

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

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики

к.б.н, доц. О.Ю. Нипорко

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р

**ВПЛИВ ОДНОСТІННИХ КАРБОНОВИХ НАНОТРУБОК НА
ЕКСПРЕСІЮ МІКРОРНК І ГЕНІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З
ПРОЛІФЕРАЦІЄЮ ТА АПОПТОЗОМ**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студентки спеціальності

091 Біологія

ОП «Біоінформатика і структурна біологія»

Слюсар Мирослави Юрїївни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної біотехнології

та біоінформатики

к.б.н., доц. О.Ю. Нипорко

Робота виконана у відділі молекулярної біології

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Під керівництвом чл.-кор. НАН України, проф., д.б.н

О.Г. Мінченко

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Слюсар М.Ю. Вплив одностінних карбонових нанотрубок на експресію мікроРНК і генів, асоційованих з проліферацією та апоптозом. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

Метою дослідження було дослідити вплив одностінних карбонових нанотрубок на експресію генів *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *CLU*, *ZNF395*, *KRT18*, *GJA1*, *HILPDA* і *MEST*, а також виявити сайти зв'язування мікроРНК на 3'-нетранслюємих ділянках цих мРНК та визначити рівень експресії таких мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS за допомогою методів біоінформатики та молекулярної біології.

Тема роботи є надзвичайно актуальною, оскільки одностінні карбонові нанотрубки широко використовуються у біомедицині для цільової доставки лікарських засобів та терапії на основі гіпертермії, біологічного детектування, візуалізації, тощо. Однак, сучасне уявлення про токсичність цих сполук є недостатнім та суперечливим, тому є необхідність більш детального дослідження генотоксичності нанотрубок шляхом оцінки їх впливу на експресію мікроРНК та генів, що контролюють процеси проліферації і апоптозу клітин, а також задіяні в стресі ендоплазматичного ретикулума та канцерогенезі.

Проведеними дослідженнями встановлено, що за умов дії низьких доз одностінних карбонових нанотрубок на нормальні астроцити спостерігаються дозозалежні зміни рівня експресії мРНК *DNAJB9* (протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язується з IGF), *IGFBP6* (протеїн 6, що зв'язується з IGF), *CLU* (кластерин), *ZNF395* (протеїн цинкового пальця 395), *KRT18* (кератин 18), *GJA1* (білок щілинних контактів A1), *HILPDA* (протеїн 2, що індукується за гіпоксії) і *MEST* (специфічний транскрипт мезодерми), а також мікроРНК, які специфічно зв'язуються з деякими із цих мРНК.

Таким чином, у нормальних астроцитах людини за дії на них низьких доз одностінних карбонових нанотрубок порушується функціональна цілісність геному як на транскрипційному, так і пост-транскрипційному рівнях, що вказує на генотоксичні та нейротоксичні ефекти цих наночасток.

Результати досліджень були опубліковані у науковому журналі “Current Research in Toxicology”.

Ключові слова: сайти зв’язування мікроРНК з мРНК, експресія мРНК та мікроРНК, ОСКНТ, їх генотоксичність, нормальні астроцити людини.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Карбонові нанотрубки	10
1.1.1. Одностінні карбонові нанотрубки	10
1.1.2. Функціоналізація одностінних карбонових нанотрубок	10
1.1.3. Застосування одностінних карбонових нанотрубок	12
1.1.4. Токсичність одностінних карбонових нанотрубок	16
1.2. Протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ	19
1.3. Протеїн 3, що зв'язується з IGF (IGFBP3)	20
1.4. Протеїн 6, що зв'язується з IGF (IGFBP6)	21
1.5. Кластерин (CLU)	22
1.6. Протеїн цинкового пальця	39
1.7. Білок щілинних контактів A1 (GJA1)	24
1.8. Протеїн 2, що індукується за гіпоксії (HILPDA)	24
1.9. Специфічний транскрипт мезодерми (MEST)	25
1.10. Кератин 18 (KRT18)	26
1.11. МікроРНК, її роль в контролі експресії генів	27
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
2.1. Біоінформатичний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК на наявність сайтів зв'язування мікроРНК	29
2.2. Експериментальний матеріал	29
2.3. Культура клітин та умови культивування	29
2.4. Виділення РНК і синтез кДНК	29
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному	30
2.6. Статистичний	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	33
3.1. Вплив ОСКНТ на експресію генів <i>CLU</i> , <i>DNAJB9</i> та <i>IGFBP3</i> у нормальних астроцитах людини	33

3.2.	Вплив ОСКНТ на експресію генів <i>KRT18</i> , <i>ZNF395</i> та <i>GJA1</i> у нормальних астроцитах людини_____	35
3.3.	Вплив ОСКНТ на експресію генів <i>MEST</i> , <i>HILPDA</i> та <i>IGFBP6</i> у нормальних астроцитах людини_____	37
3.4.	Ідентифікація сайтів зв'язування мікроРНК на 3'-нетранслюємих ділянках мРНК_____	38
3.5.	Вплив ОСКНТ на експресію мікроРНК у нормальних астроцитах людини_____	40
	ВИСНОВКИ_____	44
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ_____	45

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

OSKHT	- одностінні карбонові нанотрубки
DNAJB9	- сімейство білків теплового шоку DnaJ (Hsp40), член B9
CLU	- кластерин
IGFBP3	- білок 3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту
IGFBP6	- білок 6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту
ZNF395	- білок типу цинковий палець 395
GJA1	- білок щілинних контактів альфа-1
MEST	- мезодерма-специфічний транскрипт
KRT18	- кератин 18
HILPDA	- регулятор стабільності жирових крапель
KHT	- карбонові нанотрубки
БШКНТ	- багат шарові карбонові нанотрубки
HLA-DR	-основний комплекс гістосумісності, клас II, DR Бета 1
ГЕБ	- гематоенцефалічний бар'єр
HSP70	- білок теплового шоку 70
ЕР	- ендоплазматичний ретикулум
ERAD	- ЕР-асоційована деградація
UPR	- розгорнута білкова реакція
IRE1	- інозитол-залежний протеїн 1 α
ВіР	- білок, що зв'язується з важким ланцюгом імуноглобулінів
АТФ	- аденозинтрифосфат
АДФ	- аденозиндифосфат
IGF	- інсуліноподібний фактор росту
HIF-1 α	- фактор транскрипції, що індукується за гіпоксії 1 α
СК	- цитокератин
DGCR8	- критична область при синдромі ДіДжорджа 8
Ran	- ядерний білок, пов'язаний з Ras
GTP	- гуанозинтрифосфат
RISC	- РНК-індукований комплекс сайленсингу

ВСТУП

Одностінні карбонові нанотрубки (ОСКНТ) є вуглецевими наноструктурами, що мають унікальні хімічні, фізичні та механічні властивості [1]. Велика площа поверхні, стабільність, здатність до кон'югації з біологічними молекулами, тривалий час циркуляції та внутрішня флуоресценція забезпечують успішне використання нанотрубок у біомедицині. ОСКНТ показали свою ефективність у цільовій доставці лікарських засобів та генів, терапії на основі гіпертермії, біологічному детектуванні, візуалізації, тощо [2].

Однак, незважаючи на успішне застосування одностінних карбонових нанотрубок у біомедицині, безпечність цих наноструктур викликає занепокоєння у наукової спільноти. Велика кількість досліджень вказує на хронічну токсичність ОСКНТ [3]. Добре відомо, що нанотрубки можуть призводити до змін експресії генів, що кодують білки та мікроРНК, відповідальні за регуляцію різноманітних клітинних процесів [4, 5]. Проте сучасне уявлення про токсичність цих сполук є недостатнім та суперечливим. Тому існує необхідність подальшого дослідження генотоксичності ОСКНТ шляхом оцінки впливу цих сполук на експресію генів, що регулюють проліферацію клітин, апоптоз, стрес ендоплазматичного ретикулума, а також канцерогенез.

Одним з таких генів є *DNAJB9* (протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ), що кодує шаперон, відповідальний за стрес ендоплазматичного ретикулума [6]. Ще одним шапероном, що забезпечує підтримку протеостазу є *CLU* (кластерин) [7]. Також важливими протеїнами, що регулюють проліферацію, ріст, диференціацію та міграцію клітин є транспортні білки інсуліноподібного фактору росту IGFBR3 та IGFBR6 [8, 9]. Було показано, що ці протеїни задіяні у розвитку пухлин [9, 10]. Диференціація та проліферація також регулюється транскрипційним фактором *ZNF395* (протеїн цинкового пальця 395) [11]. Ще одним геном, що представляє інтерес для вивчення

генотоксичності ОСКНТ, є *GJA1* (білок щілинних контактів A1). Його продукт формує щілинні контакти та відіграє важливу роль у регуляції росту клітин, апоптозу, стабільності мікротрубочок, диференціації, проліферації, тощо [12, 13]. *MEST* (специфічний транскрипт мезодерми) відповідальний за ріст та розвиток центральної нервової системи [14]. Показано, що гени *KRT18* (кератин 18) та *HILPDA* (протеїн 2, що індукується за гіпоксії) пов'язані із розвитком пухлинних клітин [15, 16]. *KRT18* кодує основні структурні компоненти мережі проміжних філаментів, є необхідним для передачі сигналів клітинами та регуляції апоптозу [17-20]. *HILPDA* кодує білок, пов'язаний з гіпоксією та накопиченням ліпідів [21, 22].

Таким чином, метою роботи було дослідити вплив низьких доз одностінних карбонових нанотрубок на експресію генів *DNAJB9* (протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ), *IGFBP3* (протеїн 3, що зв'язується з IGF), *IGFBP6* (протеїн 6, що зв'язується з IGF), *CLU* (кластерин), *ZNF395* (протеїн цинкового пальця 395), *KRT18* (кератин 18), *GJA1* (білок щілинних контактів A1), *HILPDA* (протеїн 2, що індукується за гіпоксії) і *MEST* (специфічний транскрипт мезодерми), а також виявити сайти зв'язування мікроРНК на 3'-нетранслюємих ділянках цих мРНК та визначити рівень експресії таких мікроРНК у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS.

