

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2023 р.

**ВИВЧЕННЯ РОЛІ С1Q БІЛКА ЗВ'ЯЗАНИХ З TNF α , ПОВ'ЯЗАНЕ З
ФАКТОРОМ НЕКРОЗУ В ГІОБЛАСТОМІ ТА РОЗРОБКА
ОПТИМАЛЬНОЇ ОПТОГЕНЕТИЧНОЇ СТРАТЕГІЇ ЛІКУВАННЯ**

Кваліфікаційна робота бакалавра
денної форми навчання
за спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Катаєвої Ольги Іллівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Робота виконана на основі Університету Манітоби,
Медичного коледжу Макса Реді

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Гліобластома є поширеною та агресивною формою пухлини головного мозку, яка має серйозні наслідки для здоров'я та виживання пацієнтів, який на даний момент становить вкрай низький відсоток. Незважаючи на значні дослідницькі зусилля та медичний прогрес, висока смертність від гліобластоми та обмежені методи лікування залишають цю пухлину значною проблемою, і найголовніше – недостатньо вивченою. У зв'язку з цим необхідно глибше зрозуміти молекулярні механізми, що лежать в основі розвитку та прогресії гліобластоми, з метою розробки нових та ефективних стратегій лікування. Фактори некрозу пухлини (TNF) відіграють важливу роль у запальних процесах і мають значний вплив на пухлинне мікросередовище, проте їх конкретна роль та вплив на гліобластоми досі не повністю зрозумілі. Останні дослідження вказують на потенційний зв'язок C1q білка, компонента комплементу, з фактором некрозу пухлини в гліобластомі та виявлення C1q білка в пухлинних клітинах та пухлинної матриці гліобластоми свідчить про його важливість у пухлинному процесі та можливий вплив на прогресію пухлини. У цьому дослідженні ми використовували комп'ютерне моделювання та аналіз даних, щоб детальніше вивчити роль C1q білка, пов'язаного з фактором некрозу пухлини, в гліобластомі. Основні завдання цього дослідження включали наступні аспекти, з яких можна виділити вивчення рівнів експресії гена C1qTNF8 в пухлинних клітинах гліобластоми, та вплив цього білка на виучувану оптогенетичну стратегію, яка ґрунтується на залежності стовбурових клітин GBM (GSC) від функціонально інтактних мітохондрій.

Дане дослідження має велике значення для розширення наших знань про молекулярні механізми гліобластоми та для пошуку нових мішеней та стратегій лікування. Результати цієї роботи можуть бути основою для розробки

оптогенетичного підходу у лікуванні та прогнозуванні гліобластоми, що значно покращить результати лікування та виживання пацієнтів

Ключові слова: гліобластома, C1qTNF8, фактори некрозу пухлини (TNF), моделювання, ChETA-eYFP, mitoChR2-YFP, оптогенетична стратегія, комп'ютерне моделювання, аналіз даних.

Glioblastoma is a common and aggressive form of brain tumor, which has serious consequences for the health and survival of patients, which currently represents an extremely low percentage. Despite significant research efforts and medical advances, high mortality from glioblastoma and limited treatment options leave this tumor a significant problem and, most importantly, understudied. In this regard, it is necessary to better understand the molecular mechanisms underlying the development and progression of glioblastoma to develop new and effective treatment strategies. Tumor necrosis factors (TNF) play an important role in inflammatory processes and have a significant impact on the tumor microenvironment, but their specific role and impact on glioblastoma is still not fully understood. Recent studies indicate a potential relationship between C1q protein, a component of complement, and tumor necrosis factor in glioblastoma, and the detection of C1q protein in tumor cells and the tumor matrix of glioblastoma suggests its importance in the tumorigenic process and possible impact on tumor progression. In this study, we used in silico modeling based on computational modeling and data analysis to further explore the role of tumor necrosis factor-related protein C1q in glioblastoma. In silico modeling allows virtually investigating the potential role of C1q protein in tumor development and progression, saving time, and resources, and selecting new treatment strategies. The main objectives of this study included the following aspects, from which it is possible to highlight the study of C1qTNF8 gene expression levels in glioblastoma tumor cells and to analyze the studied optogenetic strategy to understand how it may affect the development and progression of glioblastoma. This study is of great importance for

expanding our knowledge about glioblastoma's molecular mechanisms and finding new targets and treatment strategies.

Keywords: glioblastoma, C1qTNF8, swelling necrosis factor (TNF), modeling, ChETA-eYFP, mitoChR2-YFP, optogenetic strategy, computer modeling, data analysis.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури:	11
1.1 Роль білка C1qTNF8 у гліобластомі: загальні відомості про паталогію та загальний огляд експресії та функцій C1qTNF8 у гліобластомі.....	10
1.1.1 GSC у пухлинних середовищах.....	12
1.1.2 Загальний огляд експресії C1QTNF8 та функціональність.....	16
1.1.3 Проблеми лікування гліобластоми людини. Оптометаболичні та оптогенетичні стратегії у контексті C1QTNF8.....	18
1.2 Онкогеноміка та біоінформатика у дослідженні пухлин головного мозку: застосування біоінформатичних методів для аналізу геномних даних гліобластоми.....	24
1.2.1 Методи вивчення геномних даних гліобластоми.....	24
1.2.2 Біоінформаційні інструменти та бази даних, для зберігання та експлуатації даних гліобластоми.....	26
РОЗДІЛ 2. Аналіз експресії C1qTNF8 та розробка оптогенетичної стратегії:.....	29
2.1 Вивчення ролі C1qTNF8 у гліобластомі: аналіз вираження гена C1qTNF8 у гліобластомі та його вплив на біологічні процеси в пухлинних клітинах.....	29
2.2 Аналіз впливу оптогенетичної стратегії на зміни мікрооточення гліобластоми та анлізіз повязаною з нею структурою ChR2-YFP.....	41
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

C1qTNF8 (STRP8) – комплемент C1q білок, пов'язаний з фактором некрозу пухлини 8

GSC - стовбурові клітини гліобластоми

TAM - тамоксифен

GBM (GB) - гліобластома

ERK - екстрацелюлярно-сигнальована кіназа

PI3K/Akt - фосфоінозитид-3-кіназа/Akt

mTOR - мікроангіопатичний об'єднувач клітин

Akt - протеїн-кіназа B

TMZ - темозоломид

SNP - однонуклеотидний поліморфізм

ERK1/2 - екстрацелюлярно-сигнальовані кінази 1/2

CRF - кортикотропін-релізуючий фактор

RXFP - рецептор фактора релаксину

ChR2 - родопсин-2

mitoChR2-YFP - мітохондріальний ChR2-YFP

ChETA - чутливий до світла іонний канал E123T/A130R

HR - галородопсин

BR - бактеріородопсин

AR - археородопсин

Glu – глутамат

Trp - триптофан

Asp - аспаргат

ВСТУП

Актуальність роботи

Гліобластома є найпоширенішою та злоякісною первинною пухлиною головного мозку та пов'язана з однією з найнижчих п'ятирічних виживань серед усіх видів раку. Незважаючи на мультимодальне агресивне лікування, що включає хірургічне видалення, локальну радіотерапію та системну хіміотерапію, медіанний час виживання після діагнозу досі становить лише близько 12 місяців, згідно з дослідженнями на основі популяційних даних, що вказують на ще більш короткий термін медіанного виживання. Це наголошує на необхідності більш глибокого розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі розвитку та прогресії цієї пухлини, з метою розробки нових та більш ефективних стратегій лікування.

Фактори некрозу пухлини (TNF) відіграють ключову роль у запальних процесах і мають значний вплив на пухлинне мікросередовище, однак, їх точні функції та механізми впливу на розвиток гліобластоми залишаються недостатньо вивченими. Недавні дослідження підказують, що C1q білок, що є складовою компонента комплементу, може бути пов'язаний з фактором некрозу пухлини в гліобластомі, так як C1q білок був виявлений в пухлинних клітинах і пухлинній матриці гліобластоми, що вказує на його важливість у пухлинному процесі та можливий вплив на прогресію пухлини. Це спостереження передбачає, що білок C1q може виконувати регуляторні функції в пухлинному мікросередовищі, включаючи взаємодію з фактором некрозу пухлини і вплив на клітинні процеси, пов'язані з проліферацією, виживанням, міграцією та інвазією пухлинних клітин. Більш глибоке розуміння ролі C1q білка та його взаємодії з фактором некрозу пухлини в гліобластомі може пролити світло на молекулярні механізми розвитку та прогресії цієї пухлини, що в результаті може призвести до розробки нових стратегій лікування та покращення результатів для пацієнтів.

Однією з передових стратегій, про яку я буду говорити у своїй дослідницькій роботі включає в себе мінімально інвазивну м'яку біоелектроніку. Стратегія ґрунтується на оптометаболичному підході, який використовує залежність стовбурових клітин GBM (GSC) від функціонально інтактних мітохондрій. У нашому дослідженні ми описуємо нову генну конструкцію, яка специфічно експресує сконструйований світловий канал родопсин-2-жовтого флуоресцентного білка (mitoChR2-YFP та ChETA-eYFP) в мітохондріях стовбурових клітин GSC. Ця генна конструкція дозволяє контрольовану фотоактивацію, що спричиняє відкриття каналів mitoChR2-YFP та мітохондріальну дисфункцію в клітинах GSC.

C1qTNF8 є білком, який відіграє роль у регуляції мітохондріальних функцій та проліферації клітин, одже дослідження ролі C1qTNF8 в контексті гліобластоми може привести до кращого розуміння взаємозв'язку між оптогенетичною стратегією, що ми використовуємо для фотоактивації мітохондрій, та регуляцією C1qTNF8 в клітинах GSC.

Таким чином, дослідження ролі C1q білка, пов'язаного з фактором некрозу пухлини, у гліобластомі з використанням комп'ютерних моделей є актуальним та перспективним напрямом досліджень. Результати цієї роботи можуть принести нові наукові відкриття та надати базу для розробки нових стратегій лікування та прогнозування прогресії гліобластоми, що може суттєво вплинути на покращення результатів лікування та виживання пацієнтів.

Ключові слова: гліобластома, C1qTNF8, фактори некрозу пухлини (TNF), моделювання, ChETA-eYFP, mitoChR2-YFP, оптогенетична стратегія, комп'ютерне моделювання, аналіз даних.

Метою даної роботи є більш глибоке розуміння ролі C1q білка, пов'язаного з фактором некрозу пухлини, в гліобластомі, так як він все ще залишається недостатньо вивченим, а також дослідження нової оптогенетичної стратегії завдяки м'якої інвазійної біоелектроніки, що ґрунтується на залежності стовбурових клітин GBM (GSC) від функціонально інтактних мітохондрій. Зокрема, у цій роботі ми прагнули досягти таких цілей:

1. *Вивчення виразу гена C1qTNF8 у гліобластомі.* Було проведено аналіз рівнів експресії гена C1qTNF8 в пухлинних клітинах гліобластоми, що дозволяє нам визначити, наскільки поширений вираз цього гена та його зв'язок з розвитком пухлини.
2. *Оцінка впливу C1qTNF8 на біологічні процеси у пухлинних клітинах.* На даному етапі було прийнято рішення вивчити функціональні наслідки підвищеного виразу C1qTNF8 у пухлинних клітинах гліобластоми.
3. *Дослідження ефекту оптогенетичної стратегії на гліобластомі.* У цей розділ входило вивчення ефекту вибраної оптогенетичної стратегії на виживання клітин гліобластоми, та оцінка ролі між C1qTNF8 та вибраною оптогенетичною стратегією.

Загалом, ця робота спрямована на розширення наших знань про молекулярні механізми гліобластоми та пошук нових стратегій лікування. Результати досліджень можуть мати значущість для розробки інноваційних підходів до лікування гліобластоми та підвищення виживання пацієнтів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль білка '1 у гліобластомі: загальні відомості про паталогію та загальний огляд експресії та функцій C1qTNF8 у гліобластомі

Гліобластома – найпоширеніша злоякісна пухлина головного мозку у дорослих. Вона становить близько 46,6% від усіх випадків пухлин центральної нервової системи. Частота виникнення гліобластоми збільшується з віком і медіанний вік діагностики становить близько 64 років.

