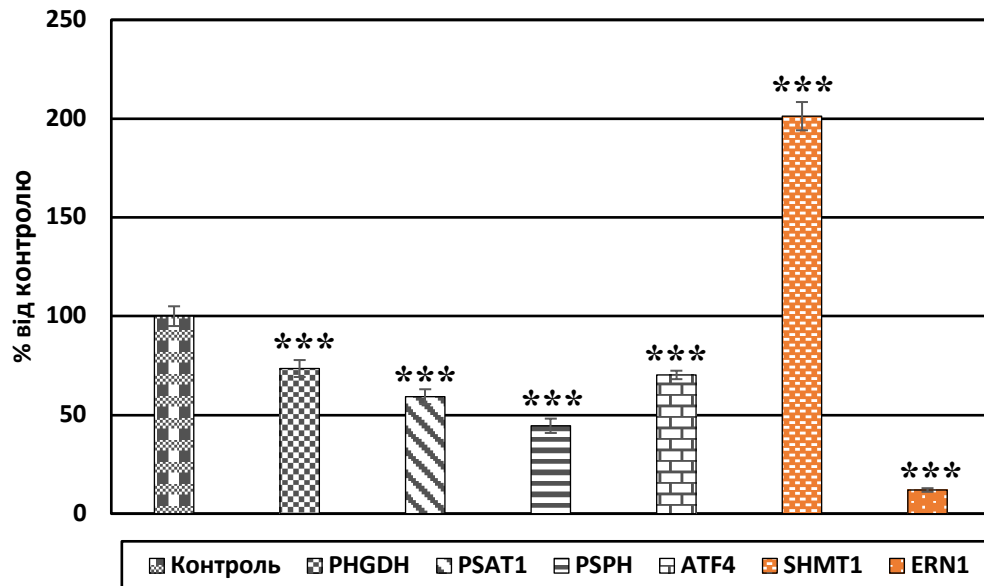
+++ –  $p < 0,001$  у порівнянні з тунікаміцином

Отримані результати демонструють принципово різну регуляцію експресії гена *PSAT1* у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми під впливом гідрокортизону, СЕР та гіпоксії. У нормальних астроцитах гідрокортизон і тунікаміцин окремо знижують експресію гена, однак у поєднанні з гіпоксією, особливо на тлі ER-стресу, спостерігається виражене підвищення його рівня, що свідчить про складну гормонально-метаболічну взаємодію. Натомість у клітинах гліобластоми гідрокортизон практично не впливає на експресію *PSAT1*, тоді як гіпоксія та СЕР здатні її активувати, а їхня комбінація з гормоном формує максимально стимулюючий ефект. Таким чином, чутливість до глюкокортикоїдної регуляції є значно вищою у нормальних астроцитах, тоді як гліобластомні клітини демонструють резистентність до ізольованої дії гідрокортизону та переважну залежність від стресових сигнальних шляхів, що може мати значення для розуміння метаболічної перебудови пухлин та особливостей їх гормональної відповіді.

#### **3.4. Сайленсінг мРНК ERN1 та XBP1 за допомогою специфічних міРНК**

Для аналізу взаємозв'язку сигнальної осі ендорибонуклеаза ERN1/XBP1 з експресією досліджуваних генів був проведений сайленсінг мРНК ERN1 та XBP1 відповідними міРНК.