Відповідно до мети були поставлені наступні задачі:

1. Визначити рівень експресії генів *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *CLU*, *ZNF395*, *KRT18*, *GJA1*, *HILPDA* і *MEST* у нормальних астроцитах людини (клітинна лінія NHA/TS), що культивувались з ОСКНТ (2 нг/мл середовища) протягом 24 годин.
2. Визначити рівень експресії генів *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *CLU*, *ZNF395*, *KRT18*, *GJA1*, *HILPDA* і *MEST* у нормальних астроцитах людини (клітинна лінія NHA/TS), що культивувались з ОСКНТ (8 нг/мл середовища) протягом 24 годин.

3. Провести біоінформатичний аналіз сайтів зв'язування мікроРНК з 3'- нетранслюємими ділянками мРНК DNAJB9, IGFBP3, IGFBP6, CLU, ZNF395, KRT18, GJA1, HILPDA і MEST.
4. Визначити рівень експресії мікроРНК miR-144, miR-145, miR-150, miR-10a, miR-19a, miR-7, miR-27a у нормальних астроцитах людини (клітинна лінія NHA/TS), що культивувались з ОСКНТ (8 нг/мл середовища) протягом 24 годин.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Карбонові нанотрубки

1.1.1. Одностінні карбонові нанотрубки

Карбонові нанотрубки (КНТ) – це наноструктури, що складаються з атомів вуглецю, розташованих у серії конденсованих бензольних кілець, згорнутих у трубчасту структуру. Ці сполуки належать до сімейства фулеренів, що, як і графіт та алмаз, є алотропними модифікаціями вуглецю. За кількістю шарів КНТ поділяються на два типи: одностінні карбонові нанотрубки (ОСКНТ) і багат шарові карбонові нанотрубки (БШКНТ) [23]. ОСКНТ представляють собою графеновий циліндр діаметром від 0,4 до 2 нм і зазвичай зустрічаються у вигляді гексагональних щільно упакованих пучків [1].

1.1.2. Функціоналізація одностінних карбонових нанотрубок

Існує кілька унікальних властивостей ОСКНТ, що роблять їх перспективними сполуками для біомедичного застосування. Ці структури мають підвищену проникність та легко інтерналізуються клітинами. Велика площа sp^2 -гібридизованої поверхні ОСКНТ (теоретично $1300 \text{ м}^2/\text{г}$) дозволяє ефективно завантаження нанотрубок потрібними сполуками, зокрема лікарськими засобами [24].

Поверхні ОСКНТ можуть бути модифіковані шляхом функціоналізації, що є процесом хімічного синтезу, де потрібні функціональні групи приєднуються на стінок КНТ. Функціоналізація може бути двох типів - ковалентна та нековалентна. Ковалентну модифікацію КНТ зазвичай отримують шляхом окислення сильними кислотами. Під час процесу на кінцях та бічних стінках нанотрубок утворюються карбоксильні ($-\text{COOH}$) групи, а потім відбувається подальше ковалентне сполучення з іншими

молекулами [25, 26]. Нековалентна функціоналізація КНТ заключається у нековалентній адсорбції молекул на поверхні КНТ. Використовуючи цей підхід, поверхнево-активні речовини, полімери та біомолекули, такі як ДНК, siRNA, білки, можуть бути успішно приєднані до поверхні КНТ [26, 27].

Після функціоналізації гідрофобні нанотрубки стають гідрофільними та зв'язаними з лікарськими засобами або біомолекулами (ДНК, білками, ферментами, біосенсорами, тощо) [28, 29]. Такі модифікації можуть бути використані для специфічного впізнавання цільових клітин. Окрім цього, модифікація зовнішньої поверхні необхідна для забезпечення покращеної біосумісності та біодеградації [30]. Функціоналізація також використовується для оптимізації доставки ліків, а саме посилення здатності до інкапсуляції, зниження токсичності, зміни часу циркуляції у крові та селективності [25, 31-33]. Всі ці властивості роблять ОСКНТ ідеальними структурами для цільової доставки препаратів для лікування раку та інших захворювань.

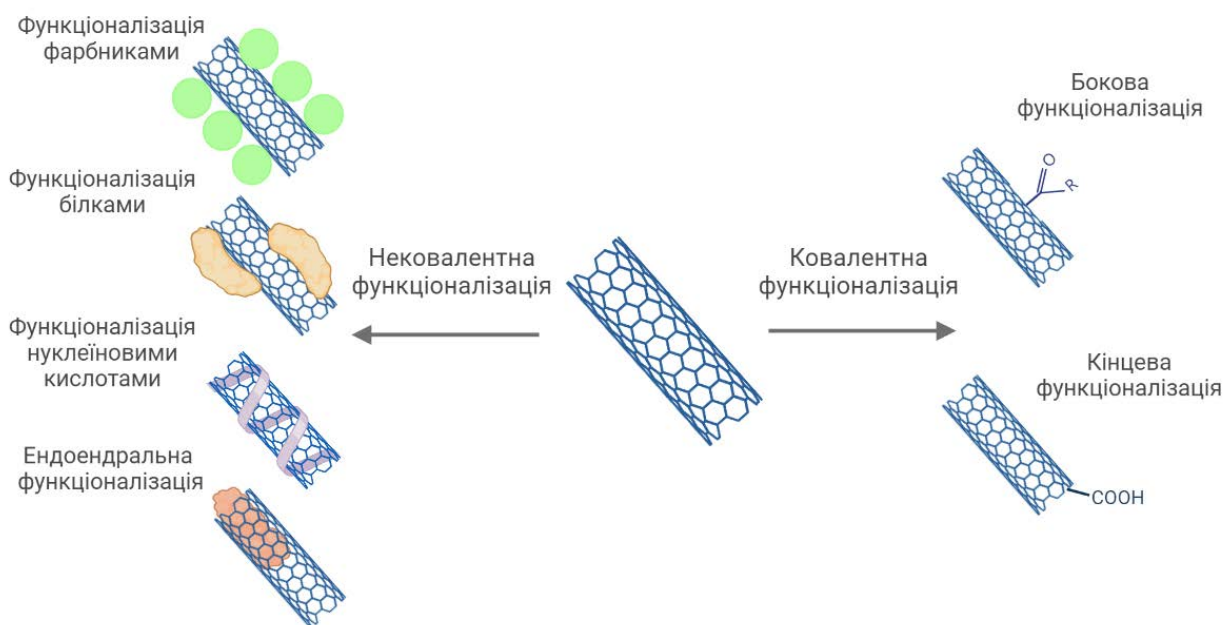


Рис.1.1. Схематичне зображення ковалентної та нековалентної функціоналізації КНТ.

1.1.3. Застосування одностінних карбонових нанотрубок

Одностінні карбонові нанотрубки широко використовуються у різноманітних напрямках біомедицини, таких як діагностика, аналіз, доставка ліків та генів до клітин (рис. 1.1.) [29].



Рис. 1.1. Напрямки біомедичного застосування одностінних карбонових нанотрубок.

Чисельні публікації продемонстрували, що карбонові нанотрубки з приєднаними молекулами лікарського засобу можуть легко проникати в клітини та потрапляти в ядро [34-37]. Спочатку необхідні речовини фіксуються на поверхні або всередині функціоналізованих ОСКНТ. Отримана структура потім вводиться в організм класичними способами (оральний, ін'єкційний) або безпосередньо в цільове місце у вигляді магнітного кон'югату, де направляється зовнішнім магнітом до цільового органу. Клітина поглинає капсулу КНТ з лікарським засобом, і нанотрубка

вивільняє свій вміст всередину (рис. 1.2.). Таким способом можна досягти як клітинного, так і ядерного рівнів цільової доставки [37].

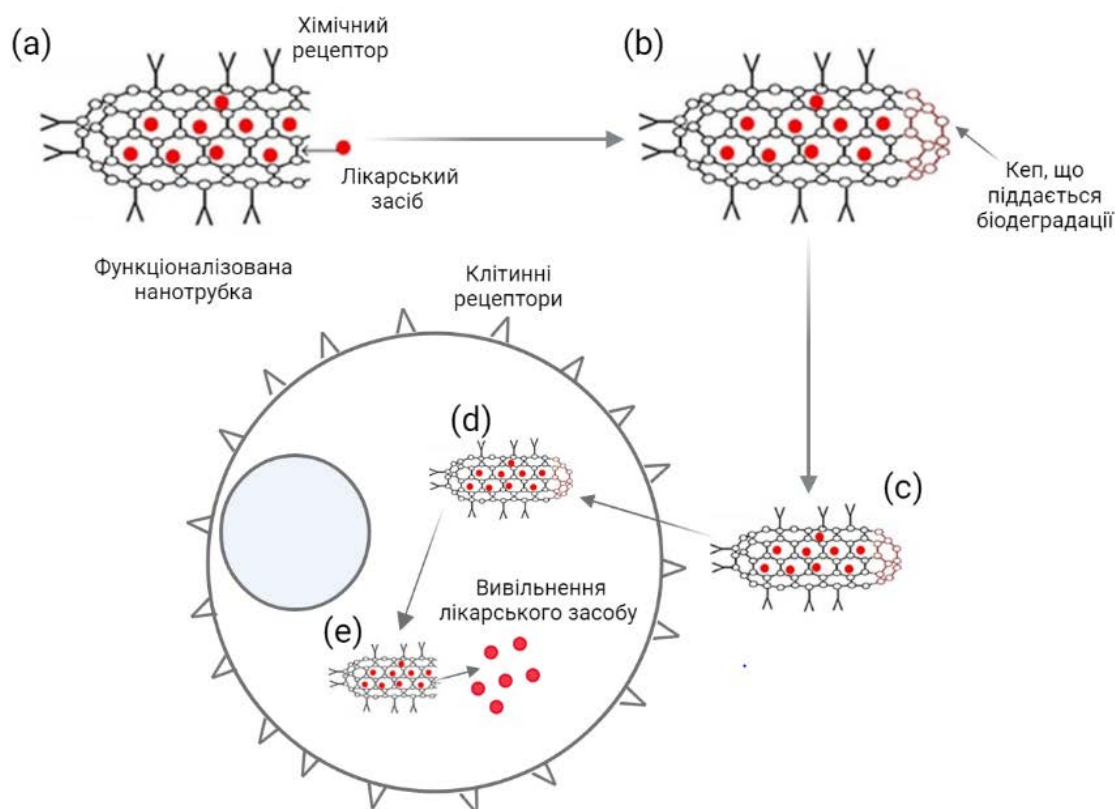


Рис. 1.2. Схематична ілюстрація процесу доставки ліків. (a) поверхня одностінної карбонової нанотрубки пов'язується з хімічним рецептором і лікарським засобом; (b) готова функціоналізована ОСКНТ закривається додаванням кепа на кінці; (c) нанотрубка, як носій лікарського засобу, вводиться в організм і досягає клітин-мішеней завдяки хімічному рецептору на поверхні; (d) клітина інтерналізує ОСКНТ за допомогою клітинних рецепторів шляхом ендоцитозу; (e) кеп видаляється всередині клітини, ліки вивільняються.