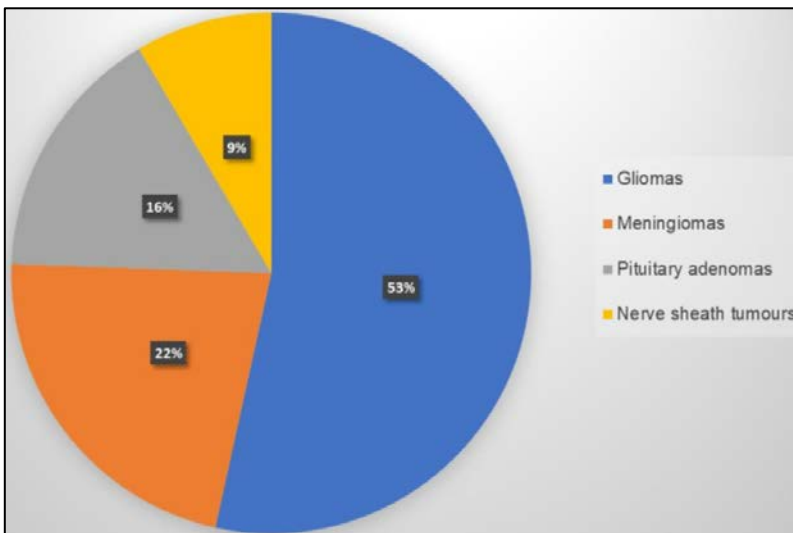


Рисунок 1. Типи раку головного мозку за частотою. Злоякісні пухлини головного мозку називаються на честь тканини, з якої вони розвиваються. Гліоми є найпоширенішим видом злоякісної пухлини головного мозку.

Характеризується швидким та агресивним зростанням, і часто не піддається лікуванню. Прогноз для пацієнтів з гліобластомою залишається несприятливим, і медіанне виживання становить близько 12 місяців. Лише близько 5,5% пацієнтів виживають понад 5 років після діагнозу. Гліобластома може викликати серйозні неврологічні симптоми, включаючи слабкість, порушення зору та чутливості, зміни настрою, проблеми з пам'яттю та судоми.

[1]

Перед тим, як переходити безпосередньо до самої теми розділу, варто торкнутися не менш важливого аспекту, такого як мікросередовище в типах і підтипах гліобластоми.

1.1.1 GSC у пухлинних середовищах

Варто сказати, що гліобластома є агресивною та гетерогенною пухлиною головного мозку, і вона характеризується наявністю гліобластомних стовбурових клітин (GSC), які відіграють ключову роль у розвитку та прогресії пухлини. GSC є особливою популяцією клітин із високою стійкістю до лікування та знаходяться у вершині ієрархії пухлинних клітин. Ці клітини мають складні епігенетичні та мутаційні ландшафти, які дозволяють їм уникати клітинних контрольних механізмів.

Дослідження показують, що GSC є складною популяцією, що включає різні мікростани, що підтримуються широким спектром атракторів, таких як пухлинна екосистема. Це призводить до постійних транскрипційних флуктуацій, які призводять до гетерогенності та високої адаптивності клітин [3-4]. Ієрархічні моделі клітинної диференціації гліобластоми підтверджують прогресивний перехід від стовбурових клітин до більш диференційованих нащадків. GSC знаходяться у стані максимальної ентропії та підтримуються сприятливим епігенетичним ландшафтом з низьким виразом генів (Фігура 1).

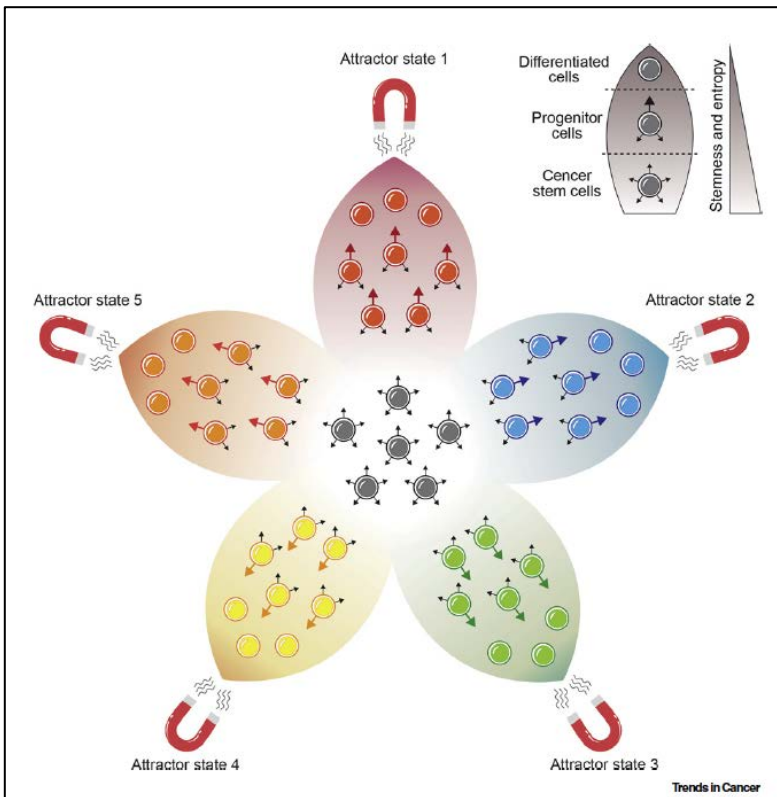


Рисунок 2. Модель атракторного стану гліобластоми. Стовбурові клітини гліобластоми в центрі ієрархії пухлин мають найвищу ентропію та здатність до адаптації. Атракторні стани (наприклад, мікросередовища, генетичні мутації, терапевтичне втручання) стимулюють розвиток різних популяцій пухлинних клітин. Кожна кольорова пелюстка зображує різні атракторні стани, що визначають пропорції кожного клітинного стану. Стрілки різних клітинних станах позначають спрямованість аттракторного стану.

У процесі транскрипційних флуктуацій стовбурові клітини можуть перемикатися між різними потенційними станами, що збільшує гетерогенність популяції. Це може призводити до появи нових субпопуляцій ракових клітин, відмінних від вихідної пухлини, і лікування може сприяти таким змінам.

GSC мають більшу стійкість до терапії в порівнянні з іншими клітинами пухлини через хаотичну флуктуацію в експресії генів і складності взаємодій з

атракторними станами. Генетична нестабільність пухлини змінює потенційний простір клітин, відрізняючи пухлинні мережі від нормальних [6]. Пухлинні мережі мають високу ентропію і різні енергетичні взаємини між стовбуровими і нестемовими клітинами. Однак виділення транскрипційних відмінностей між стовбуровими та нестемовими клітинами гліобластоми на рівні однієї клітини становить складність. [7, 8]

Розуміння динаміки ієрархічної мережі GSC та її взаємодії з навколишньою пухлинною екосистемою відкриває нові перспективи для досліджень та розробки більш ефективних стратегій лікування гліобластоми. Нещодавні прориви в імунотерапії раку показують значущість вроджених компонентів імунної системи, таких як пухлинні макрофаги (TAM), у пухлинному мікросередовищі [5] (Рисунок 2.).

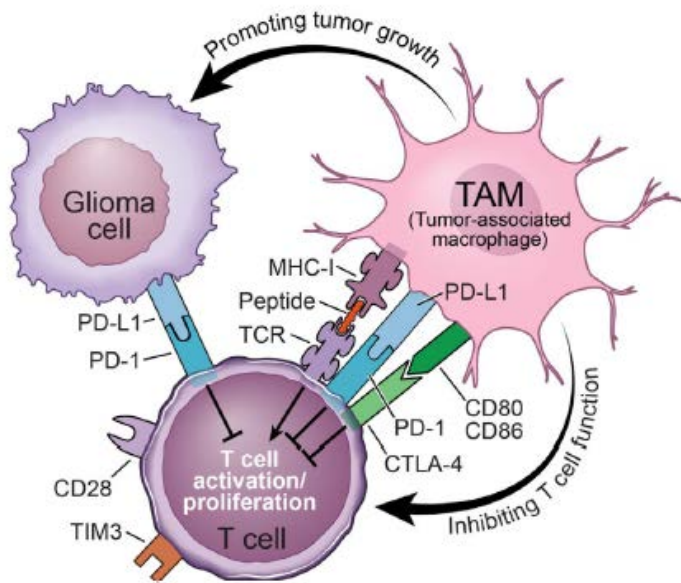


Рисунок 3. *Механізми, за допомогою яких пухлинні макрофаги (TAM), пригнічують функції тумородеструктивних T-клітин у гліобластомі.*

Комбіновані терапії, які враховують пухлинні клітини, TAM та T-клітини, можуть призвести до більш ефективного лікування гліобластоми.

Однак, однією з проблем для дослідницької спільноти в області нейроонкології, і, фактично, для всієї спільноти ракових стовбурових клітин, є обмеження вимірювання станів клітин через відсутність чітких імунофенотипів для ракових стовбурових клітин та обмежених функціональних аналізів для вимірювання біології пухлин. Тому розробка терапії, спрямованої на стійкі популяції, має розглядати як стан клітин чи певну клітинну долю, а й потенціал клітин. Цей потенційний простір GSC визначається внутрішніми генетичними та епігенетичними ландшафтами, а також зовнішніми складними пухлинними мікросередовищами, що діють як атрактори. Різноманітні метаболічні, запальні та сигнали між клітинами у цих середовищах підтримують гетерогенність, яка додатково посилюється зворотним зв'язком, оскільки GSC генерують та змінюють свої середовища [7,8]. Взаємодії між GSC та їх навколишніми середовищами є важливими атракторними станами і є важливими для створення гетерогенності пухлин, тим самим сприяючи розвитку популяцій, стійких до лікування. GSC у різних пухлинних середовищах представлені на малюнку 3 [9,10].

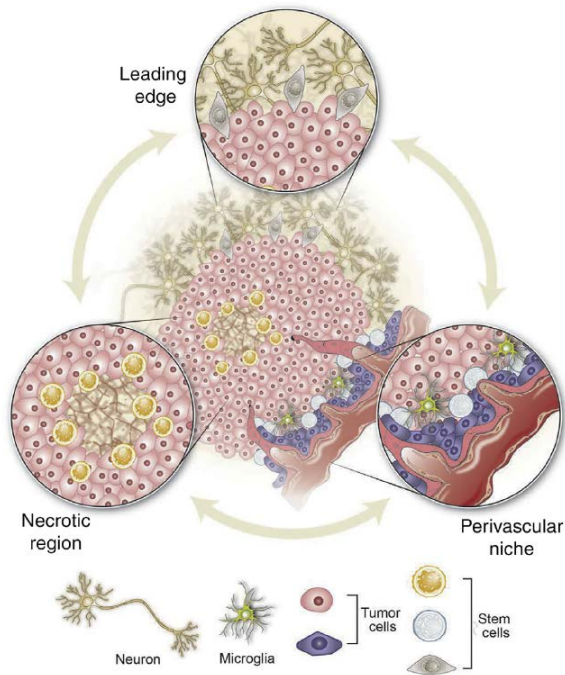


Рисунок 4. Гліобластомні стовбурові клітини (GSC) у різних нішах пухлини. GSC виявляються в мікросередовищі пухлини та підтримують гетерогенність через унікальні взаємодії клітин та властивості ніш усередині пухлини. Ці ніші не є стабільними та незалежними, а є динамічними двигунами клітинної адаптації та резистентності, які обмінюються інформацією та перетворюються у міру зростання та адаптації пухлини.

Одним із факторів, який може відігравати важливу роль у цьому контексті, є білок C1QTNF8.

1.1.2 Загальний огляд експресії C1QTNF8 та функціональність

C1QTNF8 експресується, здебільшого, в мембрані головного мозку людини (Рисунок 5), і передбачається, що він виступає як активатор ракових стовбурових клітин і може впливати на гетерогенність пухлин та розвиток стійких популяцій клітин.