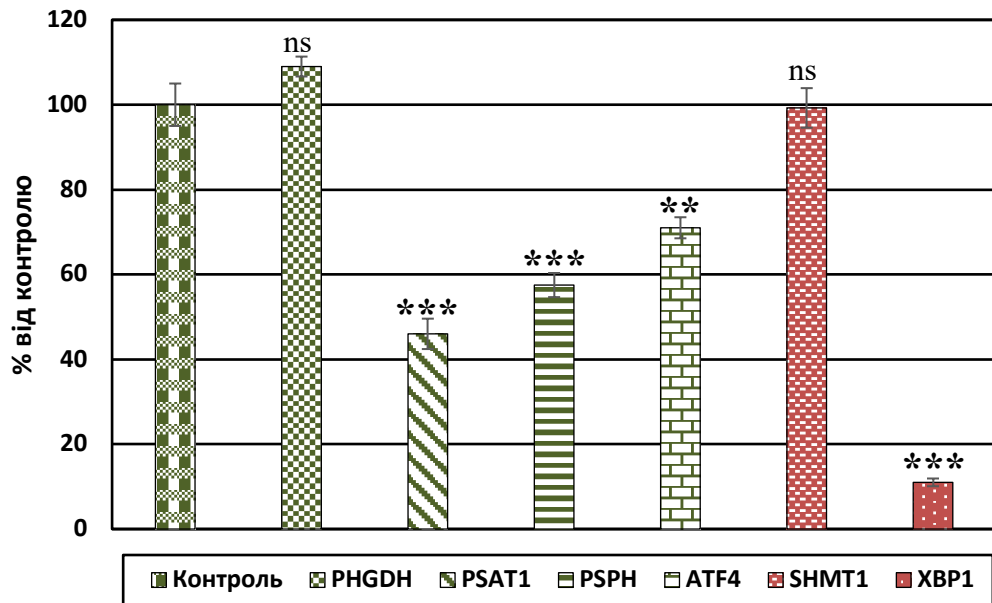
На рис. 3.15 продемонстровано, що пригнічення ERN1 специфічною міRNA призводить до значного пригнічення експресії мРНК ERN1 (-88 %), а також до зниження експресії генів *PHGDH* (-27 %), *PSAT1* (-41 %), *PSPH* (-56 %) та *ATF4* (-30 %), проте рівень експресії *SHMT1* значно підвищився (+101 %) за даних умов.



**Рис. 3.15.** Вплив сайленсінгу мРНК ERN1 специфічними міРНК на експресію *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4*, *SHMT1* та *ERN1* у клітинах гліобластоми U87MG порівняно з клітинами, обробленими контрольною міРНК (100 %); n = 4

\*\*\* – p < 0,001

Як показано на рис. 3.16, пригнічення експресії мРНК XBP1 шляхом сайленсінгу ERN1 призводило до зниження рівня експресії генів *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4* на 54 %, 42 % та 29 %, відповідно. Водночас рівні експресії генів *PHGDH* та *SHMT1* залишалися без достовірних змін, що вказує на їх незалежність від регуляторного впливу XBP1.



**Рис. 3.16.** Вплив сайленсінгу мРНК XBP1 специфічними міРНК на експресію *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4*, *SHMT1* та *XPB1* у клітинах гліобластоми U87MG порівняно з клітинами, обробленими контрольною міРНК (100 %); n = 4

\*\* –  $p < 0,01$  у порівнянні з контролем;

\*\*\* –  $p < 0,001$ ;

ns – не значимо

Пригнічення експресії мРНК XBP1 дозволило встановити незалежність змін рівнів мРНК PHGDH та SHMT1 від сигнальної осі, опосередкованої ендорибонуклеазою ERN1/XBP1, у клітинах гліобластоми U87MG. Водночас було підтверджено, що ендорибонуклеаза ERN1 здійснює контроль над експресією мРНК ATF4, а також частково регулює рівні мРНК PSAT1 і PSPH через сигнальний шлях, пов'язаний із XBP1.

### 3.5. Обговорення результатів

У цьому дослідженні проаналізовано вплив інгібування ERN1 на експресію генів, які контролюють синтез і метаболізм серину в клітинах

гліобластоми U87MG. Зокрема, розглядалися зміни у експресії *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* і *SHMT1* після нокдауну ERN1 за допомогою генетичних конструкцій dnERN1 та dnrERN1, а також після застосування міРНК та тунікаміцину.