Функціоналізовані нанотрубки широко використовуються для лікування чисельних захворювань, включаючи різні види раку. Так, дослідження останніх років підтверджують ефективність застосування КНТ для лікування

хоріокарциноми, лімфоми Беркітта, карциноми шийки матки, раку молочної залози, тощо [34]. Один із прикладів є комплекс ОСКНТ-siRNA, що показав успішне тривале пригнічення росту пухлини порівняно зі старими методами доставки siRNA [38]. Окрім цього, контрольована доставка ліків може бути забезпечена наявністю хітозану на поверхні нанотрубки завдяки безпечній та нетоксичній природі цього полісахариду. Коли хітозан знаходиться на поверхні КНТ, клітини прикріплюються до бічних стінок нанотрубок, що призводить до бажаного цілеспрямованого вивільнення та покращеного поглинання ліків клітиною [37]. Дослідження цільової доставки на тваринах показали, що комплекси КНТ-хітозан мають кращу здатність до націлювання ніж звичайні нанотрубки. Наприклад, цей підхід використовується для лікування раку легенів [39].

Однією з основних проблем терапевтичних підходів до онкологічних захворювань є складність доставки ліків до злоякісного новоутворення без впливу на сусідні здорові клітини [40]. У більш ніж 99% випадків хіміотерапія знищує ракові клітини разом із нормальними, що призводить до серйозних побічних ефектів. Однак, хіміотерапевтичні агенти, що постачаються разом із КНТ, допомагають досягти кращого поглинання злоякісними клітинами, не зачіпаючи колатеральних тканин [37]. Нанотрубки потенційно знижують дозу препарату, локалізуючи його розподіл лише на ділянці пухлини [37, 41].

Окрім цього, КНТ можуть покращити ефективність терапії з використанням антитіл для доставки лікарських препаратів, оскільки нанотрубки не змінюють специфічність антитіл при зв'язуванні. Було показано, що протипухлинні агенти можуть доставлятися з використанням одноστінних карбонових нанотрубок, ковалентно функціоналізованих моноклональними антитілами. Радіаційні іонні хелати та флуоресцентні сполуки використовувались для діагностичної візуалізації та ідентифікації місця розташування [42].

Одним з найбільш важливих характеристик нанотрубок є їх здатність проходити гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Лікування багатьох захворювань є обмеженим або неможливим через проблеми з проходженням речовин через ГЕБ [43]. Обмеженість терапевтичних підходів пов'язана також із наявністю ферментів, які погіршують проникнення, руйнуючи нейрофармацевтичні агенти, харчові поживні речовини та мінерали [37]. Тому звичайні системи доставки ліків з вивільненням речовини в загальний кровообіг не можуть ефективно доставляти ліки в мозок. Захворювання, лікування яких є ускладненим з цих причин, включають хворобу Альцгеймера, деменцію, вірусний і бактеріальний менінгіт [37]. Однак, було показано, що застосування карбонових нанотрубок є перспективним для доставки нейрофармацевтичних агентів у внутрішнє середовище клітин мікроглії мозку [44]. КНТ в поєднанні з факторами росту нервових клітин допомагають клітинам диференціюватися в нейрони і, таким чином, лікувати неврологічні розлади [45].

Окрім цього, одностінні карбонові нанотрубки використовуються у генній терапії для заміни пошкоджених або відсутніх генів. Основна проблема, пов'язана з доставкою генів, полягає в ускладненні проходження ДНК через клітинну мембрану [46]. Однак, унікальні властивості ОСКНТ дозволяють транспортувати потрібну ДНК у клітини [37].

Використання нанотрубок не обмежується доставкою фармацевтичних препаратів та нуклеїнових кислот до клітин, а включає також нові підходи в радіотерапії для лікування раку за рахунок збільшення швидкості поглинання кисню злоякісними клітинами. Таким чином, карбонові нанотрубки збільшують ефективність променевої терапії [47]. До того ж, КНТ відіграють важливу роль у діагностичних процедурах, сприяючи візуалізації органів і визначенню локалізації ліків у системах цільової доставки [48]. ОСКНТ може використовуватись як контрастна речовина для ідентифікації пухлин [37]. Також було показано, що інкапсулювання нанотрубок забезпечує

нановізуалізацію органів. Введення системи КНТ в організм дозволяє отримувати нанорозмірне зображення, тоді як такі методи, як ендоскопія та колоноскопія, не дають потрібного результату [49].

Також, як ефективна стратегія лікування раку, була запропонована терапія на основі гіпертермії з використанням КНТ. Відомо, що одностінні карбонові нанотрубки проявляють сильне поглинання в інфрачервоній області (700–1100 нм). Оскільки вони виділяють значну кількість тепла при збудженні світлом, фототермічний ефект може викликати локальну термічну абляцію пухлинних клітин шляхом надмірного нагрівання [50].

1.4. Токсичність одностінних карбонових нанотрубок

Незважаючи на широке застосування карбонових нанотрубок у медицині, їх можлива токсичність викликає занепокоєння. Дані літератури вказують на те, що побічні реакції КНТ залежать від різних факторів, таких як концентрація, тривалість впливу, і навіть поверхнево-активна речовина, що використовується для диспергування нанотрубок [51].

Хоча здатність одностінних карбонових нанотрубок долати гематоенцефалічний бар'єр забезпечує їх унікальність, ця особливість ОСКНТ призводить до їх накопичення у клітинах. Так, попередні дослідження підтвердили токсичність КНТ для різних клітинних ліній [52, 53]. До того ж, нанотрубки можуть накопичуватися та викликати пошкодження таких органів, як серце, печінка, легені, мозок, тощо (рис. 1.3.) [54].

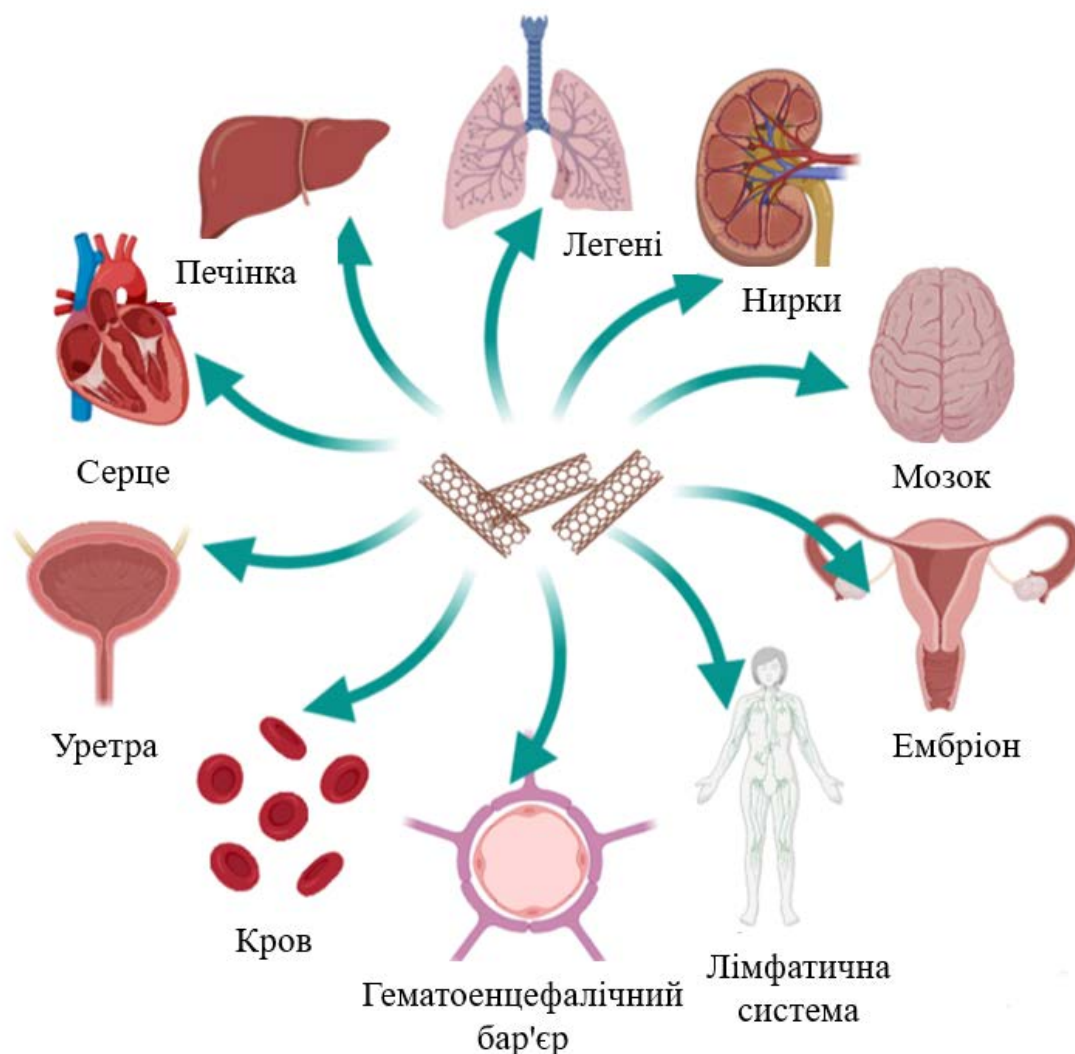


Рис. 1.3. Органи, в яких КНТ можуть накопичуватися після доставки протипухлинних препаратів.