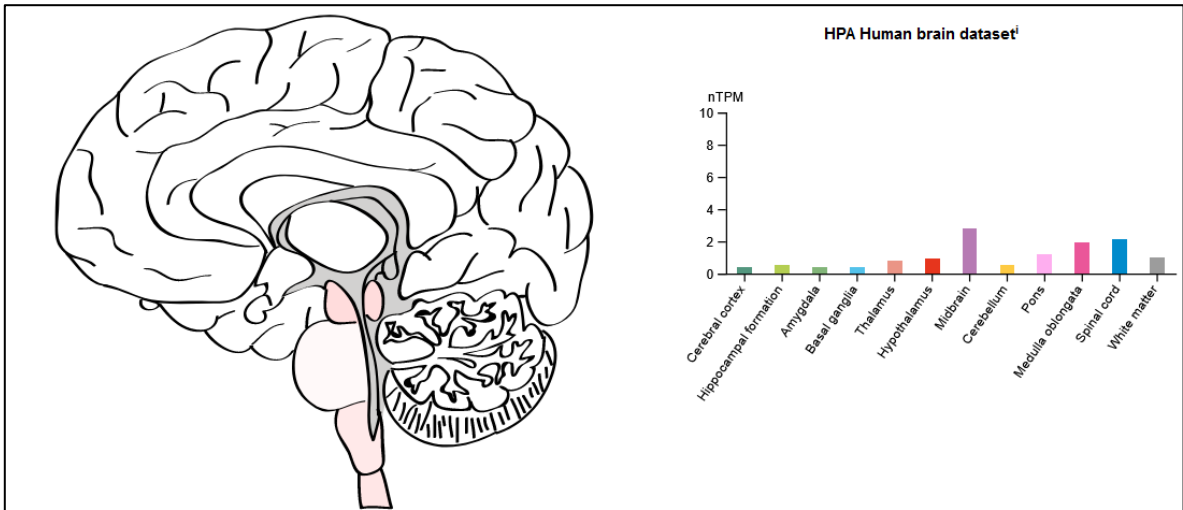


Рисунок 5. Локалізація експресії *C1QTNF8* у мозку людини. Зони, де була виявлена експресія, зображені на фігурі блідо-рожевим кольором.

Роль білка *C1qTNF8* у гліобластомі (GBM) має важливе значення для розуміння взаємодій між гліобластомними стовбуровими клітинами (GSC) та їх докільям. Ці взаємодії є ключовими факторами формування гетерогенності пухлин та розвитку популяцій пухлинних клітин, стійких до лікування, так як підвищений або пригнічений вираз *C1qTNF8* може впливати на ці процеси, і тим самим модулювати розвиток пухлини та її відгук на лікування.

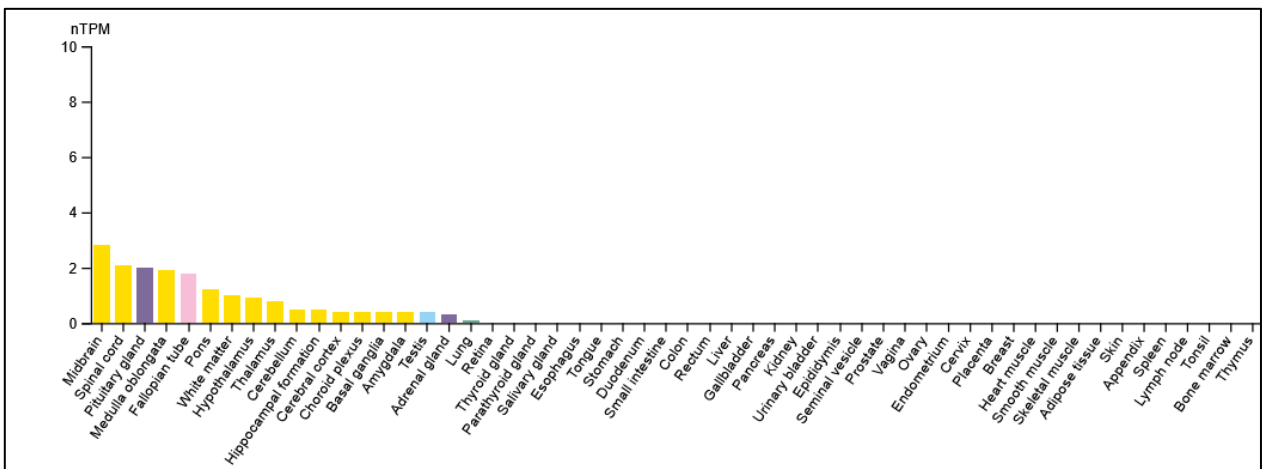


Рисунок 6. Рівні експресії C1qTNF8 у різних зразках тканин. Як можна помітити з діаграми, ми чітко бачимо, що тканинна специфічність РНК найбільше захоплює головний мозок, маткову трубу, гіпофіз.

Розуміння ролі C1qTNF8 у цих взаємодіях може допомогти розкрити механізми, якими GSC та докільця взаємодіють, і як ці взаємодії сприяють розвитку стійких до лікування популяцій пухлинних клітин. Це знання може бути корисним для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на порушення цих взаємодій та подолання стійкості до лікування у пацієнтів з GBM.

Експресія гена C1qTNF8 в гліобластомі може змінюватись в залежності від факторів, таких як стадія пухлини, гістологічна градація та молекулярні підтипи. Високі або помірні рівні експресії C1qTNF8 спостерігаються в деяких субгрупах гліобластоми, особливо в більш агресивних або менш диференційованих пухлинах, що може вказувати на зв'язок із несприятливими клінічними характеристиками.

1.1.3 Проблеми лікування гліобластоми людини. Оптометаболичні та оптогенетичні стратегії у контексті C1qTNF8.

Як і говорилося раніше, підвищений вираз C1qTNF8 в пухлинних клітинах гліобластоми (Рисунок 7) асоціюється з посиленням їх проліферації, і при обговоренні оптометаболичної стратегії нам потрібно це пам'ятати з низки причин.

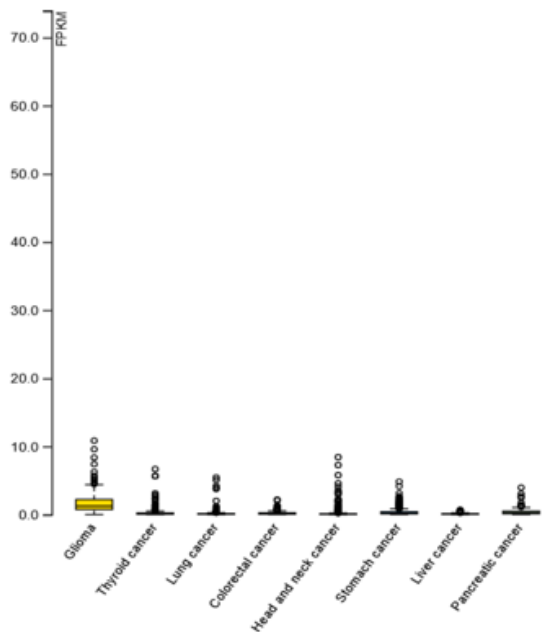


Рисунок 7. Діаграма, що відображає рівень експресії C1qTNF8 при різних онкологічних патологіях. На схемі чітко можемо помітити яскраво виражену експресію саме в гліобластомі людини.

C1qTNF8 сприяє активації сигнальних шляхів, пов'язаних з проліферацією, таких як шлях екстрацелюлярно-сигналізуючої кінази (ERK), шлях фосфоінозитид-3-кінази/протеїнкінази В (PI3K/Akt) та шлях механістичної мішені рапаміцину (mTOR) [2,11]. Ці сигнальні шляхи відіграють важливу роль у регуляції клітинного циклу та стимулюють клітинний поділ, що призводить до збільшення проліферації пухлинних клітин.

Крім того, підвищений вираз C1qTNF8 також сприяє виживаності пухлинних клітин гліобластоми. C1qTNF8 активує протеїнкіназу Акт (Akt) та інгібує апоптоз, програмовану клітинну загибель [2]. Це відбувається шляхом збільшення експресії антиапоптотичних білків, таких як Bcl-2 та Bcl-xl, та зниження активації каспазів, ключових факторів виконання апоптозу. Таким

чином, підвищений вираз C1qTNF8 забезпечує пухлинним клітинам виживання та захист від апоптозу.

У метаболічних процесах пухлинних клітин гліобластоми також спостерігаються зміни при застосуванні оптометаболічної стратегії, і про це варто поговорити окремо, у контексті труднощів у підході лікування та розвитку оптометаболічної стратегії та також у контексті досліджуваної статергії.

Стандартне лікування гліобластоми (ГБМ) включає хірургічне видалення пухлини, за яким слідує хіміорадіотерапія з використанням темозоломідом (TMZ) [12, 15]. Однак, незважаючи на це, виживання пацієнтів протягом 5 років залишається низьким, згідно зі звітом CBTRUS 2020 року, де воно становить лише 7,2% [13]. Практично всі пухлини ГБМ локально рецидивують після лікування, незважаючи на максимальне хірургічне видалення та агресивну ад'ювантну терапію [14].

Однією з основних проблем лікування (GBM) є неповне видалення пухлини на клітинному рівні через високу інфільтративність пухлинної тканини [16]. Крім того, присутність гіпоксичних зон пухлини забезпечує периваскулярні ніші для ініціюючих клітин гліоми. Ці клітини мають здатність до самооновлення і можуть давати потенційно більш агресивні рецидивні пухлини, які стають стійкими до радіотерапії та хіміотерапії [17,18]. Велика міжпухлинна та внутрішньопухлинна гетерогенність також є проблемою при

розробці цілеспрямованої терапії для GBM [19] (Фігура 7).

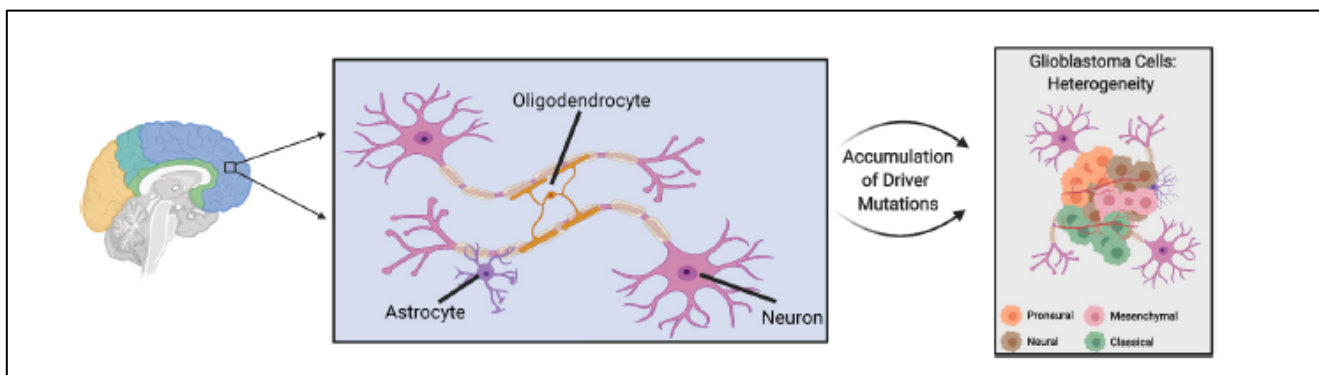


Рисунок 8. Клітинне походження та гетерогенність багатопланової гліобластоми (GBM). Пухлини GBM походять від трьох типів клітин у паренхімі мозку: нейральних стовбурових клітин, астроцитів, утворених з НСК, та клітин-попередників олігодендроцитів.

Раніше GBM була класифікована на основі генетичних та епігенетичних маркерів [20,21]. Різні субтипи GBM, такі як мезенхімальний, класичний та проневральный, мають різну агресивність та просторовий розподіл усередині пухлини [20,22]. Перехід фенотипу від проневрального до мезенхімального пов'язаний з підвищеною опірністю GBM. Останні дослідження показали, що одна пухлина може містити різноманітність клітин, включаючи всі підгрупи GBM, що демонструє їхню міжпухлинну гетерогенність [15].

Ще однією проблемою при лікуванні GBM є гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ), який обмежує проникнення лікарських препаратів у пухлину головного мозку та створює перешкоду для імунних клітин [23,24]. ГЕБ складається зі спеціалізованих ендотеліоцитів та стиків між клітинами, що забезпечують фізичну та функціональну ізоляцію центральної нервової системи (ЦНС) від навколишнього середовища. Це перешкоджає ефективній доставці хіміотерапевтичних препаратів до пухлинних клітин та сприяє створенню імуносупресивного мікросередовища в пухлини.