Отримані результати показали, що експресія *PHGDH*, *PSAT1* і *PSPH* значно знижується при інгібуванні ERN1. Це свідчить про те, що ERN1 є важливим регулятором шляхів біосинтезу серину. Зокрема, експресія *PHGDH* знижувалася лише при пригніченні обох ферментативних активностей ERN1, що вказує на ключову роль протеїнкінази ERN1 у його регуляції. Натомість гени *PSAT1* і *PSPH* виявилися чутливими як до пригнічення ендорибонуклеазної, так і до пригнічення протеїнкіназної активності протеїну ERN1, що свідчить про комплексну регуляторну роль цього протеїну. Наведені результати добре узгоджуються з існуючими даними [44–46].

Дослідження рівня експресії *ATF4*, який регулює *PSAT1*, показало його значне зниження у клітинах з інгібованим ERN1, незалежно від того, чи була заблокована лише ендорибонуклеазна активність протеїну ERN1, чи були заблоковані його обидві активності. Це свідчить про те, що регуляція експресії *ATF4* здійснюється саме через ендорибонуклеазну активність ERN1. У той же час експресія *SHMT1* значно зросла після пригнічення ERN1, що може вказувати на механізм компенсації порушеного метаболізму серину через альтернативні метаболічні шляхи [46–48].

Подальший аналіз впливу пригнічення ERN1 і XBP1 на експресію генів підтвердив незалежність регуляції *PHGDH* і *SHMT1* від осі ERN1/XBP1, тоді як *ATF4*, *PSAT1* та *PSPH* частково або повністю контролювалися через XBP1-залежний шлях. Це підтверджує, що хоча ERN1 є центральним регулятором експресії цих генів, певні його ефекти опосередковуються саме через XBP1, особливо вплив на *ATF4*. Отримані результати добре узгоджуються з існуючими даними [49].

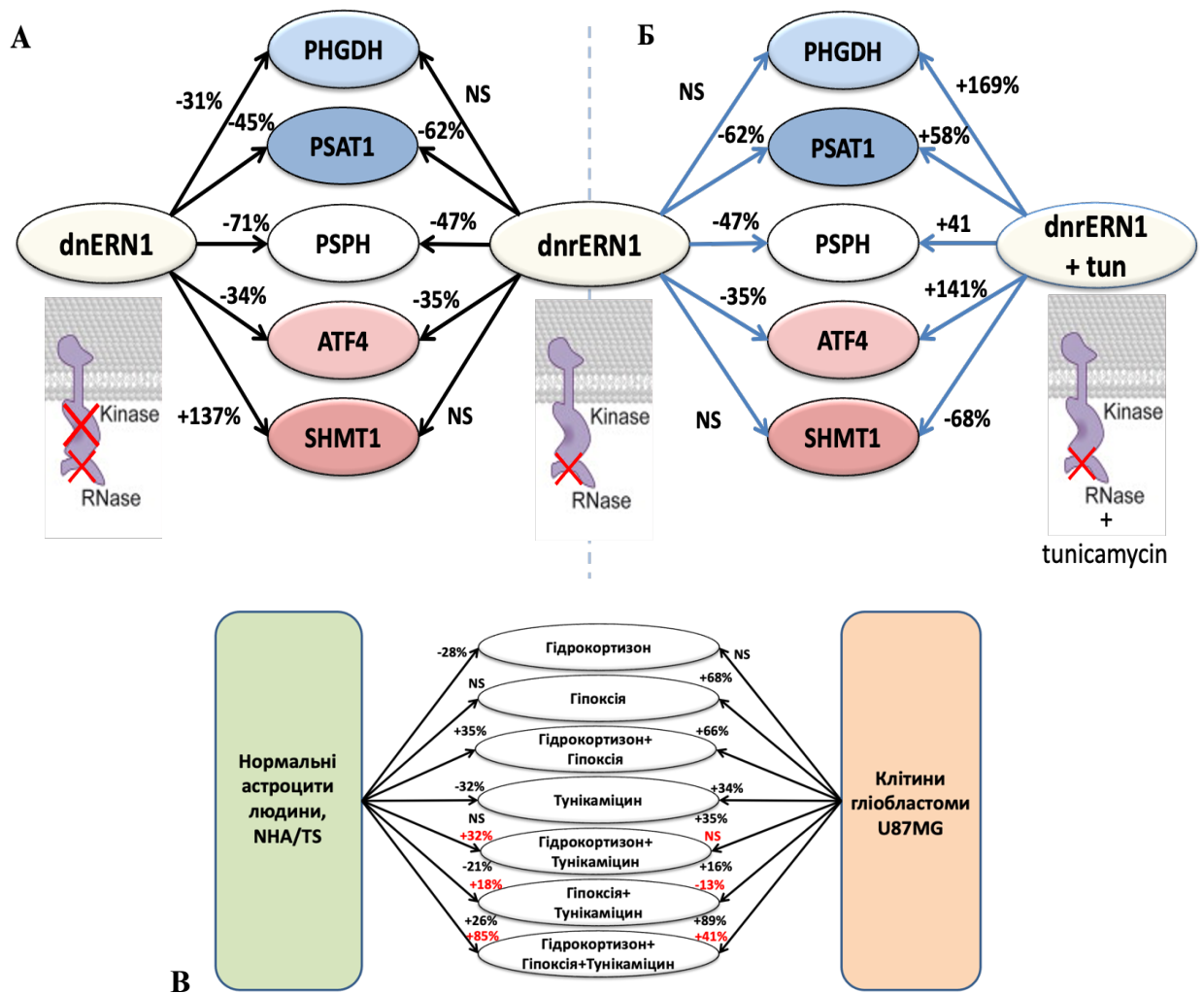
Додатковим підтвердженням отриманих результатів став аналіз рівня протеїну PSAT1 методом вестерн-блоту. Було показано, що пригнічення