Було показано, що ОСКНТ можуть проходити через клітинну мембрану макрофагів щурів, що призводить до зміни їх фізіології та клітинної функції [55]. Аналіз внутрішньоклітинного розподілу функціоналізованих ОСКНТ показав, що вони можуть проходити через клітинну мембрану і концентруватися в цитоплазмі або досягати ядра [56].

Токсичний вплив ОСКНТ також був підтверджений для кератиноцитів шкіри та бронхіального епітелію. Обробка нанотрубками призводила до втрати клітинної цілісності, зміни ультраструктури та морфології клітин, а також окислювального стресу, на що вказувала наявність вільних радикалів

та зниження антиоксидантів у клітинах [57, 58]. Було показано, що обробка клітин цими наноструктурами може призводити до підвищення рівня ROS що веде до пошкодження ДНК та загибелі клітин [59]. Ці наноструктури також здатні дозозалежно інгібувати проліферацію клітин і знижувати адгезивну здатність клітин НЕК293Т [60]. Повідомлялось також про зниження експресії асоційованих з адгезією білків, індукцію зупинки G1 стадії клітинного розвитку та апоптозу під впливом ОСКНТ [4].

Було показано, що низькі дози ОСКНТ призводять до зміни рівня експресії генів, пов'язаних з контролем клітинного циклу та міграцією клітин. Більш того, нанотрубки викликають порушення регуляції експресії мікроРНК, що відіграють важливу роль у проліферації клітин і розвитку мозку. Було показано, що одностінні вуглецеві нанотрубки виявляли антипроліферативні властивості в клітинах гліоми U87, оскільки вони знижували експресію пов'язаних з проліферацією генів і посилювали експресію генів, що контролюють апоптоз [5]. Таким чином, ці дослідження підтверджують генотоксичність та нейротоксичність ОСКНТ [61]. Також було показано, що одностінні карбонові нанотрубки впливають на імунну відповідь пригнічуючи глікопротеїни клітинної поверхні HLA-DR, в тому числі і шляхом регуляції мікроРНК miR-7 і miR-190b. Дерегуляція експресії ламіну В1 під впливом нанотрубок вказує на зміни стабільності геному в клітинах [62]. Одностінні карбонові нанотрубки також можуть відігравати певну роль у розвитку пухлин. Було показано регуляцію розвитку пухлин раковими стовбуровими клітинами за участі хронічного впливу ОСКНТ на них [63]. Також було підтверджено, що вплив нанотрубок забезпечує агресивний фенотип [64].

Наразі вважається, що нанотрубки можуть проникати в організм людини різними шляхами, включаючи дермальний та оральний спосіб. Коли нанотрубки використовуються для харчових упаковок, вони можуть досягати шлунку та кишківнику споживачів. Тоді як під час виробництва або

деградації, КНТ можуть потрапляти в дихальні шляхи і накопичуватися в легенях [65-67].

Нанотрубки можуть викликати гостре запалення легенів і хронічні захворювання [65-67]. Окрім цього, дослідження останніх років підтверджують, що вплив карбонових нанотрубок можна оцінювати як потенційний фактор розвитку серцево-судинних захворювань [68]. Також було показано, що функціоналізовані КНТ у низьких дозах ініціюють та посилюють резорбцію та вади розвитку плода [69]. Однак, дані про токсичність одностінних карбонових нанотрубок є суперечливими, а фундаментальні механізми пухлинного розвитку під впливом цих наноструктур до кінця не зрозумілі.

1.2. Протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ (DNAJB9)

DNAJB9 (протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ) складається з 223 амінокислот та має молекулярну масу 26 кДа [70]. Протеїн локалізований переважно в органах з розвиненим ендоплазматичним ретикуломом, таких як печінка, плацента, та нирки [6].

DNAJB9 діє як спів-шаперон білка теплового шоку 70 (HSP70), який відповідає за правильний фолдинг білків та чутливість стресу ендоплазматичного ретикулу (ER) [6, 71]. Структура DNAJB9, як і усіх гомологів сімейства, включає домен J, що містить мотив His-Pro-Asp. Він відіграє важливе значення у взаємодії з HSP70 шляхом стимуляції гідролізу АТФ [71].

DNAJB9 і HSP70 є необхідними шаперонами в умовах стресу ендоплазматичного ретикулу, що призводить до активації ER-асоційованої деградації (ERAD) і розгорнутої білкової реакції (UPR) [70, 73]. ERAD відіграє важливу роль у протеасомальній деградації білків, тоді як UPR є одним із ключових шляхів, що забезпечує гомеостаз протеїнів. Його ефекти

включають зменшення постачання новосинтезованих білків в ендоплазматичний ретикулум, покращення фолдингу білків, активацію метаболізму амінокислот, поліпшення антиоксидантної реакції та активацію клітинного апоптозу залежно від ступеня стресу ER [74, 75]. DNAJB9 є селективним репресором інозитол-залежного протеїну 1 α (IRE1), що є одним з головних сенсорно-сигнальних ензимів стресу ER. Він зв'язується з люмінальним доменом IRE1 і, за допомогою свого J-домену, гідролізує HSP70 молекулярний шаперон - білок, що зв'язується з важким ланцюгом імуноглобулінів ВіР-АТФ. Згодом ВіР-АДФ зв'язується з IRE1, що перешкоджає його димеризації і пригнічує UPR. Однак, збільшення кількості неправильно згорнутих білків при стресі ER призводить до їх конкурентного зв'язування з DNAJB9 та ВіР. Це робить можливим димеризацію IRE1, що призводить до UPR. Існують дані, що шаперон клітинного стресу DNAJB9 відіграє важливу роль у захисті клітин від апоптозу за умов стресу едоплазматичного ретикулума через інгібування проапоптотичної функції p53 [76, 77].

1.3. Протеїн 3, що зв'язується з IGF (IGFBP3)

IGFBPs (протеїн 3, що зв'язується з IGF) є транспортними білками мітогенних пептидів IGF (інсуліноподібний фактор росту), які відіграють важливу роль у регуляції проліферації, росту, диференціації, виживання, міграції та розвитку [8]. Зв'язуючись з IGFBP, IGF стає біологічно неактивним і не може взаємодіяти з рецептором [78].

IGFBP3 складається з 264 амінокислот і має три структурні домени, включаючи N-кінцевий домен, центральну або лінкерну область та C-кінцевий домен. Лінкерна область є неконсервативною, тоді як N-кінець і C-кінець є висококонсервативними доменами багатими на цистеїн [79].

Роль IGFBR-3 може залежати від інсуліноподібного фактора росту. Цей протеїн забезпечує полегшену доставку IGF до його рецепторів на поверхні клітини та активацію відповідних сигнальних каскадів, виконуючи ендокринну функцію [79]. IGF-незалежна роль IGFBR3 забезпечується його зв'язком з плазматичною мембраною та інтерналізацією в клітину та ядро, що є важливим для регуляції різноманітних клітинних функцій [80].

Нещодавно було визначено, що IGFBR3 виконує протилежні за характером функції за допомогою механізмів, незалежних від IGF. Цей протеїн може індукувати апоптоз та зупиняти клітинний цикл, а також сприяти репарації ДНК шляхом взаємодії з ДНК-залежною протеїнкіназою та індукувати аутофагію [81-83]. Окрім цього, IGFBR3 в ядрі може функціонувати як прямий, так і непрямий фактор транскрипції [84]. IGFBR3 також може опосередковувати антипроліферативні та апоптотичні ефекти [84]. IGFBR3 здатний модулювати реакції стресу ER, що послаблює стійку до стероїдів нейтрофільну бронхіальну астму [86].

Зміна експресії IGFBR3 асоціюється з підвищеним ризиком раку передміхурової залози, товстої кишки, легенів та раку молочної залози [10].

1.4. Протеїн 6, що зв'язується з IGF (IGFBR6)

IGFBR6 (протеїн 3, що зв'язується з IGF) – це один з представників сімейства білків, що зв'язують інсуліноподібний фактор росту. Цей протеїн є високонсервативним у різних видах і має мають схожу до інших представників сімейства тридоменну структуру. Однак, IGFBR6 має лише три дисульфідні зв'язки та не має мотиву, багатого цистеїном [87].

Основною функцією IGFBR6 є інгібування дії IGF-II, включаючи індуквану інсуліноподібним фактором проліферацію, диференціацію, міграцію та виживання. Окрім цього, цей протеїн може інгібувати

проліферацію фібробластів, а також індукувати апоптоз IGF-залежними та - незалежними шляхами [88-90].

Було показано, що підвищена експресія IGFBR6 інгібує ангиогенез у ембріонах риб *Danio rerio*, а тривала гіпоксія призводить до збільшення експресії IGFBR6 шляхом активації HIF-1 α [91]. Таким чином, IGFBR-6 сприяє механізму негативного зворотного зв'язку, що обмежує ангиогенез, викликаний гіпоксією [92].

Цей протеїн відіграє важливу роль в регуляції багатьох видах раку. У більшості досліджень експресія IGFBR-6 була нижчою в злоякісних пухлинах, порівнюючи з нормальними клітинами, що узгоджується з ідеєю, що він діє як інгібітор пухлинних процесів, у тому числі викликаних надмірною активністю IGF-II. Однак деякі дослідження показали протилежне, що може вказувати на компенсаторну відповідь на підвищення активності IGF-II або відображати IGF-незалежну дію IGFBR6 [9].