Оптометаболична стратегія націлена на порушення енергетичного метаболізму пухлинних клітин, що може знизити їхню виживання та проліферацію. Однією з важливих змін є перемикання метаболічного шляху від аеробного до анаеробного метаболізму, відомого як ефект Уорбурга. Пухлинні клітини вважають за краще використовувати гліколіз в умовах нестачі кисню, навіть за його наявності, щоб забезпечити швидке утворення енергії та необхідні метаболіти для свого зростання.

Оптометаболична стратегія спрямована на порушення цього ефекту Уорбурга та приведення пухлинних клітин до використання аеробного метаболізму, заснованого на окисненні жирних кислот та глюкози. Це може бути досягнуто шляхом придушення ключових ферментів, що беруть участь у гліколітичному шляху, таких як гексокіназа та піруваткіназа, та стимуляції мітохондріального окисного фосфорилування. При застосуванні оптометаболичної стратегії відбуваються зміни в сигнальних шляхах, пов'язаних з пухлинними клітинами. Наприклад, активація сигнального шляху Акт/mTOR може бути знижена, що призводить до зменшення синтезу протеїнів та порушення росту пухлинних клітин. Крім того, зниження активації ERK-шляху може впливати на проліферацію та виживання клітин.

Оптометаболична стратегія націлена на порушення метаболічних процесів та сигнальних шляхів, які підтримують зростання та виживання пухлинних клітин гліобластоми. Розуміння ролі C1qTNF8 у цих процесах може відкрити нові перспективи для розробки молекулярно-цільових терапій, які зможуть специфічно впливати на пухлинні клітини та покращити результати лікування гліобластоми. У контексті альтернативних стратегій лікування гліобластоми, вибрана мною стратегія працює на розвитку мінімально інвазивної м'якої біоелектроніки як нового та інноваційного підходу до перемоги над GBM. Використовуючи оптогенетичну стратегію, ми спрямовуємося на стовбурові

клітини GBM, що є регенеративною силою при цьому типі раку. Ми використовуємо генну конструкцію для специфічної експресії сконструйованого світлового каналу родопсин-2-жовтого флуоресцентного білка, націленого на мітохондрії. Це дозволяє фотоактивувати мітохондрії в клітинах GSC та сприяти їх дисфункції. Ми робимо акцент на тому, що ваша оптометаболична стратегія працює незалежно від підтипу GBM, резистентності до лікування темозоломідом (TMZ) та статусу рецидиву.

Загалом, підвівши підсумок, говорячи про роль білка C1qTNF8 у гліобластомі можна сміливо сказати, що він відіграє важливу роль у гліобластомі (GBM) і пов'язаний з декількома ключовими аспектами цього пухлинного захворювання. Підвищений вираз C1qTNF8 пов'язаний з покращеною виживанням пацієнтів з GBM, а також із зменшенням проліферації, міграції та інвазії пухлинних клітин. C1qTNF8 впливає на метаболічні процеси та сигнальні шляхи, пов'язані з GBM, особливо при застосуванні оптометаболичної стратегії. Він здатний модулювати метаболізм глюкози, амінокислот та ліпідів у пухлинних клітинах, що може призводити до зменшення їх енергетичного забезпечення та виживання. Крім того, C1qTNF8 може впливати на сигнальні шляхи, такі як шлях mTOR і NF-κB, які відіграють важливу роль у проліферації та виживання пухлинних клітин.

Таким чином, C1qTNF8 представляє потенційно цікаву мету розробки нових терапевтичних підходів до лікування GBM. Подальші дослідження механізмів дії C1qTNF8 та його взаємодії з іншими молекулами та сигнальними шляхами допоможуть розкрити його повний потенціал у боротьбі з цією пухлиною та покращити результати лікування у пацієнтів із GBM.

1.2 Онкогеноміка та біоінформатика у дослідженні пухлин головного мозку: застосування біоінформатичних методів для аналізу геномних даних гліобластоми.

Онкогеноміка є міждисциплінарною областю дослідження, що поєднує онкологію та геноміку, з метою розуміння молекулярних основ розвитку та прогресування пухлин. У разі гліобластоми, агресивної пухлини головного мозку, онкогеноміка відіграє важливу роль у вивченні генетичних змін та молекулярних механізмів, що сприяють її розвитку та прогресуванню [25].

1.2.1 Методи вивчення геномних даних гліобластоми

Для вивчення геномних даних гліобластоми застосовуються різноманітні методи, що ґрунтуються на принципах біоінформатики; одним із ключових методів є *секвенування геному*, яке дозволяє отримати повну інформацію про послідовність ДНК пухлинних клітин. Сучасні дослідження гліобластоми застосовують методи короткого читання (*short-read sequencing*) та довгого читання (*long-read sequencing*), що дозволяють виявляти генетичні варіації, включаючи мутації, інсерції, делеції та структурні зміни в геномі, пов'язані з розвитком пухлини [28].

Таблиця 1. Секвенування геному гліобластоми

Секвенування геному гліобластоми			
Short-read sequencing		Long-read sequencing	
Переваги	Недоліки	Переваги	Недоліки
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Висока точність секвенування ❖ Висока пропускна здатність (велика кількість прочитувань в одній реакції) ❖ Доступність та низька вартість ❖ Широко застосовується в геномічних дослідженнях та клінічних діагностиках 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Обмежена довжина прочитуваних фрагментів (зазвичай до кількох сотень нуклеотидів) ❖ Важко вирішити проблему повторів та структурно складних регіонів геному ❖ Потребує асамблювання (складання) коротких фрагментів в повну послідовність геному 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Здатність прочитати довгі фрагменти геному, включаючи повторювані та структурно складні регіони ❖ Допомогає вирішити проблему повторів та складних геномних регіонів ❖ Спрощує процес асамблювання (складання) геному ❖ Застосовується для вивчення структурних варіацій геному та довгих нуклеотидних послідовностей 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Нижча точність секвенування порівняно з коротким читанням ❖ Обмежена пропускна здатність (менша кількість прочитувань в одній реакції) ❖ Вища вартість технології

Крім того, для аналізу геномних даних гліобластоми використовуються методи *аналізу експресії генів*. Аналіз експресії генів дозволяє дослідникам

визначити, які гени активно експресуються в пухлинних клітинах та які біологічні процеси контролюються цими генами. Технології аналізу експресії генів можуть включати мікрочіпи для гібридизації (microarray hybridization), методи секвенування РНК (RNA-seq) та інші підходи [26]. Аналіз експресії генів дозволяє виявити диференціальну експресію генів між пухлинними та нормальними клітинами, а також ідентифікувати ключові гени, пов'язані з розвитком та прогресуванням гліобластоми.

Також важливим аспектом онкогеноміки є аналіз генетичних варіантів та поліморфізмів у геномі гліобластоми. Це може містити пошук одонуклеотидних поліморфізмів (SNP), структурних варіацій, змін кількості копій генів та інших генетичних варіацій, які можуть бути пов'язані з розвитком пухлини та її прогресуванням [27]. Біоінформатичні методи дозволяють ідентифікувати ці генетичні варіанти та аналізувати їх функціональні наслідки.

1.2.2 Біоінформаційні інструменти та бази даних, для зберігання та експлуатації даних гліобластоми.

Біоінформаційні інструменти та бази даних, що використовуються для зберігання, обробки та інтерпретації геномних даних гліобластоми, включають:

1. *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*: TCGA є великою базою даних геномних даних різних типів пухлин, включаючи гліобластоми. Вона містить інформацію про експресію генів, зміни в ДНК і РНК, метилювання генів та інші молекулярні аспекти пухлинного розвитку. TCGA забезпечує доступ до загальнодоступних даних та інструментів для їх аналізу.
2. *Gene Expression Omnibus (GEO)*: GEO - це загальнодоступний репозиторій геномних даних, включаючи дані про експресію генів. Він містить безліч

наборів даних по гліобластомі, які можна використовувати для аналізу та порівняльних досліджень.

3. *R/Bioconductor*: R - це мова програмування та середовище розробки, що широко використовуються в біоінформатиці. Bioconductor - це пакети та інструменти для аналізу геномних даних, доступні в R. Вони надають функції для обробки, нормалізації та аналізу геномних даних, включаючи методи кластеризації, диференціальної експресії та машинного навчання.
4. *TCGA-Assembler*: *TCGA-Assembler* - це інструмент, розроблений для аналізу та інтеграції даних TCGA. Він забезпечує функції для завантаження та обробки даних TCGA, а також для виконання різних аналізів, включаючи ідентифікацію субтипів та аналіз виживання.
5. *NCBI Gene (National Center for Biotechnology Information Gene)* – це база даних, яка надає інформацію про гени різних організмів. Вона містить дані про генну структуру, функції генів, включаючи білкові продукти генів, а також інформацію про пов'язані з ними біологічні процеси та патології. NCBI Gene є одним з важливих інструментів для дослідників у галузі генетики та біології, оскільки надає доступ до масштабної та куратованої інформації про гени та пов'язані з ними аспекти.
6. *TMHMM (TransMembrane Hidden Markov Model)* - це програмне забезпечення для передбачення трансмембранних (перетинають мембрану) регіонів у білках. Воно використовує приховані марківські моделі для аналізу послідовностей амінокислот та визначення ймовірності трансмембранних ділянок в білку. Пророцтво трансмембранних регіонів за допомогою TMHMM допомагає дослідникам краще зрозуміти структуру та функцію білка і може бути корисним при аналізі геномних даних та передбаченні властивостей білкових молекул.

Це лише деякі приклади біоінформаційних інструментів та баз даних, які широко використовуються для аналізу геномних даних гліобластоми. Кожен має свої особливості і призначений для виконання конкретних завдань у дослідженнях гліобластоми та інших пухлин, але тут представлені ті, що ми будемо часто використовувати на протязі експерименту.

У заключенні, беручи до уваги усе вище написане, а також проаналізувавши доступні нам джерела, можна сказати, що біоінформатичний аналіз геномних даних гліобластоми дозволяє ідентифікувати та характеризувати механізми резистентності до лікування, пов'язані з роллю C1qTNF8. Це має важливе значення для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на подолання резистентності та покращення результатів лікування пацієнтів з гліобластомою.

РОЗДІЛ 2. ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА РОЗРОБКА ВІРТУАЛЬНОЇ МОДЕЛІ.

2.1 Вивчення ролі C1qTNF8 у гліобластомі: аналіз вираження гена C1qTNF8 у гліобластомі та його вплив на біологічні процеси в пухлинних клітинах.

На сьогоднішній день відомо, що сімейство C1q-тумор некроз-фактор-пов'язаних білків (CTRP) містить 15 членів, які мають спільну структуру з сигнальним пептидом N-кінцевого залишку, змінною областю, колагеновим доменом та глобулярним доменом C1q у C-кінцевому залишку [37]. Накопичені дані підтверджують позитивну залежність між членами CTRP та канцерогенезом або сигнальними шляхами, пов'язаними з розвитком, прогресією та метастазуванням пухлин. Наприклад, CTRP3/cartducin активує сигнальний шлях ERK1/2, що сприяє зростанню пухлини остеосаркоми [38]. CTRP4 підвищує опір пухлинних клітин апоптозу [40], а CTRP6, що експресується в гепатоцелюлярній карциномі, індукує фосфорилування АКТ і ERK і прискорює неоваскуляризацію пухлини [14]. CTRP1, що взаємодіє з CTRP6, також активує АКТ та ERK, а CTRP9 сприяє фосфорилуванню АМПК/АКТ/eNOS та утворенню NO [42, 43].

CTRP8 - недавно відкритий і найзагадковіший член сімейства CTRP [43]. CTRP8, що є високо консервативним протягом еволюції, утворює гомотримери, але також може утворювати гетероолігомерні комплекси з фактором, пов'язаним із C1q (CRF). Ми виявили експресію CTRP8 у всіх, за винятком однієї (95%), первинних клітинах гліобластоми (GB), у всіх лініях GB та у нормальних астроцитах (Рисунок 10).

Цікавістю C1qTNF8 є те, що він експресується не лише в тканині головного мозку, але й у різних органах та тканинах організму. Наприклад,

зафіксовано найвищий рівень експресії C1qTNF8 у слинній залозі. Це свідчить про широкий спектр функцій цього білка в організмі та можливі його важливі ролі у різних фізіологічних процесах.