ендорибонуклеазної або обох ферментативних активностей ERN1 призводить до значного зниження рівня цього протеїну у клітинах гліобластоми. Денситометричний аналіз показав зменшення рівня PSAT1 приблизно до 20 % від контрольного, що узгоджується зі зниженням рівня відповідної мРНК та підтверджує регуляцію експресії PSAT1 сигнальним шляхом ERN1.

Окрім цього, у роботі було досліджено регуляцію експресії гена *PSAT1* за умов різних стресових факторів, зокрема ER-стресу, гіпоксії та дії глюкокортикоїдного гормону гідрокортизону. Отримані результати показали, що у нормальних астроцитах ER-стрес, індукований тунікаміцином, та дія гідрокортизону окремо призводять до зниження експресії PSAT1, тоді як їх комбінований вплив частково компенсує інгібуючий ефект ER-стресу. Натомість у клітинах гліобластоми гідрокортизон не викликає суттєвих змін експресії цього гена, тоді як гіпоксія та ER-стрес здатні її підвищувати, що може свідчити про метаболічну адаптацію пухлинних клітин до умов стресу та особливостей їх мікрооточення [50-52].

Окремо було розглянуто дію тунікаміцину, який викликає стрес ендоплазматичного ретикулума. Виявлено, що у клітинах із пригніченою ендорибонуклеазною активністю ERN1 тунікаміцин значно підвищував експресію *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* та *ATF4*, але суттєво знижував рівень *SHMT1*. Це вказує на те, що, крім ERN1, у регуляції цих генів задіяні інші сигнальні шляхи ендоплазматичного ретикулума, зокрема PERK та ATF6, що підтверджується результатами, наведеними у ряді робіт [53-54].

Узагальнені результати роботи продемонстровано на рис. 3.17.