1.5. Кластерин (CLU)

Кластерин (CLU) – це активований стресом АТФ-незалежний молекулярний шаперон, що є гетеродимерним глікопротеїном розміром 75–80 кДа. Його експресія індукується термічним, окислювальним або механічним стресом. Протеїн є висококонсервативним у різних видах, демонструючи 70–80% ідентичності [93].

CLU відповідає за підтримку протеостазу клітини, особливо під час стресу ER, сприяючи деградації неправильно згорнутих білків [7, 94]. Подібно до сімейства шаперонів невеликих білків теплового шоку (sHSP), взаємодія CLU з неправильно згорнутими білками не залежить від АТФ і не спричиняє рефолдинг білка [7]. Цей шаперон специфічно інгібує аморфну агрегацію різноманітних білків шляхом утворення стабільних розчинних

комплексів [7, 95]. Він також інгібує утворення амілоїдних агрегатів, що спричиняють захворювання Альцгеймера [96].

CLU присутній у позаклітинній рідині, де відповідає за виявлення неправильно згорнутих і агрегованих білків шляхом детектування гідрофобних ділянок. Утворення стабільних комплексів полегшує їх поглинання клітиною через опосередкований рецепторами ендоцитоз і подальшу деградацію в лізосомах [97, 98].

Окрім цього, кластерин бере участь у регуляції різноманітних фізіологічних і патологічних станів, включаючи хворобу Паркінсона та пріонні хвороби [99]. CLU підвищено експресується при різних типах раку, де регулює важливі для канцерогенезу процеси та впливає на апоптотичну загибель клітин, репарацію ДНК, адгезію, ремоделювання тканин та реакцію імунної системи. Було показано, що кластерин індукується стресом ER та сприяє виживанню клітин гепатоцелюлярної карциноми в умовах стресу через взаємодію з ВіР [100].

1.6. Протеїн цинкового пальця 395

Протеїн цинкового пальця 395 (ZNF) є транскрипційними факторами з повторюваним мотивом, які характеризуються координацією одного або декількох іонів цинку (Zn^{2+}) для стабілізації укладки [50, 51]. Дані свідчать про те, що ZNF складають ~3% усіх генів людини та виконують надзвичайно різноманітні функції, включаючи регуляцію експресії генів, зв'язування ДНК та РНК, згортання білків, розвиток і диференціацію клітин [51, 52].

Білок типу цинкового пальця 395 (ZNF395) є членом ZNF типу C2H2 і має одну з найскладніших структур у сімействі. Він містить домен C2H2, який зазвичай зустрічається в транскрипційних факторах ссавців що є відомими регуляторами ліпогенезу [101, 102]. Було показано, що ZNF395 сприяє диференціації преадипоцитів і відіграє вирішальну роль у регуляції

ожиріння та метаболічного синдрому, спричиненого гіпоксією [103, 104]. До того ж, було виявлено, що ZNF395 має антипроліферативні властивості [105].

ZNF395 надмірно експресується в різних пухлинах, особливо в гіпоксичному мікросередовищі. Було показано, що протеїн бере участь у розвитку таких типів раку як рак нирки, печінки, молочної залози, простати, шкіри та шийки матки [105]. В умовах гіпоксії підвищені рівні ZNF395 можуть підтримувати запалення та прогресування раку шляхом активації генів, які беруть участь у вродженій імунній відповіді [107].

1.7. Білок щілинних контактів A1 (GJA1)

Білок щілинних контактів A1 (GJA1) або конексин 43 (CX43) – це інтегральний мембранний білок, які формує щілинні контакти між клітинами. Протеїн містить чотири трансмембранні домени, дві позаклітинні петлі, цитоплазматичну петлю та цитоплазматичні N- та C-кінці. C-кінцевий домен сильно варіює за довжиною і відіграє ключову регуляторну роль [12].

GJA1 є найбільш поширеним конексином, який присутній принаймні в 46 типах клітин, і експресується в більшості клітинних ліній [108]. Утворені щілинні контакти з'єднують цитоплазму сусідніх клітин, що забезпечує обмін іонами, РНК, поживними речовинами та вторинними месенджерами [109]. Щілинні контакти виконують ключові функції в збудливих тканинах, включаючи синхронізацію серцевого м'яза та управління нейронними мережами [110]. Крім того, GJA1 відіграє важливу роль у регуляції росту клітин, апоптозу, стабільності мікротрубочок, клітинного циклу, диференціації, проліферації та передачі сигналів клітинами [12, 13].

GJA1 також пов'язаний із розвитком деяких типів раку, включаючи рак шийки матки та молочної залози, де пов'язаний з регуляцією проліферації, інвазії, міграції та апоптозу [111, 112].

1.8. Протеїн 2, що індукується за гіпоксії (HILPDA)

Одним із білків, асоційованих з ліпідними краплями, є протеїн 2, що індукується за гіпоксії (HILPDA). Протеїн складається з 63 амінокислот та локалізується у клітині в ендоплазматичному ретикулумі та навколо ліпідних крапель [21].

Рівень HILPDA індукується жирними кислотами та адренергічними агоністами. Як відомо, білок також пов'язаний з гіпоксією та стресом ендоплазматичного ретикулума [113]. HILPDA сприяє накопиченню ліпідів у гепатоцитах, макрофагах і ракових клітинах, пригнічуючи гідроліз тригліцеридів і стимулюючи їх синтез [21, 22]. Експресія HILPDA посилюється при кількох видах раку, включаючи рак нирок, яєчників, матки та рак товстої кишки [16, 114-116]. Пригнічення активності HILPDA призводить до зниження внутрішньопухлинних рівнів тригліцеридів і порушення росту пухлин, пов'язане з активацією апоптозом.

1.9. Специфічний транскрипт мезодерми (MEST)

Mest (специфічний транскрипт мезодерми) є членом сімейства α - β гідролаз, що характеризується наявністю 8 β -листів, з'єднаних α -спіралями [117]. Точна функція Mest залишається невідомою, однак більшість представників сімейства є регуляторами ліпідного метаболізму, а деякі з них безпосередньо залучені до сигнальних шляхів ферментативного синтезу та деградації ключових сигнальних ліпідів [117].

Ген *Mest* регулюються епігенетично [118]. Метилування материнського алеля одразу після запліднення призводить до придушення експресії, що зазвичай є постійним. Однак, було показано, що гетерозиготні миші, які не мають функціонального батьківського алеля, можуть виявляти експресію

Mest, що вказує на можливість зворотнього імпринтингу за певних умов [120, 121]. Було показано, що MEST пов'язаний з гіпоксією та стресом ендоплазматичного ретикулула [122]. Нокаут гену призводить до затримки росту, тоді як самки також демонструють втрату материнської турботи. Той факт, що не всі миші з дефіцитом Mest демонструють цей фенотип, свідчить про те, що на функцію гену впливає мінливість середовища та генетичного фону [14].

Також було показано, що Mest впливає на розвиток центральної нервової системи. До того є, цей протеїн є важливим фактором для підтримки нейронів SNc [123, 124].

1.10. Кератин 18 (KRT18)

Проміжні філаменти складаються з великої кількості білків, які експресуються залежно від тканини та ступеня диференціації клітин. Цитокератини є основними структурними білками, що формують цитоплазматичну мережу проміжних філаментів [125]. Це сімейство складається щонайменше з 20 унікальних протеїнів, які діляться на дві категорії: відносно кислу групу типу I (СК9–СК20) і нейтрально-основну групу типу II (СК1–СК8). Ці два типи об'єднуються у співвідношенні 1:1 у нековалентні гетерополімери, які потім збираються у кератинові нитки [126].

Цитокератин 18 (СК18 або KRT18) кодує білок проміжних філаментів типу I, який локалізується в цитоплазмі та перинуклеарному просторі [127]. Цей протеїн був виявлений у печінці, легенях, нирках, шлунково-кишковому тракті, підшлунковій та молочній залозах [128]. KRT18 коекспресується з комплементарним кератиновим білком типу II СК8. За відсутності СК8 білок KRT18 руйнується, і кератинові проміжні філаменти не утворюються [129]. Динамічна рівновага KRT18 є важливою детермінантою його клітинних

функцій, і, як відомо, регулюється сайт-специфічним фосфорилуванням [130].

Функція цитокератину 18 полягає у забезпеченні гнучкого внутрішньоклітинного каркасу для структурування цитоплазми, протистояння зовнішнім стресам і підтримки нормальних мітохондріальних структур [131, 132]. KRT18 також необхідний для передачі сигналів клітинами та регуляції таких клітинних процесів як апоптоз, мітоз та прогресування клітинного циклу [17-20]. Було показано, що білок KRT18 має антипроліферативні властивості [105]. Окрім цього, KRT18 є вискоекспресованим у деяких типах раку та використовується як епітеліальний маркер у діагностичній гістопатології [15].

1.11. МікроРНК, її роль в контролі експресії генів

МікроРНК - це короткі молекули РНК розміром від 19 до 25 нуклеотидів, що забезпечують пост-транскрипційне пригнічення цільових генів. Одна мікроРНК може зв'язуватись з сотнею різних мРНК і таким чином впливати на експресію багатьох генів [133].

Синтез мікроРНК починається з транскрипції гена і формування первинного транскрипту під назвою при-мікроРНК (рис. 1.4.). Це послідовності характеризуються 5'-кепуванням і 3'-поліаденілюванням. Гени, що кодують мікроРНК, транскрибуються РНК-полімеразою II або іноді РНК-полімеразою III [134, 135]. Утворені при-мікроРНК розщеплюються комплексами, що складаються з РНК-зв'язуючого білка DGCR8 і РНКазою типу III Drosha. Отриманий продукт, пре-мікроРНК, транспортується комплексом Ran/GTP/Exportin 5 від ядра до цитоплазми для подальшої обробки РНКазою III Dicer. Сформований дуплекс довжиною 20-22 нуклеотидів розкручується з утворенням зрілої мікроРНК, що потім включається в білковий комплекс RISC [133]. Після зв'язування зі своєю

цільовою мРНК мікроРНК призводять до репресії трансляції при недосконалій комплементарності або деградації цільової мРНК у разі ідеальної комплементарності [136].