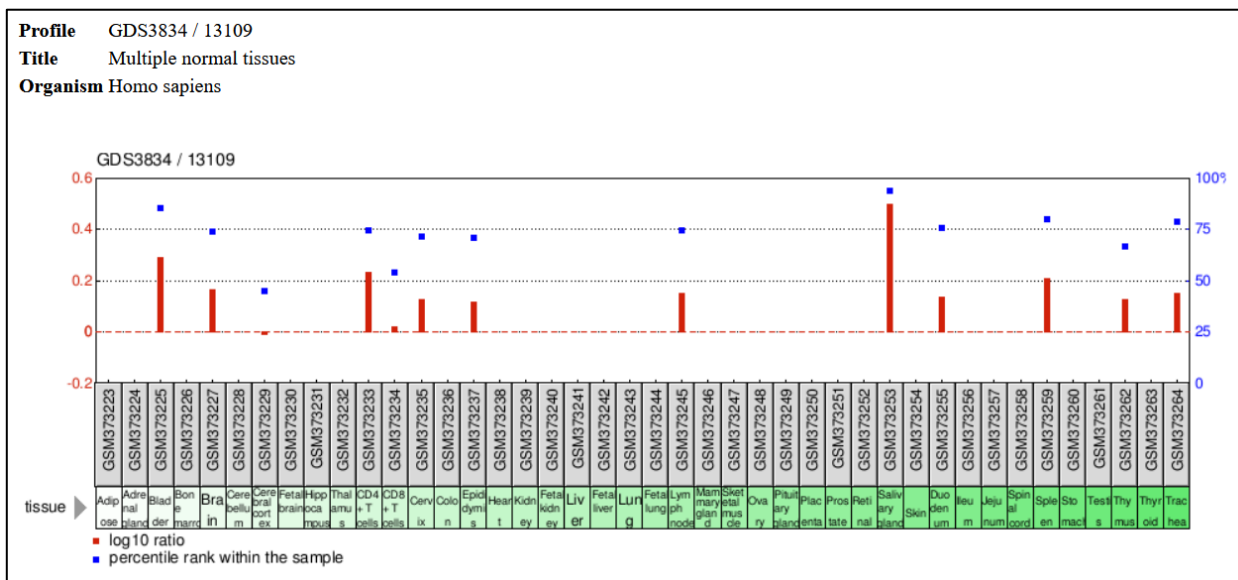


Рисунок 9. Демонстрація рівнів експресії C1qTNF8 у різних тканинах людини (аналіз 42 нормальних тканин). Результати взяті зі вільного доступу в GEO.

Але у контексті дослідження експресії C1qTNF8 у гліобластоми є надзвичайно актуальним; наша робота базується на попередніх наукових відкриттях. Наприклад, було продемонстровано, що у тканинах гліобластоми (GB) людини було виявлено присутність RXFP1 і CTRP8 [43]. Маленькі пептиди P74 і P59 мають гомологію з доменом C1q у CTRP8 і можуть збільшувати рівень cAMP у клітинах CHO-K1 з експресуючими конструкціями RXFP1 [44, 45]. Це важливо, оскільки збільшення рівня cAMP є важливим сигнальним подією в клітині, і може впливати на різноманітні біологічні процеси. Зокрема, cAMP може активувати різні шляхи сигналізації і впливати на клітинну проліферацію, диференціацію та виживання. Тому, здатність пептидів P74 і P59 збільшувати рівень cAMP може мати значення для регуляції цих процесів. У свою чергу успішне спільне збагачення RXFP1 з CTRP8 дозволило ідентифікувати (і)

СТРР8 як нового партнера взаємодії RXFP1 і (ii) RXFP1 як першого рецептора для члена сімейства СТРР. СТРР8 викликає сигнальні події за умови наявності функціонального RXFP1 в клітинах головного мозку людини [43].

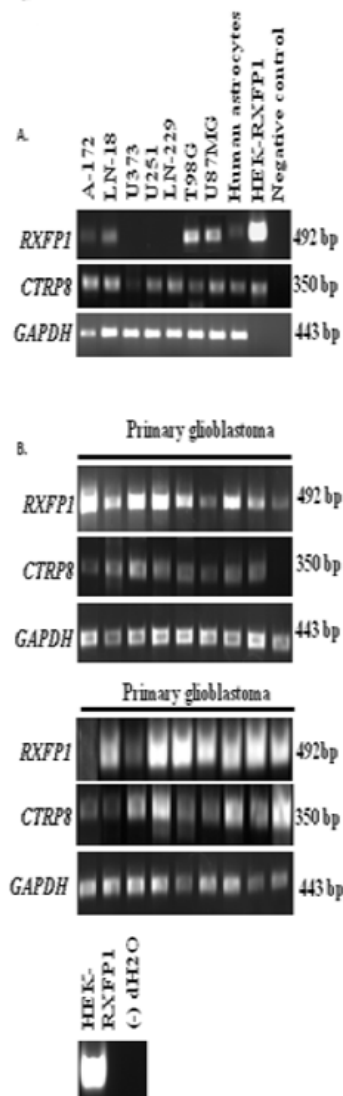


Рисунок 10. Транскрипти, що кодують RXFP1 і CTRP8, були виявлені на різних рівнях експресії у встановлених клітинних лініях раку головного мозку А. та первинних клітинах гліобластоми В., як підтверджено методом RT-PCR. GAPDH використовувався як контроль експресії. РНК-ізолятів з HEK293T-RXFP1-НА використовувалися як позитивний контроль в RT-PCR. Коли вмісту CDNA було замінено на воду, транскрипти не виявлені.

Ці висновки свідчать про тісну взаємодію між GB (гліобластома) і CTRP8. До того ж взаємодія між CTRP8 (C1q-TNF-пов'язані пептиди) та RXFP1 (рецептор) в гліобластомі (GB) людини викликає активну сигнальний каскад. Цей сигнальний шлях включає підвищення рівня циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), активацію фосфоінозитид-3-кінази (PI3-кінази) та збільшення фосфорилування протеїнкінази C ζ (PKC ζ) та протеїнкінази C δ (PKC δ) [46]. Ці сигнальні події в клітинах GB можуть мати значення для регуляції різноманітних клітинних процесів, включаючи ріст, проліферацію, диференціацію і виживання клітин. Відкриття CTRP8-RXFP1 як потенційного сигнального шляху може відкрити нові перспективи для дослідження і розуміння функціональних властивостей інших членів сімейства CTRP та їх ролі в нормальному і патологічному стані головного мозку.

Виходячи з усього вищеперерахованого, доцільним є провести експеримент, пов'язаний з аналізом даних про експресію CTRP8 нормальному і патологічному стані головного мозку, чим і є мій експеримент.

Першим кроком в експерименті є пошук доступних баз даних, які містять інформацію про вираз гена C1qTNF8 в гліобластомі та нормальних клітинах. У моєму експерименті я використовувала доступне сховище даних GEO для пошуку найбільш підходящого варіанту. Для мене найбільш підходящим експериментом був "Профілювання транскрипції з використанням високопродуктивного послідовного аналізу РНК на гліобластомах" (GSE59612), де порівнювалися клітини гліоми з нормальними клітинами головного мозку, що є оптимальним для нас.

Метод, використаний в цьому експерименті, є диференціальним мРНК-послідовним аналізом (RNA-Seq), що також підходить для нашого дослідження.

disease	▲ clinical information	◆ No. of Samples
glioma	glioma - contrast-enhancing sample	39
glioma	glioma - non-enhancing FLAIR+ sample	36
normal	non-neoplastic brain	17

Рисунок 11. Експериментальні дані складаються з 36 зразків "Non-enhancing margin" та 39 зразків "Contrast-enhancing core", а також 17 зразків нормальних клітин головного мозку. "Non-enhancing margin" означає невидиму з підсиленням (не-контрастну) межу. У контексті раку головного мозку це вказує на області пухлини, які не проявляють контрастне підсилення на зображеннях, отриманих за допомогою методів, таких як магнітно-резонансна томографія з покращенням контрасту. "Contrast-enhancing core" означає контрастно підсилюване ядро, що вказує на центральну область пухлини, яка проявляє контрастне підсилення. Ці дані важливі для визначення розміру та інтенсивності пухлини та планування лікування.

Після вибору даних про експресія гену C1qTNF8 вони були витягнуті для подальшого аналізу в середовищі Bioconductor (з використанням мови R). Потім було проведено попередню обробку даних про вираз гену C1qTNF8 з використанням програмного пакету DESeq2 для статистичного аналізу та роботи з генними виразами.

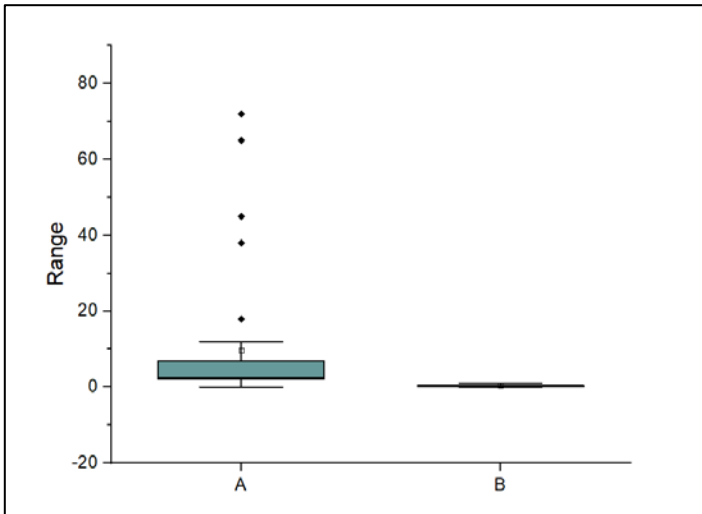


Рисунок 14. "Contrast-enhancing core" порівняння експресії гліоми та нормальних клітин головного мозку.

При порівнянні нормальних клітин головного мозку з клітинами гліоми в обох випадках, видно, що перший випадок переважає.

Назва гену	C1QTNF8 (CTPR8)	
Захворювання/порівняння	Glioma vs Normal	
Клінічна інформація	Contrast-enhancing	Non-enhancing margin
Середнє значення експресії	7.1351×10^{-3}	1.8429×10^{-3}

Таблиця 2. Коротке зведення по експерименту

Наступним пунктом проведення експерименту є проведення статистичного аналізу з використанням програми (у моєму випадку це Origin), щоб визначити відмінності у вираженні гена C1qTNF8 між нормальністю і патологією.

1. Статистична перевірка зразків Contrast-enhancing vs Normal

Normality Test (6/14/2023 01:03:31)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

NormalityTest

Shapiro-Wilk

	DF	Statistic	p-value	Decision at level(5%)
A	36	0.53771	1.74484E-9	Reject normality
B	36	0.87545	7.77165E-4	Reject normality

A: At the 0.05 level, the data was not significantly drawn from a normally distributed population.
B: At the 0.05 level, the data was not significantly drawn from a normally distributed population.

За результатами тесту Шапіро-Уїлка можна зробити висновок, що дані не були розподілені нормально. Це означає, що для подальшого аналізу нам потрібно використовувати непараметричні тести.

Kolmogorov-Smirnov Test (6/14/2023 01:04:25)

Notes

X-Function	Kolmogorov-Smirnov Test
User Name	Olga Kataeva
Time	6/14/2023 01:04:25
Data Filter	No

Input Data

	Data	Range
1st Data Range	[Book1]Sheet1!A	[1:36]
2nd Data Range	[Book1]Sheet1!B	[1:36]

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
A	36	0	2	2.5	7	72
B	36	0.014	0.075	0.329	0.509	1.085

Frequencies

	N
A	36
B	36

Test Statistics

	D	Z	Exact Prob> D
	0.88889	3.77124	4.66294E-15

Null Hypothesis: $F(x) = G(y)$
Alternative Hypothesis: $F(x) \neq G(y)$
At the 0.05 level, the two distributions are significantly different.