**Рис. 3.17.** Схематичне зображення результуючих даних експериментальних досліджень, наведених у роботі. Вплив вимкнення обох ферментативних активностей (dnERN1) та лише рибонуклеазної (dnrERN1) протеїну ERN1 у культурі клітин гліобластоми лінії U87MG (А) та вплив тунікаміцину на культуру клітин з вимкненням лише ендорибонуклеази протеїну ERN1(dnrERN1+tun) (Б); червоним хрестиком позначені пригнічені ферментативні активності протеїну ERN1. (В) Вплив гідрокортизону, гіпоксії та тунікаміцину на експресію *PSAT1* у нормальних астроцитах та клітинах гліобластоми. Порівняння з контролем та групою тунікаміцину (червоний колір)

Загалом, результати дослідження демонструють, що ERN1 є ключовим регулятором експресії генів, які контролюють метаболізм серину у клітинах гліобластоми. Його кіназна та ендорибонуклеазна ферментативні активності

відіграють різні ролі в регуляції експресії цих генів, причому ендорибонуклеазна активність контролює ген *ATF4*, тоді як його протеїнкіназна – *SHMT1*. Зниження активності ERN1 порушує баланс серинового метаболізму, що потенційно може використовуватися як терапевтична стратегія для пригнічення проліферації гліобластоми. Дія тунікаміцину вказує на можливість залучення інших шляхів СЕР в цей процес, що потребує подальших досліджень.

## ВИСНОВКИ

Пригнічення сигнального протеїну ERN1, що є одним із трьох шляхів відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума, змінює експресію генів, які беруть участь у синтезі та метаболізмі серину.

1. Виявлено зниження рівня експресії генів *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *ATF4* у клітинах гліобластоми лінії U87MG за умов блокади одного із сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума за рахунок домінантно/негативної конструкції ERN1, окрім гена *SHMT1*, рівень експресії якого значно підвищився.

2. Встановлено, що тунікамідин впливає на рівень експресії усіх генів, які беруть участь у регуляції синтезу та метаболізму серину у клітинах з *dnrERN1*.

3. Показано, що експресія генів, пов'язаних із синтезом та метаболізмом серину, змінюється у клітинах з пригніченою активністю ERN1 за різними механізмами: для генів *PHGDH* та *SHMT1* через протеїнкіназну активність ERN1, для *ATF4* через ендорибонуклеазну активність ERN1, а у контролі експресії генів *PSAT1* та *PSPH* задіяні обидві ензиматичні активності сигнального протеїну ERN1.

4. Продемонстровано, що експресія гена *PSAT1* змінюється під впливом різних стресових факторів, зокрема стресу ЕР, гіпоксії та гідрокортизону, причому характер цих змін залежить від типу клітин: у нормальних астроцитах спостерігається зниження експресії за дії стресу ендоплазматичного ретикулума та гідрокортизону, тоді як у клітинах гліобластоми U87 гіпоксія та стрес ендоплазматичного ретикулума сприяють її підвищенню, що може свідчити про метаболічну адаптацію пухлинних клітин до умов стресу.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Minchenko, O., Khita, O., Rudnytska, O., Yefimova, Y., Tsymbal, D., Minchenko, D., Sliusar, M., He, Q. and Liu, K. (2022). The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocrine regulations*, 56(2), pp. 115–125.
2. Possemato, R., Marks, K., Shaul, Y., Pacold, M., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H., Jang, H., Jha, A., Chen, W., Barrett, F., Stransky, N., Tsun, Z., Cowley, G., Barretina, J., Kalaany, N., Hsu, P., Ottina, K., Chan, A., Yuan, B., Garraway, L., Root, D., Mino-Kenudson, M., Brachtel, E., Driggers, E. and Sabatini, D. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*, 476(7360), pp. 346–350.
3. Tajan, M., Hennequart, M., Cheung, E., Zani, F., Hock, A., Legrave, N., Maddocks, O., Ridgway, R., Athineos, D., Suárez-Bonnet, A., Ludwig, R., Novellademunt, L., Angelis, N., Li, V., Vlachogiannis, G., Valeri, N., Mainolfi, N., Suri, V., Friedman, A., Manfredi, M., Blyth, K., Sansom, O. and Vousden, K. (2021). Serine synthesis pathway inhibition cooperates with dietary serine and glycine limitation for cancer therapy. *Nature communications*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20223-y> [Accesses 14 Jan. 2021].
4. Logue, S., McGrath, E., Cleary, P., Greene, S., Mnich, K., Almanza, A., Chevet, E., Dwyer, R., Oommen, A., Legembre, P., Godey, F., Madden, E., Leuzzi, B., Obacz, J., Zeng, Q., Patterson, J., Jäger, R., Gorman, A. and Samali, A. (2018). Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy. *Nature communications*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05763-8> [Accesses 15 Aug. 2018].
5. Almanza, A., Carlesso, A., Chinthia, C., Creedican, S., Doultisinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L., Fulda,