Біогенез мікроРНК сильно контролюється на багатьох стадіях включаючи транскрипцію мікроРНК, процесинг комплексу Drosha і Dicer, транспортування, зв'язування RISC і розпад мікроРНК [133, 137, 138].

Чисельні дослідження підтверджують участь мікроРНК у регуляції різноманітних прецесів [139, 140, 133]. Так miR-7 відповідає за фізіологічний розвиток гіпофіза, зорової нервової системи та кори головного мозку, тоді як miR-150 виконує важливу регуляторну роль у гематопоезі [141, 142].

Однак, порушення експресії мікроРНК пов'язане із розвитком різноманітних захворювань, включаючи онкологічні [141-143]. Було показано, що miR-27a бере участь у регуляції багатьох процесів росту пухлини, включаючи проліферацію, апоптоз, міграцію, інвазію, ангиогенез, тощо [143].

Наприклад, рак щитовидної залози характеризується надмірною експресією miR-19a, а інгібування цієї мікроРНК пригнічує проліферацію пухлинних клітин [144]. Було показано, що підвищена експресія miR-7 також пригнічує міграцію та інвазію пухлинних клітин [145]. В свою чергу, експресія miR-145 є зниженою в тканинах пухлини, а активність цієї мікроРНК може призводити до пригнічення росту і інвазії. Ця унікальна особливість робить miR-145 потенційним біомаркером розвитку раку та новою мішенню для розробки ліків [146].

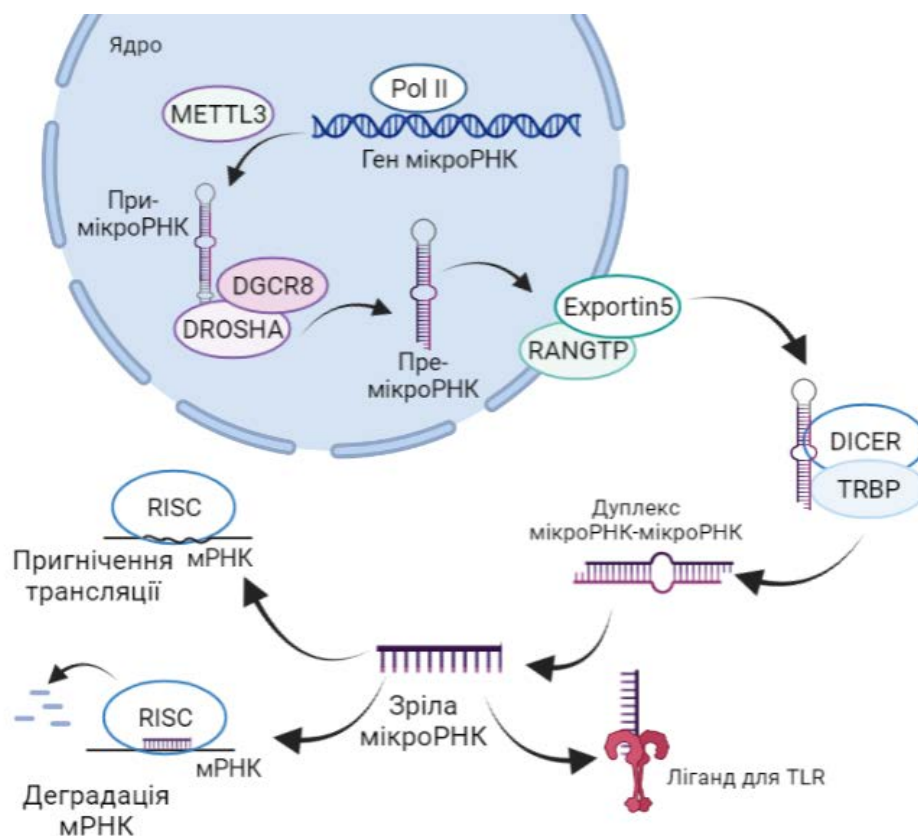


Рис. 1.4. Схематичне зображення синтезу мікроРНК і її взаємодії з мРНК.

РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Біоінформатичний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК на наявність сайтів зв'язування мікроРНК

Біоінформатичний аналіз 3'-нетранслюємих ділянок мРНК на наявність сайтів зв'язування мікроРНК проводився за допомогою веб-сайту TargetScanHuman (<https://www.targetscan.org>).

2.2. Експериментальний матеріал

Функціоналізовані одностінні карбонові нанотрубки діаметром 1–2 нм були суспензовані в дистильованій воді та відфільтровані за допомогою мембранного фільтра з розміром пор 1,2 мкм.

2.3. Культура клітин та умови культивування

Експеримент проводився на іморталізованих нормальних астроцитах людини клітинної лінії NHA/TS. Клітини були отримані від докторів Сасай і Танака (Японія) Клітини культивувались при 37 ° C в інкубаторі з 5% CO₂ та 95% повітря. До клітин додавали дві дози ОСКНТ (2 і 8 нг/мл середовища) та культивували їх протягом 24 годин.

2.4. Виділення РНК і синтез кДНК

РНК виділяли із нормальних астроцитів людини за допомогою реагенту TRIZOL [147]. Осад промивали 75% етанолом і розчиняли у воді без нуклеаз. Зразки додатково очищали шляхом повторного осадження 95% етанолом з ацетатом натрію, після чого осад знову розчиняли у воді без нуклеаз. Концентрацію РНК, а також її спектральні характеристики вимірювали за допомогою NanoDrop One (Thermo Scientific). Для зворотної транскрипції було використано набір для синтезу кДНК Thermo Scientific Verso. Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara, Японія) використовувався для поліаденілування та зворотної транскрипції мікроРНК.

2.5. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Вплив низьких доз одностінних карбонових нанотрубок на експресію генів *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *CLU*, *ZNF395*, *KRT18*, *GJA1*, *HILPDA*, *MEST* вимірювали за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (кПЛР). Для цього використовували «QuantStudio 5 Real-Time PCR System» (Applied Biosystems) та Absolute qPCR SYBRGreen mix. Полімеразну ланцюгову реакцію повторювали тричі.

Рівень мікроРНК також вимірювали за допомогою кПЛР в реальному часі з використанням Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (Takara, Японія). Для

аналізу експресії використовували чотири різні зразки РНК для кожної експериментальної групи та пари специфічних праймерів (Sigma-Aldrich, США; табл. 1.1.). Універсальний зворотний праймер кПЛР і специфічні для кожної мікроРНК прямі праймери використовувались для аналізу експресії мікроРНК (табл. 1.2.). Якість продуктів ампліфікації перевіряли шляхом аналізу кривих плавлення. Ампліфіковані фрагменти також аналізували на 3%-ому агарозному гелі допомогою електрофорезу.

Дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми "Differential Expression Calculator". Значення експресії мРНК були нормалізовані до рівня мРНК бета-актину (АКТВ), а мікроРНК до рівня РНК U6. Значення були представлені у відсотках від контролю (100%).

Таблиця 1.1.

Характеристика праймерів, що були використані для полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі.

Символ гена	Ім'я гена	Послідовність праймерів	Номери нуклеотидів у послідовності	GenBank номер
<i>CLU</i>	кластерин	F: 50-tcaaaatgctgtcaacgggg R: 50-tggtctcattgcacactcct	213-232 391-372	NM_001831
<i>DNAJB9</i>	протеїн теплового шоку В9 родини DnaJ	F: 50-gtcggagggtgcaggatatt R: 50-tcagggtgtacttcatggc	346-365 536-517	NM_012328
<i>IGFBP3</i>	протеїн 3, що зв'язується з IGF	F: 50-tctgatcccaagttccacc R: 50-tccatttctctacggcagg	613-632 785-766	NM_000598
<i>ZNF395</i>	протеїн цинкового пальця 395	F: 50-tctgtctctccaccctct R: 50-ggtgagactgggatctgga	1219-1238 1391-1372	NM_018660

<i>KRT18</i>	кератин 18	F: 50-cacagtctgctgaggttgga R: 50-gagctgctccatctgtaggg	966–985 1391–1372	NM_000224
<i>GJA1</i>	білок щілинних контактів A1	F: 50-ggcgtgaggaagtaccaaa R: 50-cctccagcagttgagtaggc	46–65 268–249	NM_000165
<i>IGFBP6</i>	протеїн 6, що зв'язується з IGF	F: 50-gctgttcagaggagaatcc R: 50-ttgggcacgtagagtgttg	397–416 632–613	NM_002178
<i>HILPDA</i>	протеїн 2, що індукується за гіпоксії	F: 50-caagctgagcaccgtgtaa R: 50-ccaccacaccagctaact	533–552 773–754	NM_013332
<i>MEST</i>	специфічний транскрипт мезодерми	F: 50-aagatggaggtgtgctgca R: 50-gcgccttctgaacttctcc	813–832 1021–1002	NM_002402
<i>ACTB</i>	бета-актин	F: 50-gacttcgagcaagagatgg R: 50-gcactgtgtggcgtag	747–766 980–961	NM_001101

Таблиця 1.2.

Характеристика праймерів, що були використані для полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з мікроРНК.

Символ мікроРНК	Назва мікроРНК	Послідовність праймерів
miR-144	microRNA-144-5p	50-ggatatcatcatatactgtaag
miR-145	microRNA-145-5p	50-gtccagtttcccaggaatccct
miR-150	microRNA-150-5p	50-tctcccaaccctgtaccagtg
miR-10a	microRNA-10a-5p	50-taccctgtagatccgaattgtg
miR-19a	microRNA-19a-5p	50-tgtgcaaactctatgcaaaactga
miR-7	microRNA-7-5p	50-tggaagactagtgattttgtgt
miR-27a	microRNA-27a-3p	50-ttcacagtggctaagttccgc

2.6. Статистичний аналіз

Результати триразових вимірювань у 4 незалежних експериментах були використані для підрахунку середнього значення \pm SEM. Статистичний аналіз виконувався за допомогою програми Excel. Різницю двох значень оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущим. Усі експериментальні дані qPCR аналізували на нормальність розподілу за допомогою графічного інструменту (графік нормальної ймовірності) та гістограми. Для аналізу деяких наборів даних було використано тест Д'Агостіно-Пірсона (P близький до 1,00) і тест Шапіро-Вілка ($W > 0,9$; $p > 0,9$).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив ОСКНТ на експресію генів *CLU*, *DNAJB9* та *IGFBP3* у нормальних астроцитах людини

Вплив одностінних карбонових нанотрубок діаметром 1–2 нм на експресію генів *CLU*, *DNAJB9* та *IGFBP3*, що пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулула, проліферацією клітин, апоптозом і канцерогенезом, вивчався на нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS.