2. Статистична перевірка зразків *Non-enhancing margin vs Normal*

Normality Test (6/14/2023 00:54:35)

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

NormalityTest

Shapiro-Wilk

	DF	Statistic	p-value	Decision at level(5%)
B	35	0.56707	5.48772E-9	Reject normality
C	35	0.87172	7.47066E-4	Reject normality

B: At the 0.05 level, the data was not significantly drawn from a normally distributed population.
 C: At the 0.05 level, the data was not significantly drawn from a normally distributed population.

За результатами тесту Шапіро-Уїлка можна зробити висновок, що дані не були розподілені нормально. Це означає, що для подальшого аналізу нам потрібно використовувати непараметричні тести.

Kolmogorov-Smirnov Test (6/14/2023 00:57:30)

Notes

X-Function	Kolmogorov-Smirnov Test
User Name	Olga Kataeva
Time	6/14/2023 00:57:30
Data Filter	No

Input Data

	Data	Range
1st Data Range	[Book1]Sheet1!B	[2:36]
2nd Data Range	[Book1]Sheet1!C	[2:36]

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
B	35	0	1	2	6	66
C	35	0.014	0.075	0.329	0.509	1.085

Frequencies

	N
B	35
C	35

Test Statistics

	D	Z	Exact Prob> D
	0.77143	3.22712	1.68298E-10

Null Hypothesis: $F(x) = G(y)$
 Alternative Hypothesis: $F(x) \neq G(y)$
 At the 0.05 level, the two distributions are significantly different.

Отже, після проведення аналізу ми отримали дані, які показують, що рівень експресії гена C1qTNF8 статистично відрізняється між нормальними клітинами головного мозку та клітинами гліоми. Це означає, що існує реальна зміна в експресії цього гена між цими двома типами клітин. Отримані дані підтверджують нашу гіпотезу і дають підстави продовжувати експеримент та подальший аналіз.

Дані, які ми отримали, є підтвердженням того, що ген C1qTNF8 може відігравати важливу роль у розвитку гліобластоми та може бути потенційно використаний, при подальшому дослідженні, як маркер для діагностики або терапії цього типу раку.

Подальший аналіз цих даних може допомогти виявити механізми, які стоять за змінами в експресії гена та встановити зв'язок з іншими факторами, що впливають на розвиток гліобластоми. Для цього ми використаємо програму для функціонального аналізу генів Enrichr, щоб визначити потенційні біологічні процеси та шляхи, в яких бере участь ген C1qTNF8. Завдяки цій програмі, C1QTNF8 розширено за допомогою ARCHS4 RNA-seq матриці ко-експресії ген-ген шляхом визначення найкращих генів, які переважно коекспресують із C1QTNF8. За цим аналізом ми маємо наступні результати, які потрібно детально обговорили.

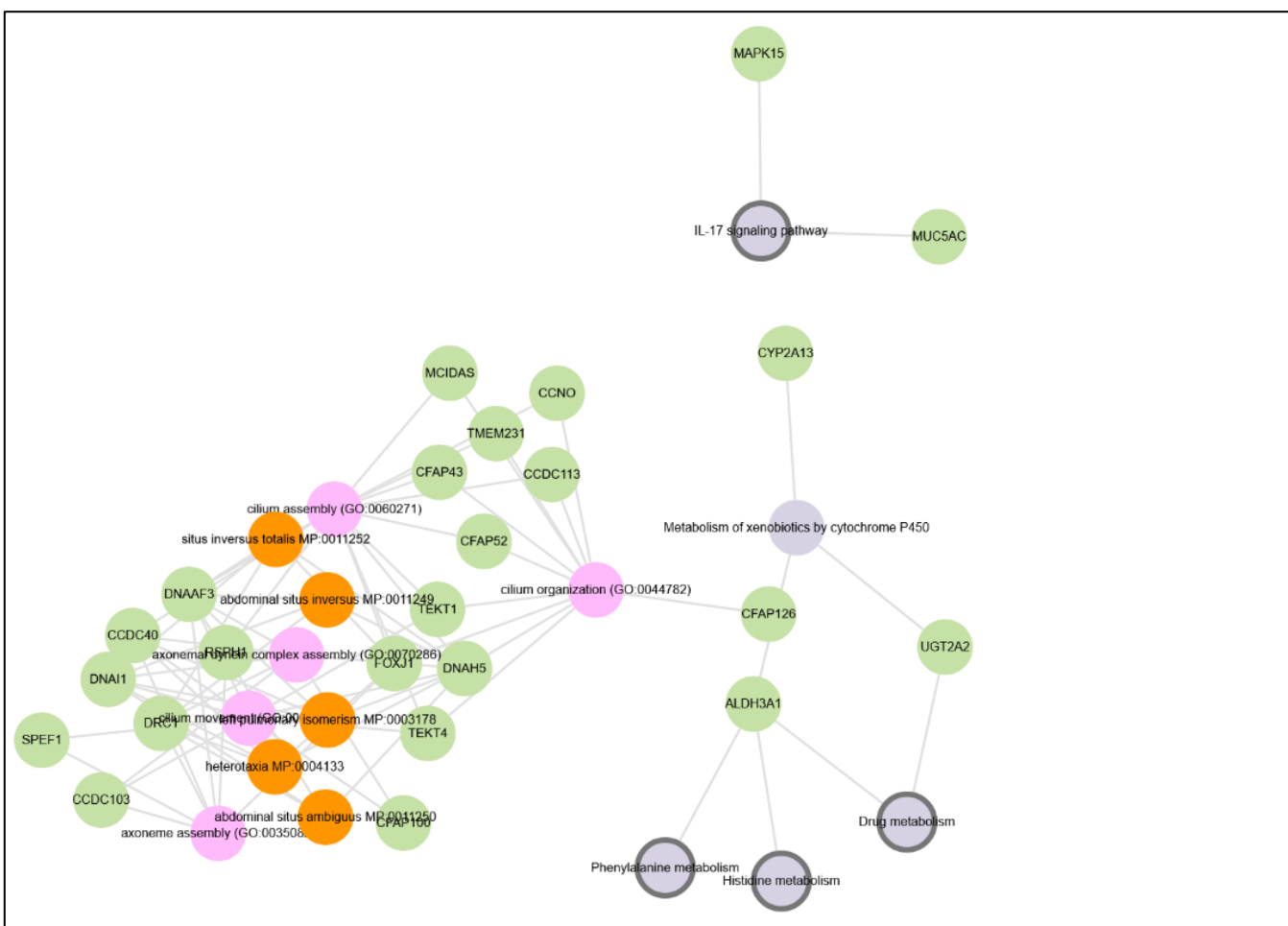
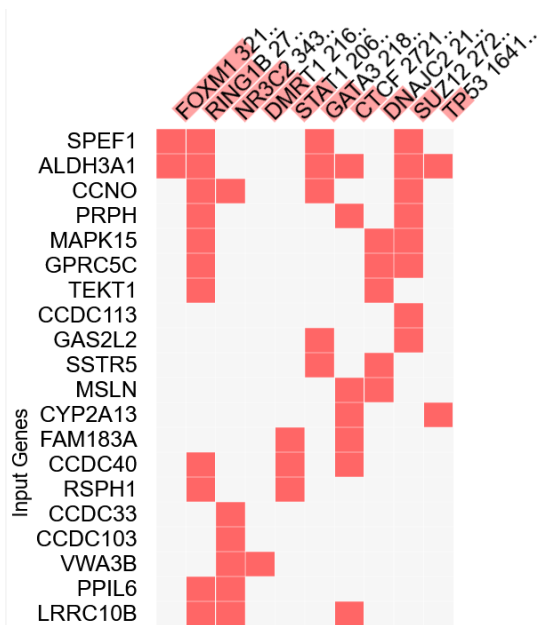


Рисунок 15. Зображення, отримане завдяки за допомогою ARCHS4 RNA-seq матриці ко-експресії ген-ген шляхом визначення найкращих генів, які переважно коекспресують із *CIQTNF8*.

Виходячи із бази даних та таблиці, ми можемо бачити найбільш вивчені, та розповсюдженні білки, з якими корелює *C1qTNF8*, і таким чином, встановлюємо що ці білки можуть зв'язуватися з специфічними областями гену *C1qTNF8* на генетичному матеріалі, впливаючи на його транскрипцію та рівень активності.



Фі. Карта досліджень, та білків, які переважно коекспресують із C1QTNF8. Дослідження, які були проведені на різних клітинних моделях і методом ChIP-Seq.

Дослідження, які були проведені на різних клітинних моделях і методом ChIP-Seq, надають певні вказівки щодо можливої взаємодії гена C1qTNF8 з різними білками в контексті різних типів раку. Зокрема, виявлено можливу взаємодію гена C1qTNF8 з білками E2F1, AF4, MYC, SFPI1, VDR, TEAD4, JARID1A та ELF3. Ці результати вказують на потенційну роль гена C1qTNF8 у ракових процесах, включаючи гліому мозку, лейкемію, рак грудей, рак крові та рак підшлункової залози. Молекулярний механізм взаємодії гена C1qTNF8 з цими білками може включати формування комплексів білок-ДНК, де білки (наприклад, E2F1, AF4, MYC) зв'язуються з специфічними регуляторними областями гену C1qTNF8 на генетичному матеріалі. Ці комплекси можуть впливати на транскрипцію гена C1qTNF8, контролюючи його рівень активності. В результаті взаємодії гена C1qTNF8 з білками MYC, JARID1A та MYCN можливо активація або репресія транскрипції цього гена. Даний процес може впливати на різні клітинні функції, такі як регуляція росту, поділ клітин,

апоптоз (програмована смерть клітини) та інші, що можуть бути важливими факторами в раковому процесі. З врахуванням взаємодії гена C1qTNF8 з білками AF4 та SFPI1, можливо виникнення дисфункцій у розвитку та диференціації клітин, що можуть сприяти появі раку. Зв'язок гена C1qTNF8 з білками VDR та TEAD4 може вказувати на роль цього гена в регуляції імунної відповіді та впливі на тканинну архітектуру, що можуть мати значення в раковому процесі. У випадку взаємодії гена C1qTNF8 з білком ELF3, можливо відбувається регуляція транскрипції цього гена, що може впливати на клітинний ріст, проліферацію та інші процеси, які мають важливе значення в раку підшлункової залози.

Усі ці молекулярні механізми взаємодії гена C1qTNF8 з різними білками показують складність молекулярних процесів, що відбуваються в клітинах під час ракового процесу, однак, для більш детального розуміння цих взаємодій та їх потенційної ролі в ракових процесах, потрібні додаткові дослідження.

2.2 Протокол аналізу впливу оптогенетичної стратегії на зміни мікрооточення гліобластоми та аналіз пов'язаною з нею структурою ChR2-YFP

Ми вже встановили вірогідну залежність між експресією C1qTNF8 та GSC, що є регенеративною силою при первинному та рецидивному GBM - це дає нам підґрунтя вважати даний білок корисним інструментом для розробки стратегій, орієнтованих на зміну мікрооточення гліобластоми. Вивчення ролі C1q білка зв'язаних з TNF 8, пов'язане з фактором некрозу в пухлині головного мозку та розробка оптогенетичної стратегії лікування наразі є актуальною темою, так як альтернативні стратегії лікування гліобластоми (GBM) вкрай необхідні, оскільки поточні методи лікування вважаються паліативними. Хірургічна резекція з подальшою променевою та хіміотерапією алкілюючим

препаратом темозоломідом (TMZ) часто призводить до хіміорезистентності до TMZ і фатальних рецидивів GBM.

Однією з найприспективнішою є радикально нова та інноваційна стратегія мінімально інвазивної м'якої біоелектроніки. Дослідницька лабораторія Медичного коледжу Макса Реді, що вивчає пухлини головного мозку працює на стовбурових клітинах GBM (GSC). Вибрана оптогенетична стратегія використовує залежність стовбурових клітин GBM (GSC) від функціонально інтактних мітохондрій і використовує нову генну конструкцію для GSC-специфічної експресії сконструйованого світлового каналу родопсин-2-жовтого флуоресцентного білка, націленого на мітохондрії (mitoChR2-YFP). Контрольована фотоактивація викликає відкриття каналів mitoChR2-YFP і мітохондріальну дисфункцію в клітинах GSC, незалежно від підтипу GBM, статусу рецидиву або статі пацієнта. У свою чергу вивчення ролі C1q білка зв'язаних з TNF 8 та впровадження його в оптогенетичну стратегію лікування GBM може привести до розробки ефективних та інноваційних методів лікування, що допоможуть подолати хіміорезистентність та покращити прогноз для пацієнтів з GBM.