- S., Gorman, A., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E. and Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, 286(2), pp. 241–278.
6. Rathore, R., Schutt, C. and Van Tine, B. (2020). PHGDH as a mechanism for resistance in metabolically-driven cancers. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 3(4), pp. 762–774.
  7. Ding, R., Hong, W., Huang, L., Shao, J., Yu, W. and Xu, X. (2022). Examination of the effects of microRNA-145-5p and phosphoserine aminotransferase 1 in colon cancer. *Bioengineered*, 13(5), pp. 12794–12806.
  8. Rawat, V., Malvi, P., Della Manna, D., Yang, E., Bugide, S., Zhang, X., Gupta, R. and Wajapeyee, N. (2021). PSPH promotes melanoma growth and metastasis by metabolic deregulation-mediated transcriptional activation of NR4A1. *Oncogene*, 40(13), pp. 2448–2462.
  9. Gao, Y., Jing, N., Teng, X. and Wang, Y. (2023). Serine hydroxymethyltransferase 1 promotes low-grade glioma progression by activating mTORC1 signaling. *Neurological research*, 45(5), pp. 415–422.
  10. Read, A. and Schröder, M. (2021). The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology*, 10(5), pp. 384-394.
  11. Wu, J. and Kaufman, R. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ.*, 13(3), pp. 374–384.
  12. Hetz, C. and Glimcher, L. (2009). Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 $\alpha$  Interactome. *Mol. Cell.*, 35(5), pp. 551–561.
  13. Luo, D., He, Y., Zhang, H., Yu, L., Chen, H., Xu, Z., Tang, S., Urano, F. and Min, W. (2010). AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.*, 283(18), pp. 11905–11912.
  14. Iyer, S. and Adams, D. J. (2023). Bone and the Unfolded Protein Response: In Sickness and in Health. *Calcified tissue international*, 113(1), pp. 96–109.
  15. Korennykh, A., Egea, P., Korostelev, A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K., Stroud, R. and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of IRE1. *Nature*, 457(7230), pp. 687–693.

16. Woehlbier, U. and Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem. Sci.*, 36(6), pp. 329–337.
17. Мінченко, О., Харькова, А., Бакалець, Т. та Кривдюк, І. (2013). Стрес ендоплазматичного ретикулума, його сенсорно-сигнальні системи та роль у регуляції експресії генів за злоякісного росту і гіпоксії. *Укр. біохім. журн.*, 85(5), сс. 5–16.
18. Legg, K. (2022). Defective UPR linked to  $\beta$ -cell dedifferentiation. *Nature reviews. Endocrinology*, 18(12), pp. 716–727.
19. Wang, S. and Kaufman, R. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell. Biol.*, 197(7), pp. 857–867.
20. Moore, K. and Hollien, J. (2015). Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Molecular biology of the cell*, 26(16), pp. 2873–2884.
21. Han, D., Upton, J.-P., Hagen, A., Callahan, J., Oakes, S. and Papa, F. (2008). A kinase inhibitor activates the IRE1 $\alpha$  RNase to confer cytoprotection against ER stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365(4), pp. 777–783.
22. Bouchecareilh, M., Higa, A., Fribourg, S., Moenner, M. and Chevet, E. (2011). Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1 alpha modulate IRE1 alpha activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress. *FASEB J.*, 25(9), pp. 3115–3129.
23. Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Vajkoczy, P., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O. and Moenner, M. (2013). High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 $\alpha$  and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC cancer*, 13(1), 597–609.
24. Gupta, A., Read, D. and Gupta, S. (2015). Assays for induction of the unfolded protein response and selective activation of the three major pathways. *Methods in molecular biology*, 1292, pp. 19–38.
25. Guo, D., Tong, Y., Jiang, X., Meng, Y., Jiang, H., Du, L., Wu, Q., Li, S., Luo, S., Li, M., Xiao, L., He, H., He, X., Yu, Q., Fang, J. and Lu, Z. (2022). Aerobic