Було показано, що обробка клітин двома дозами ОСКНТ (2 і 8 нг/мл середовища) призводить до значного посилення експресії усіх обраних генів. Так, рівень експресії гену, що кодує кластерин (*CLU*), був збільшений на 45% після культивування у присутності 2 нг ОСКНТ на 1 мл середовища протягом 24 годин. У той же час, обробка нормальних астроцитів людини 8 нг ОСКНТ на 1 мл середовища призводила до більшого ефекту на рівень експресії гену *CLU* (+94%, рис. 2.1.). Цей результат підтверджує дозозалежний характер впливу.

Одностінні карбонові нанотрубки також призводять до зміни експресії гену *IGFBP3* (білок-3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту). Було показано, що рівень експресії мРНК *IGFBP3* був підвищений на 53 та 87% після культивування нормальних астроцитів людини у присутності 2 та 8 нг ОСКНТ на 1 мл середовища, відповідно (рис. 2.1.).

Однак, обробка клітин лінії NHA/TS ОСКНТ призводила до більшого ефекту на експресію гену *DNAJB9* (сімейство білків теплового шоку DnaJ (Hsp40), член B9). Було показано, що рівень експресії гену збільшився на 102 та 106% порівняно з контролем при обробці 2 та 8 нг нанотрубок на 1 мл середовища, відповідно (рис. 2.1.).

Таким чином, було показано, що обробка нормальних астроцитів людини малими дозами нанотрубок призводить до посилення експресії генів

CLU, *DNAJB9* та *IGFBP3*, що пов'язані з проліферацією клітин, апоптозом і канцерогенезом. Отримані результати також вказують на значний вплив ОСКНТ на експресію генів, що кодують білки задіяні у реакціях стресу ендоплазматичного ретикулума (*CLU*, *DNAJB9* та *IGFBP3*). До того ж, експресія досліджених генів збільшуються при різних видах раку.

Цілком можливо, що нанотрубки можуть активувати сигнальні шляхи стресу ендоплазматичного ретикулума як і інші види наночастинок [148, 149]. Оскільки ОСКНТ не здатні до біологічного розкладання, цей стрес є постійним. Ймовірно, що стрес ендоплазматичного ретикулума відіграє центральну роль у забезпеченні впливу ОСКНТ на метаболізм, виживання та канцерогенез клітин. Це підтверджується дослідженням, що демонструє пригнічення ефектів наночастинок при інгібуванні стресу ендоплазматичного ретикулума [150]. Дані літератури вказують на важливу роль шаперону клітинного стресу *DNAJB9* у захисті клітин від апоптозу під час стресу ендоплазматичного ретикулума шляхом інгібування проапоптотичної функції p53 [151, 76]. До того ж, збільшення нанотрубками рівня експресії гену *IGFBP3* може мати антипроліферативні та апоптичні ефекти [77, 152].

Таким чином, отримані результати підтверджують небезпечність одностінних карбонових нанотрубок, що можуть порушувати функціональну цілісність геному, опосередкувати його перепрограмування та генетичну токсичність.

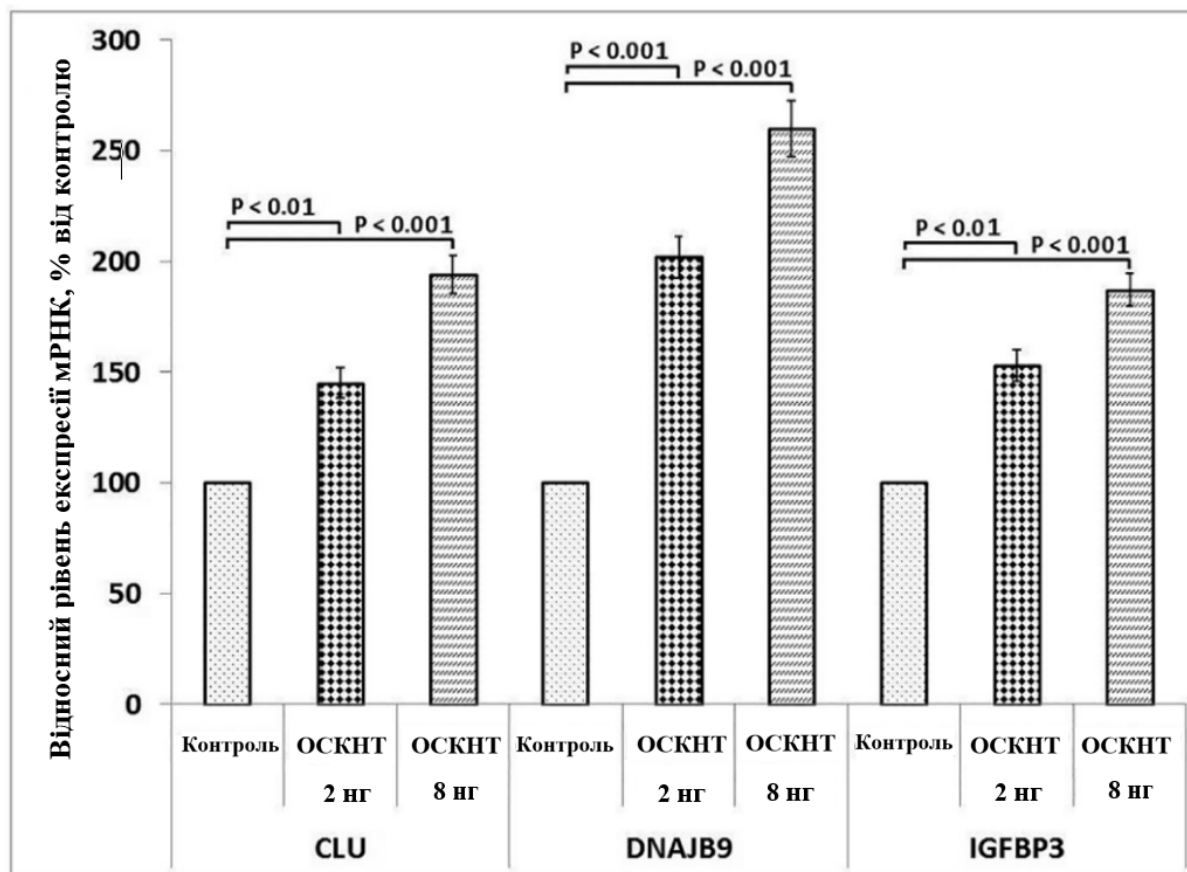


Рис. 2.1. Вплив ОСКНТ (2 та 8 нг/мл, 24 год) на експресію мРНК CLU, DNAJB9 та IGFBP3 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Значення експресії мРНК нормували за значенням експресії мРНК АСТВ; n = 4.

3.2. Вплив ОСКНТ на експресію генів *KRT18*, *ZNF395* та *GJA1* у нормальних астроцитах людини

Наступною задачею дослідження було визначити вплив одностінних карбонових нанотрубок на експресію генів *KRT18*, *ZNF395* та *GJA1* у нормальних астроцитах людини клітинної лінії NHA/TS.

Було продемонстровано, що експресія гену *KRT18*, який кодує основний структурний компонент мережі проміжних філаментів та є необхідним для передачі сигналів клітинами і регуляції апоптозу, була менш чутливою до токсичної дії цих карбонових нанотрубок [37-40]. Обробка

клітин нормальних астроцитів людини малими дозами нанотрубок (2 та 8 нг/мл середовища) протягом 24 годин призводить до незначного зниження рівня експресії на 13 і 15%, відповідно (рис. 2.2.).

Експресія гену *ZNF395*, що кодує білок типу цинковий палець 395 зазнала більш значних змін під впливом одностінних карбонових нанотрубок. Так, рівень експресії гену був зменшений на 44% після культивування у присутності 2 нг ОСКНТ на 1 мл середовища протягом 24 годин. У той же час, обробка нормальних астроцитів людини 8 нг ОСКНТ на 1 мл середовища призводила до подібного ефекту та призводила до зменшення рівня експресії на 45% (рис. 2.2.).

Вплив ОСКНТ на експресію гену *GJA1* (білок щілинних контактів альфа-1) також істотно не залежав від кількості нанотрубок (рис. 2.2.). Було продемонстровано, що рівень експресії цього гену зменшився на 72 і 76% при обробці 2 і 8 нг нанотрубок на 1 мл середовища, відповідно.

Таким чином, низькі дози одностінних карбонових нанотрубок впливають на експресію мРНК *ZNF395*, *KRT18* і *GJA1* в нормальних астроцитах людини. Ці зміни відображають порушення регуляції функціональної цілісності геному, що може сприяти розвитку раку, оскільки білки *ZNF395* і *KRT18* мають антипроліферативні властивості [105, 153]. Крім того, білок *GJA1* є компонентом щілинних контактів, що забезпечують шлях для дифузії низькомолекулярних матеріалів від клітини до клітини. Порушення його регуляції також може сприяти канцерогенезу [154].