Channelrhodopsin-2 (ChR2) - це світловий реактивуємий катіонний канал (47, 48), який може використовуватися для контролю проникності Na^+ через мембрану клітини з роздільною здатністю у мілісекундах. Зовнішня експресія ChR2 була використана для досягнення неінвазивного контролю потенціалу мембрани в нейронах інтактного мозку (49, 50) і, недавно, в кардіальних клітинах і тканині (51, 52). Недавно було створено кілька нових варіантів каналродопсинів з метою зміни спектральних властивостей фотобілка, іонної провідності, а також ефективності локалізації в мембрані та експресії білка (53, 54). Наприклад, введення мутації H134R в послідовність ChR2 призвело до варіанту зі збільшеною амплітудою фототока (14), а додаткова мутація

амінокислоти Глю-123 на треонін призвела до швидшої кінетики відключення (56). Інші дослідники визначили та модифікували ті остатки, які беруть участь у фотоциклі ChR2 (56, 57, 58). Недавно було створено подвійну мутацію E123T/T159C, яка поєднує як великі фототоки, так і прискорений фотоцикл (59).

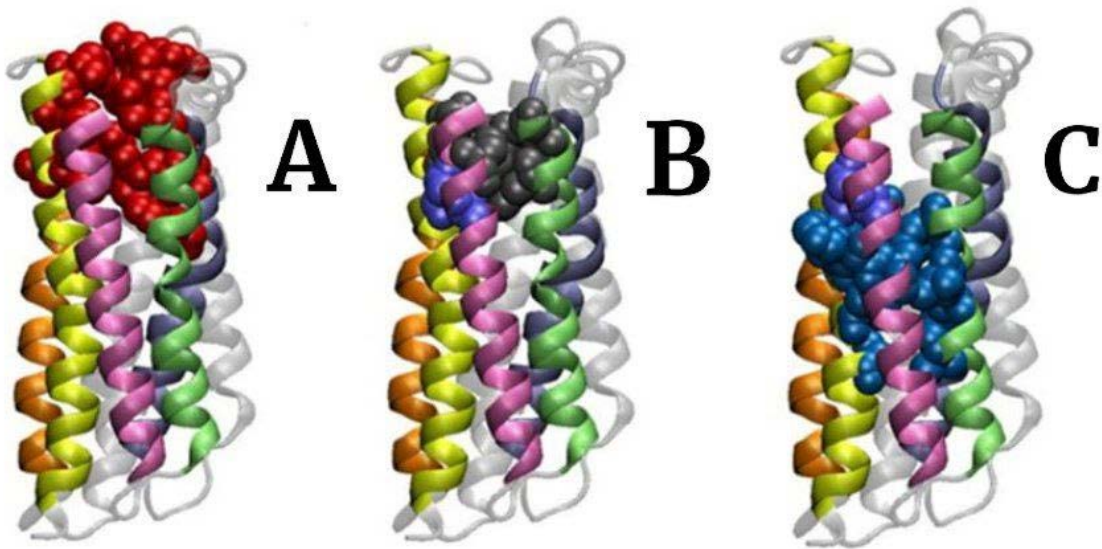
Раніше було показано, що введення сконструйованого гена опсину ChETA в первинні клітки гліоми людини або клітинні лінії призводить до неочікуваного зниження проліферації клітин та посилення мітохондріально-залежної апоптозу під впливом світлової стимуляції. За результатами існуючих статей оптогенетичні ефекти були посередковані деполяризацією мембран, зниженням експресії цикліну та мітохондріального трансмембранного потенціалу. Також, у контексті роботи, важливо зазначити, що перенесення гена ChETA та освітлення мишей значно пригнічували зростання підшкірної та внутрішньочерепної гліоми та підвищували виживання тварин-носіїв гліоми. Ці результати розкривають несподіваний ефект іонних каналів опсин на клітини гліоми та вперше дають можливість лікувати гліому з використанням оптогенетичного підходу, що контролюється світлом.

Оскільки це дуже нова тема, важко давати будь-які прогнози. За допомогою комп'ютерного моделювання ми можемо лише гіпотетично робити певні прогнози на основі наявної інформації та отримувати конкретні результати. За допомогою біоінформатичного моделювання структури ChR2 ми спробуємо передбачити припущений катіонний шлях всередині каналу, сформованого унікальною системою внутрішніх порожнин, характерних для цього мікробного родопсину.

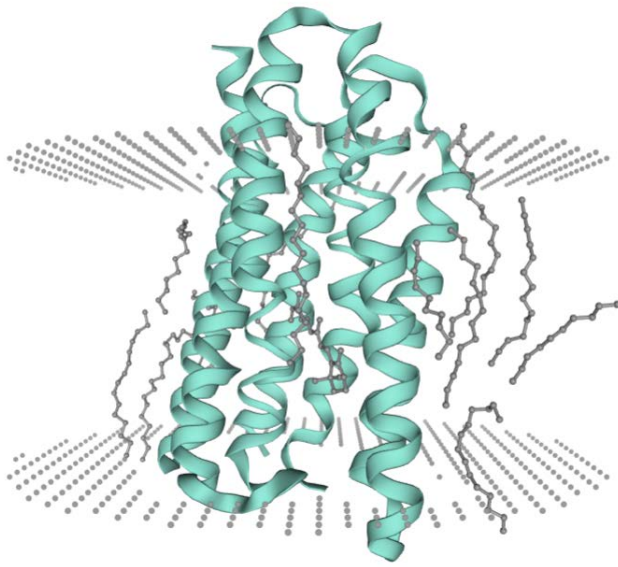
Для цього потрібно виконати наступні кроки.

У даному дослідженні було створено чотири моделі білка ChR2 за допомогою методів ниткового моделювання та гомологічного моделювання фрагмента H134R - ChR2 з *C. reinhardtii*. Моделі ChR2 1, 2 і 3 були отримані за допомогою сервера Phyre, а модель 4 була отримана за допомогою сервера Swiss-Model. У всіх моделях представлено лише центральну частину послідовності (амінокислотні залишки 52–273 у моделях 1, 2 і 3, і амунокислотні залишки 56–263 у моделі 4), що призводить до класичної структури родопсину з семи трансмембранними антипаралельними α -спіральками, з передбаченою зовнішньою амінотермінальною і внутрішньою карбокситермінальною частинами.

Моделювання ChR2 включає наступні кроки: завантаження послідовності ChR2 і отримання моделей. Моделі базуються на наступних шаблонах: 1m0kA (модель 1, $7,0 \times 10^{-26}$), 1xioA (модель 2, $6,2 \times 10^{-27}$), 1h2sA (модель 3, $1,3 \times 10^{-26}$) і 1h2sA (модель 4, $2,0 \times 10^{-44}$). Моделювання перших трьох моделей проводиться за допомогою сервера Phyre.



Фігура 16. Система внутрішніх камер у H134R - ChR2 згідно з молекулярним моделюванням. Показано просторово консервативні камери у біоінформатичній моделі ChR2. Камера А (крайня права), камера В (середня) і камера С (крайня ліва).



Фігура 17. Результат з'єднання моделей, кінцева модель ChR2 без додавання ретиналю. Виконано за допомогою програми Swiss-Model.

Потім ми додаємо ретиналь до кінцевих моделей за допомогою докування. У нас є три моделі ретиналю, які в кінцевому підсумку будемо з'єднувати з ChR2, а саме галородопсин (HR, 3a7k), архаеродопсин (AR, 2ei4) і бактеріородопсин (BR, 2zz1). Для цього ми використовуємо програму для візуалізації PyMOL, яка дозволяє додати ретиналь до активного місця моделей ChR2. Структуру ретиналю беремо з відкритої бази даних RCSB PDB і завантажуюємо зразок для з'єднання.

внутрішній С-кінець. Петлі, які їх з'єднують, є короткими, за винятком петлі $\alpha 2$ - $\alpha 3$, яка має подовжену форму.

З використанням біоінформатичного прогнозування структури та структурного накладання ChR2 на BR, AR і HR, було виявлено шлях іонів всередині каналу. У ChR2 цей шлях складається з трьох послідовних камер, утворених амінокислотними залишками спіралей 1-4. Камера А присутня також у HR, AR і BR, тоді як камери В і С є специфічними для ChR2. Мутагенез амінокислот у камерах В і С підтвердив їх роль у формуванні пор і проведенні іонів. Зміни від'ємного заряду в камері С впливають на співвідношення струму $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$. Крім того, було виявлено нові детермінанти вибіркової і проникності іонів у ChR2. Залишки глутамату в спіралі В необхідні для проведення іонів та спрямовані до зовнішньої частини каналу. Механізм функціонування ChR2 схожий на інші мікробні родопсини, і він пропонується працювати як протонний насос з "витоком" протонів. Додаткові експерименти необхідні для підтвердження цих результатів та розуміння ролі амінокислотних залишків у провідності і вибіркової проникності іонів у ChR2.

Також були виявлені внутрішні порожними в зовнішній частині ChR2, які можуть відігравати роль у проведенні іонів. Три консервативні порожнини, позначені як А, В і С, були знайдені в моделях ChR2. Порожнини В і С були унікальними особливостями ChR2 і не повністю співпадали з порожнинами HR, BR і AR. Внутрішня поверхня порожнин В і С складалася з полярних/заряджених та гідрофобних залишків. Накладання чотирьох моделей ChR2 на HR, BR і AR дозволило виявити структуру, відповідну кишені для зв'язування ретиналю, раніше виявлену в інших родопсинах. У наших моделях лізин-257 знаходиться в правильному положенні для ковалентного зв'язування з ретиналем і утворення Шифової основи, що відповідає наявним доказам. Ароматичні залишки, які оточують ретиналь - Trp-124, Phe-178, Tyr-184, Trp-

223, Phe-226 і Phe-23, проявляють високий ступінь гомології з відповідними залишками в HR (60). Донори і акцептори протонів для Шифової основи ретиналю, за даними досліджень, є Arg-134, Glu-123 та Asp-253 відповідно (57). Згідно з нашою моделлю, Arg-134 і Glu-123 розташовані по різні боки від Шифової основи. Перший розташований в бік внутрішньоклітинної частини, приблизно на відстані 11.6 Å від Шифової основи, тоді як другий розташований в бік зовнішньої сторони білка, на відстані близько 4.1 Å від Шифової основи. Інші залишки, які вважаються включеними до фотоциклу ChR2 - Cys-128 і Asp-156 (16, 30–32); в нашій моделі вони спрямовані в бік кишені для ретиналю, їхні атоми сірки і кисню знаходяться на відстані 2.6 Å, що сприяє утворенню водневого зв'язку.