- glycolysis promotes tumor immune evasion by hexokinase2-mediated phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Cell metabolism*, 34(9), pp. 1312–1324.
26. Metten E., Logue, S., Healy, S., Manie, S. and Samali, A. (2019), The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biol. Cell*, 111(1), pp. 1–17.
27. Yi, M., Ban, Y., Tan, Y., Xiong, W., Li, G. and Xiang, B. (2019). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Molecular metabolism*, 20, pp. 1–13.
28. Zou, J., Li, P., Lu, F., Liu, N., Dai, J., Ye, J., Qu, X., Sun, X., Ma, D., Park, J. and Ji, C. (2013). Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Hematol. Oncol.*, 6(1), pp. 3–16.
29. Moenner, M., Pluquet, O., Bouchecareilh, M. and Chevet, E. (2007). The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Cancer Res.*, 67(22), pp. 10631–10634.
30. Nagelkerke, A., Bussink, J., Mujcic, H., Wouters, B., Lehmann, S., Sweep, F. and Span, P. (2013). Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response. *Breast Cancer Res.*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr3373> [Accessed 7 Jan. 2013].
31. Bobrovnikova-Marjon, E., Grigoriadou, C., Pytel, D., Zhang, F., Ye, J., Koumenis, C., Cavener, D. and Diehl, J. (2010). PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. *Oncogene*, 29(27), pp. 3881–3895.
32. Koumenis, C. (2006). ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr. Mol. Med.*, 6(1), pp. 55–69.
33. Cao, S. and Kaufman, R. (2013). Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 17(4), pp. 437–448.
34. Mahadevan, N. and Zanetti, M. (2011). 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.*, 187(9), pp. 4403–4409.
35. Auf G., Jabouille, A., Guerit, S., Pineau, R., Delugin, M., Bouchecareilh, M., Magnin, N., Favereaux, A., Maitre, M., Gaiser, T., Deimling, A., Czabanka, M., Vajkoczy, P., Chevet, E., Bikfalvi, A. and Moenner, M. (2010). Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(35), pp. 15553–15558.
36. Minchenko, D., Kharkova, A., Hubenia, O. and Minchenko, O. (2013). Insulin receptor, IRS1, IRS2, INSIG1, INSIG2, RRAD, and BAIAP2 gene expressions in glioma U87 cells with ERN1 loss of function: effect of hypoxia and glutamine or glucose deprivation. *Endocr. Regul.*, 47(1), pp. 15–26.
37. Karbovskyi, L., Minchenko, D., Danylovskyi, S., Moenner, M. and Minchenko, O. (2011). Endoplasmic reticulum–nuclei signaling enzyme-1 knockdown modulates effect of hypoxia and ischemia on the expression of circadian genes in glioma cells. *Studia Biologica*, 5(2), pp. 37–50.
38. Minchenko, D., Karbovskyi, L., Danylovsky, S., Moenner, M. and Minchenko, O. (2011). Effect of hypoxia, glutamine and glucose deprivation on the expression of mRNA of the retinoblastoma binding proteins in glioma cells. *Studia Biologica*, 5(1), pp. 57–68.
39. Reid, M., Allen, A., Liu, S., Liberti, M., Liu, P., Liu, X., Dai, Z., Gao, X., Wang, Q., Liu, Y., Lai, L. and Locasale, J. (2018). Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism. *Nature communications*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07868-6> [Accesses 21 Dec. 2018].
40. Li, L., Qin, Y. and Chen, Y. (2024). The enzymes of serine synthesis pathway in cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2024.119697> [Accesses 19 Feb. 2024].

41. Amelio, I., Cutruzzolá, F., Antonov, A., Agostini, M. and Melino, G. (2014). Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(4), pp. 191–198.
42. Mattaini, K., Sullivan, M. and Vander Heiden, M. (2016). The importance of serine metabolism in cancer. *The Journal of cell biology*, 214(3), pp. 249–257.
43. Geeraerts, S., Heylen, E., De Keersmaecker, K. and Kampen, K. (2021). The ins and outs of serine and glycine metabolism in cancer. *Nature metabolism*, 3(2), pp. 131–141.
44. Metcalf, S., Dougherty, S., Kruer, T., Hasan, N., Biyik-Sit, R., Reynolds, L. and Clem, B. F. (2020). Selective loss of phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) suppresses migration, invasion, and experimental metastasis in triple negative breast cancer. *Clinical & experimental metastasis*, 37(1), pp. 187–197.
45. Itoyama, R., Yasuda-Yoshihara, N., Kitamura, F., Yasuda, T., Bu, L., Yonemura, A., Uchihara, T., Arima, K., Hu, X., Jun, Z., Okamoto, Y., Akiyama, T., Yamashita, K., Nakao, Y., Yusa, T., Kitano, Y., Higashi, T., Miyata, T., Imai, K., Hayashi, H., Yamashita, Y., Mikawa, T., Kondoh, H., Baba, H. and Ishimoto, T. (2021). Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer. *Cancer letters*, 523, pp. 29–42.
46. Jin, L., Kiang, K., Cheng, S. and Leung, G. (2022). Pharmacological inhibition of serine synthesis enhances temozolomide efficacy by decreasing O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression and reactive oxygen species (ROS)-mediated DNA damage in glioblastoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 102(2), pp. 194–203.
47. Yun, H., Li, M., Guo, D., Jeon, S., Park, S., Lim, J., Lee, S., Liu, R., Du, L., Kim, S., Shin, T., Eyun, S., Park, Y., Lu, Z. and Lee, J. (2023). AMPK-HIF-1 $\alpha$  signaling enhances glucose-derived *de novo* serine biosynthesis to promote glioblastoma growth. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*,

- [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02927-3> [Accesses 15 Dec. 2023].
48. Minchenko, O., Khita, O., Krasnytska, D., Viletska, Y., Rudnytska, O., Hnatiuk, O. and Minchenko, D. (2023). Inhibition of ERN1 affects the expression of TGIF1 and other homeobox gene expressions in U87MG glioblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02927-3> [Accesses 15 Dec. 2023].
49. Walter, F., Schmid, J., Düssmann, H., Concannon, C. and Prehn, J. (2015). Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell death and differentiation*, 22(9), pp. 1502–1516.
50. Samanta, D. and Semenza, G. L. (2016). Serine Synthesis Helps Hypoxic Cancer Stem Cells Regulate Redox. *Cancer research*, 76(22), pp 6458–6462.
51. Mattaini, K., Sullivan, M. and Vander-Heiden, M. (2016). The importance of serine metabolism in cancer. *The Journal of cell biology*, 214(3), pp. 249–257.
52. Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A. and Gorman, A. (2016). The integrated stress response. *EMBO reports*, 17(10), pp. 1374–1395.
53. Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. and Majsterek, I. (2016). The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current molecular medicine*, 16(6), pp. 533–544.
54. Pan, Y., Huang, Q., Peng, X., Yu, S. and Liu, N. (2021). Circ\_0015756 promotes ovarian cancer progression via the miR-145-5p/PSAT1 axis. *Reproductive biology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100702> [Accesses 31 Oct. 2021].