Ці результати надають більш детальне розуміння структури і функції ChR2, а також допомагають краще розуміти механізми його дії. Це може сприяти розвитку оптичних методик в нейронауці та біомедичному дослідженні, таких як оптична стимуляція нейронів і контроль нейрональної активності за допомогою світла.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено, що білок C1QTNF8, який ідентифікується переважно в мембранах клітин головного мозку, де може виконувати роль активатора ракових стовбурових клітин. Високі рівні експресії C1QTNF8 спостерігаються в агресивних та менш диференційованих пухлинах, що може свідчити про несприятливі клінічні характеристики.
2. Показано, що ген C1qTNF8 може взаємодіяти з іншими білками, такими як E2F1, AF4, MYC, SFPI1, VDR, TEAD4, JARID1A та ELF3, що свідчить про його можливу роль у різних типах раку, включаючи гліому мозку, лейкемію, рак грудей, рак крові та рак підшлункової залози. Ці взаємодії можуть впливати на різні ракові процеси, такі як регуляція росту, поділ клітин, апоптоз та імунна відповідь.
3. Проведено дослідження структури та функції світлочутливого каналу родопсин-2 (ChR2) за допомогою біоінформатичного прогнозування та структурного накладання. Отримані результати підтверджують роль окремих визначених амінокислотних залишків у проведенні іонного струму крізь канал ChR2 та розкривають молекулярні особливості його функціонування.
4. Показано, що мінімально інвазивна оптогенетична стратегія, яка передбачає введення генної конструкції, яка специфічно експресує світлочутливий канал у мітохондрії клітин GSC, за контрольової фотоактивації спричиняє мітохондріальну дисфункцію та сповільнення проліферації клітин GSC.
5. За моєї участі у лабораторії Медичного коледжу Макса Реді створено генетичну конструкцію, яка специфічно експресує світлочутливий канал в мембранах мітохондрій клітин GSC, та на моделі мишей з гліомою отримані успішні результати такого підходу. Тож можна передбачити, що

контрольована фотоактивація може спричинити мітохондріальну дисфункцію у клітинах GSC незалежно від підтипу GBM або статусу пацієнта.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response Sabine Hombach-Klonischa,¹, Maryam Mehrpourb,^{c,1}, Shahla Shojaeia,^d, Craig Harlose,^f, Marshall Pitze,^f, Ahmed Hamaib,^c, Krzysztof Siemianowiczg, Wirginia Likush, Emilia Wiecheci, Brian D. Toyotaj, Reyhane Hoshyark,^l, Amir Seyfoorim, Zahra Sepehria,ⁿ, Sudharsana R. Andeo, Forough Khademp, Mohsen Akbarim, Adrienne M. Gormanq,^r, Afshin Samaliq,^r, Thomas Klonischa,^{f,□,2}, Saeid Ghavamia,^{s,2}
2. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos Briana C. Prager,^{1,2,3,4,8} Shruti Bhargava,^{1,2,8} Vaidehi Mahadev,⁵ Christopher G. Hubert,⁶ and Jeremy N. Rich^{1,2,7,*}
3. Omuro, A. (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. JAMA 310, 1842
4. Wang, J. et al. (2016) Clonal evolution of glioblastoma under therapy. Nat. Genet. 48, 768–776
5. Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells Javad Alizadeh^{1,2}, Amir A. Zeki³, Nima Mirzaei¹, Sandipan Tewary¹, Adel Rezaei Moghadam^{1,2}, Aleksandra Glogowska¹, Pandian Nagakannan⁴, Eftekhar Eftekharpour⁴, Emilia Wiechec⁵, Joseph W. Gordon^{1,6}, Fred. Y. Xu⁷, Jared T. Field⁸, Ken Y. Yoneda³, Nicholas J. Kenyon³, Mohammad Hashemi⁹, Grant M. Hatch⁷, Sabine Hombach-Klonisch¹, Thomas Klonisch¹ & Saeid Ghavami^{1,2,10}
6. Lathia, J.D. et al. (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. Genes Dev. 29, 1203–1217
7. Wang, Q. et al. (2017) Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. Cancer Cell 32, 42–56

8. Dirkse, A. et al. (2019) Stem cell-associated heterogeneity in glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat. Commun.* 10, 1787
9. Creixell, P. et al. (2012) Navigating cancer network attractors for tumor-specific therapy. *Nat. Biotechnol.* 30, 842–848
10. Sottoriva, A. et al. (2013) Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4009–4014
11. C1q-tumor necrosis factor-related protein 8 (CTRP8) is a novel interaction partner of relaxin receptor RXFP1 in human brain cancer cells. Aleksandra Glogowska¹, Usakorn Kunanuvat¹, Joerg Stetefeld²⁻⁴, Trushar R. Patel², Thatchawan Thanasupawat¹, Jerry Krcek^{1,5}, Ekkehard Weber⁶, G. William Wong⁷, Marc R. Del Bigio^{1,8}, Cuong Hoang-Vu⁹, Sabine Hombach-Klonisch^{1,10*}, Thomas Klonisch^{1,5,11,12*}
12. [R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *New Engl. J. Med* 352 (10) (2005) 987–996.
13. [6] Q.T. Ostrom, N. Patil, G. Cioffi, K. Waite, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017, *Neurooncology* 22 (12 Suppl 2) (2020) iv1–iv96.
14. F. Ringel, H. Pape, M. Sabel, D. Krex, H.C. Bock, M. Misch, A. Weyerbrock, T. Westermaier, C. Senft, P. Schucht, B. Meyer, M. Simon, SN1 Study Group, Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter

- study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection, *Neurooncology* 18 (1) (2016) 96–104.
15. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. Wei Wu a,1, Jessica L. Klockow b,1, Michael Zhang a,c, Famyrah Lafortune a, Edwin Chang a, Linchun Jin d, Yang Wu e, Heike E. Daldrop-Link a,*
 16. M. Lara-Velazquez, R. Al-Kharboosh, S. Jeanneret, C. Vazquez-Ramos, D. Mahato, D. Tavanaiepour, G. Rahmathulla, A. Quinones-Hinojosa, Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults, *Brain Sci.* 7 (2017) 12.
 17. D. Garnier, O. Renoult, M.C. Alves-Guerra, F. Paris, C. Pecqueur, Glioblastoma stem-like cells, metabolic strategy to kill a challenging target, *Front. Oncol.* 9 (2019) 118.
 18. B.C. Prager, S. Bhargava, V. Mahadev, C.G. Hubert, J.N. Rich, Glioblastoma stem cells: driving resilience through chaos, *Trends Cancer* 6 (3) (2020) 223–235.
 19. Y.C.S. Ramon, M. Sese, C. Capdevila, T. Aasen, L. De Mattos-Arruda, S.J. Diaz-Cano, J. Hernandez-Losa, J. Castellvi, Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities, *J. Mol. Med.* 98 (2) (2020) 161–177.
 20. J. Behnan, G. Finocchiaro, G. Hanna, The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours, *Brain* 142 (4) (2019) 847–866
 21. Q. Wang, B. Hu, X. Hu, H. Kim, M. Squatrito, L. Scarpace, A.C. deCarvalho, S. Lyu, P. Li, Y. Li, F. Barthel, H.J. Cho, Y.H. Lin, N. Satani, E. Martinez-Ledesma, S. Zheng, E. Chang, C.E. Gabriel Sauve, A. Olar, Z.D. Lan, G. Finocchiaro, J. J. Phillips, M.S. Berger, K.R. Gabrusiewicz, G. Wang, E. Eskilsson, J. Hu, T. Mikkelsen, R.A. DePinho, F. Muller, A.B. Heimberger, E.P. Sulman, D.H. Nam, R.G.W. Verhaak, Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment, *Cancer Cell* 33 (1) (2018) 152.

- 22.M.A. Qazi, P. Vora, C. Venugopal, S.S. Sidhu, J. Moffat, C. Swanton, S.K. Singh, Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma, *Ann. Oncol.* 28 (7) (2017) 1448–1456
- 23.R. Daneman, A. Prat, The blood-brain barrier, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (1) (2015), a020412.
- 24.C. Greene, M. Campbell, Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules, *Tissue Barriers* 4 (1) (2016), e1138017.
- 25.Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. Okezie O Kanu¹, Betsy Hughes, Chunhui Di, Ningjing Lin, Jinrong Fu, Darell D Bigner, Hai Yan, Cory Adamson
- 26.The long non-coding RNA HOTAIRM1 promotes tumor aggressiveness and radiotherapy resistance in glioblastoma. Glaucia Noeli Maroso Hajj¹, Paula Borzino Cordeiro Nunes², Martin Roffe³
- 27.Polysome Profiling of a Human Glioblastoma Reveals Intratumoral Heterogeneity. Fernanda Cristina Sulla Lupinacci¹, Hellen Kuasne², Martin Roffé³, Julia Avian Vassalakis⁴, Fernanda Ferreira da Silva⁵, Tiago Góss Santos⁶, Victor Piana Andrade⁷, Paulo Sanematsu⁸, Vilma Regina Martins⁹, Silvia Regina Rogatto¹⁰, Glaucia Noeli Maroso Hajj¹¹
- 28.Oncogenomics. Virendra S Gomase¹, Somnath Tagore, Karbhari V Kale, Dayanand A Bhiwgade
- 29.The Cancer Genome Atlas (TCGA)
- 30.Gene Expression Omnibus (GEO)
31. R/Bioconductor
- 32.The Human Protein Atlas project is funded by the Knut & Alice Wallenberg Foundation.
- 33.TransMembrane Hidden Markov Model
34. National Center for Biotechnology Information Gene

35. C1q-tumor necrosis factor-related protein 8 (CTRP8) is a novel interaction partner of relaxin receptor RXFP1 in human brain cancer cells Aleksandra Glogowska¹, Usakorn Kunanuvat¹, Joerg Stetefeld²⁻⁴, Trushar R. Patel², Thatchawan Thanasupawat¹, Jerry Krcek^{1,5}, Ekkehard Weber⁶, G. William Wong⁷, Marc R. Del Bigio^{1,8}, Cuong Hoang-Vu⁹, Sabine Hombach-Klonisch^{1,10*}, Thomas Klonisch^{1,5,11,12}
36. Enrichr
37. Schaffler A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 194-204.
38. Akiyama H, Furukawa S, Wakisaka S, *et al.* Elevated expression of CTRP3/cartducin contributes to promotion of osteosarcoma cell proliferation. *Oncol Rep* 2009; 21: 1477-
39. Li Q, Wang L, Tan W, *et al.* Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF-kappaB pathways and promotes cell survival in human cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 308: 203-214.
40. Takeuchi T, Adachi Y, Nagayama T. Expression of a secretory protein C1qTNF6, a C1qTNF family member, in hepatocellular carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2011; 34:113-121.
41. Zheng Q, Yuan Y, Yi W, *et al.* C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2616-2623.
42. Wong GW, Krawczyk SA, Kitidis-Mitrokostas C, *et al.* Identification and characterization of CTRP9, a novel secreted glycoprotein, from adipose tissue that reduces serum glucose in mice and forms heterotrimers with adiponectin. *FASEB J* 2009; 23: 241-258.

43. Peterson JM, Wei Z, Wong GW. CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that heterooligomerize with C1q/TNF family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388:
44. Shemesh R, Toporik A, Levine Z, *et al.* Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2008; 283: 34643-34649.
45. Shemesh R, Hermesh C, Toporik A, *et al.* Activation of relaxin-related receptors by short, linear peptides derived from a collagen-containing precursor. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1160: 78-86.
46. Wei Z, Peterson JM, Wong GW. Metabolic regulation by C1q/TNF-related protein-13 (CTRP13): activation OF AMP-activated protein kinase and suppression of fatty acid-induced JNK signaling. *J Biol Chem* 2011; 286: 15652-15665.
47. Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A. M., Bamberg E., Hegemann P. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395–2398
48. Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13940–13945
49. Boyden E. S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–1268
50. Li X., Gutierrez D. V., Hanson M. G., Han J., Mark M. D., Chiel H., Hegemann P., Landmesser L. T., Herlitze S. (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17816–17821

51. Bruegmann T., Malan D., Hesse M., Beiert T., Fuegemann C. J., Fleischmann B. K., Sasse P. (2010) Optogenetic control of heart muscle *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Methods* 7, 897–900
52. Hofmann B., Maybeck V., Eick S., Meffert S., Ingebrandt S., Wood P., Bamberg E., Offenhäusser A. (2010) Light-induced stimulation and delay of cardiac activity. *Lab Chip* 10, 2588–2596
53. Hegemann P., Möglich A. (2011) Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. *Nat. Methods* 8, 39–42
54. Deisseroth K. (2011) Optogenetics. *Nat. Methods* 8, 26–29
55. Nagel G., Brauner M., Liewald J. F., Adeishvili N., Bamberg E., Gottschalk A. (2005) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr. Biol.* 15, 2279–2284
56. Gunaydin L. A., Yizhar O., Berndt A., Sohal V. S., Deisseroth K., Hegemann P. (2010) Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci.* 13, 387–392
57. Berndt A., Yizhar O., Gunaydin L. A., Hegemann P., Deisseroth K. (2009) Bistable neural state switches. *Nat. Neurosci.* 12, 229–234
58. Stehfest K., Ritter E., Berndt A., Bartl F., Hegemann P. (2010) The branched photocycle of the slow-cycling channelrhodopsin-2 mutant C128T. *J. Mol. Biol.* 398, 690–702
59. Berndt A., Schoenenberger P., Mattis J., Tye K. M., Deisseroth K., Hegemann P., Oertner T. G. (2011) High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7595–7600
60. Kouyama T., Kanada S., Takeguchi Y., Narusawa A., Murakami M., Ihara K. (2010) Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *J. Mol. Biol.* 396, 564–579