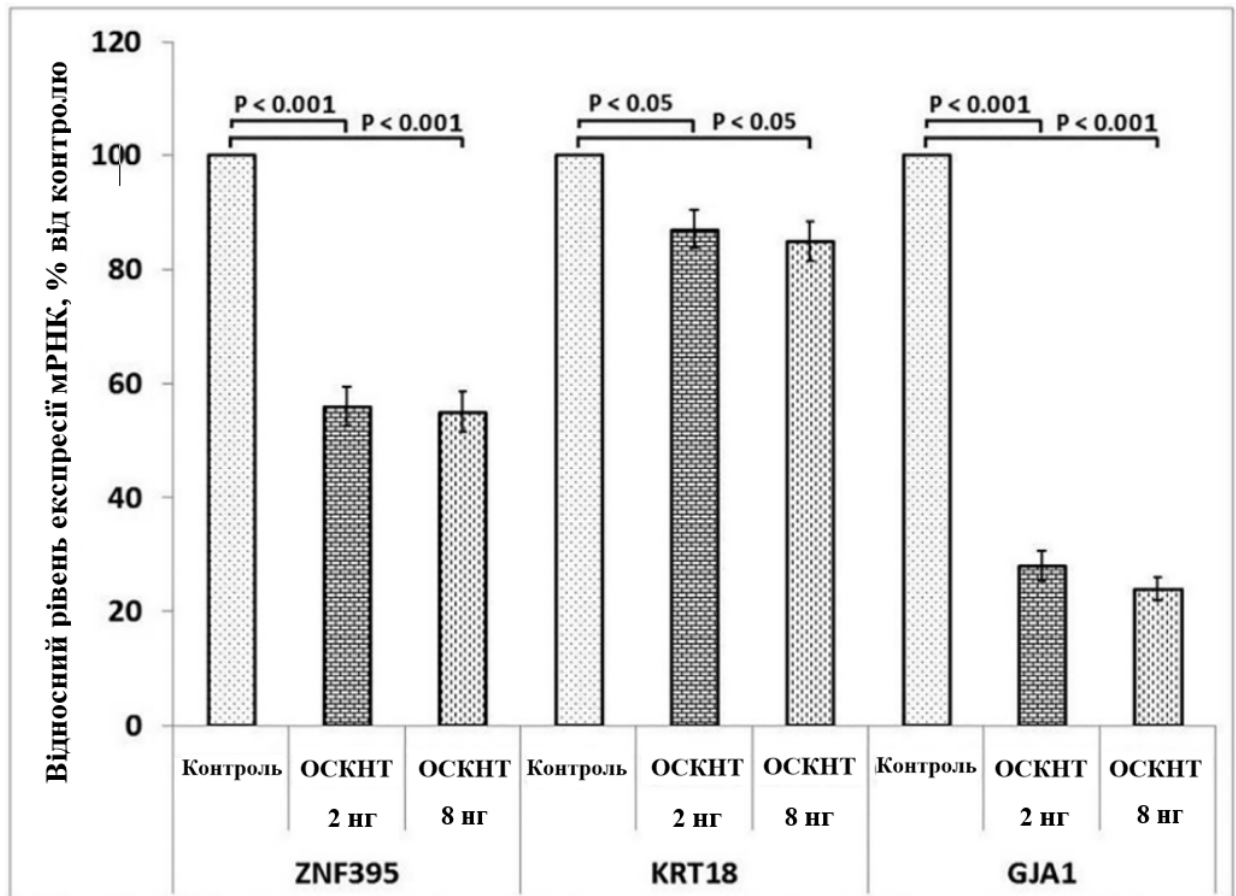


Рис. 2.2. Вплив ОСКНТ (2 та 8 нг/мл, 24 год) на експресію мРНК ZNF395, KRT18 та GJA1 у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Значення експресії мРНК нормували за значенням експресії мРНК АСТВ; $n = 4$.

3.3. Вплив ОСКНТ на експресію генів *MEST*, *HILPDA* та *IGFBP6* у нормальних астроцитах людини

Також було досліджено вплив одностінних карбонових нанотрубок на експресію гену *IGFBP6* (білок-6, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту), що задіяний у регуляції проліферації, росту, диференції та міграції клітин [9]. Було показано, що обробка клітин лінії NHA/TS низькими дозами ОСКНТ (2 і 8 нг/мл середовища) призводила до значного дозозалежного зниження експресії цього гену (рис. 2.3.). Схожі результати спостерігались для генів *MEST* та *HILPDA* (рис. 2.3.). Як відомо, ці гени пов'язані з гіпоксією та

стресом ендоплазматичного ретикулула і відіграють важливу роль у регуляції розвитку. Таким чином, одностінні карбонові нанотрубки можуть порушувати важливі процеси розвитку шляхом дозозалежного пригнічення експресії *MEST*, *HILPDA* та *IGFBP6* [122, 155, 40].

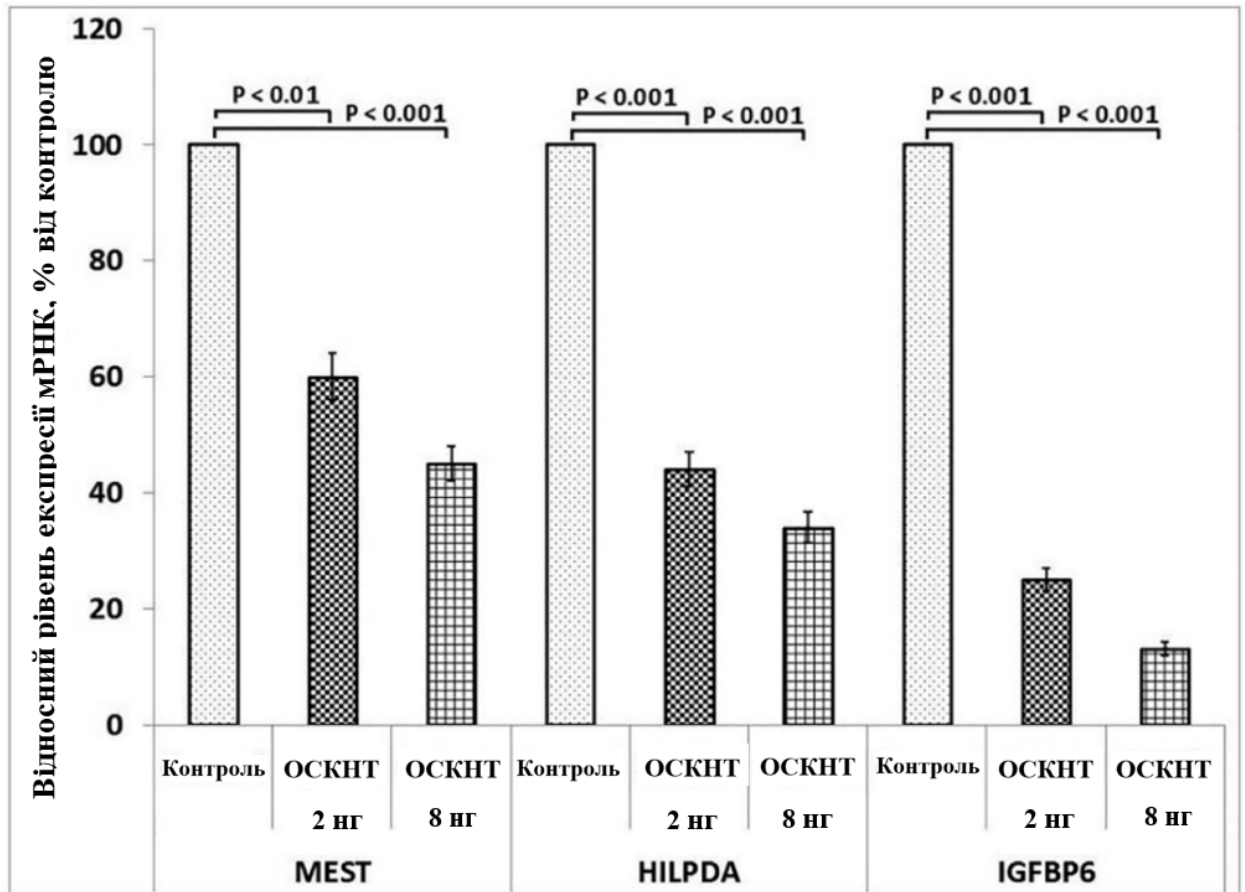


Рис. 2.3. Вплив ОСКНТ (2 та 8 нг/мл, 24 год) на експресію *MEST*, *HILPDA* та *IGFBP6* у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Значення експресії мРНК нормували за значенням експресії мРНК АСТВ; n = 4.

3.4. Ідентифікація сайтів зв'язування мікроРНК на 3'-нетранслюємих ділянках мРНК

Було ідентифіковано сайти зв'язування мікроРНК на 3'-нетранслюємих ділянках мРНК *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *CLU*, *ZNF395*, *KRT18*, *GJA1*, *HILPDA* і *MEST*. Було визначено, що мікроРНК *miR-27a* може зв'язувати

мРНК DNAJB9, miR-19a- IGFBP3 та CLU, miR-145 - IGFBP6 та MEST. Також було показано, що мРНК ZNF395 має специфічну до miR-7 область зв'язування на 3'-НТО, тоді як GJA1 має відповідну ділянку для зв'язування miR-144. miR-150 може зв'язувати мРНК HILPDA, а miR-10 – мРНК KRT18 (табл 2.1.).

Таблиця 2.1.

МікроРНК, що мають сайти зв'язування на 3` - нетранслюємих ділянках досліджуваних мРНК.

Символ гена	Ім'я гена	Символ мікроРНК	Назва мікроРНК
DNAJB9	протеїн теплового шоку B9 родини DnaJ	miR-27a	microRNA-27a-3p
IGFBP3	протеїн 3, що зв'язується з IGF	miR-19a	microRNA-19a-5p
IGFBP6	протеїн 6, що зв'язується з IGF	miR-145	microRNA-145-5p
CLU	кластерин	miR-19a	microRNA-19a-5p
ZNF395	протеїн цинкового пальця 395	miR-7	microRNA-7-5p
GJA1	білок щілинних контактів A1	miR-144	microRNA-144-5p
HILPDA	протеїн 2, що індукується за гіпоксії	miR-150	microRNA-150-5p
MEST	специфічний транскрипт мезодерми	miR-145	microRNA-145-5p
KRT18	кератин 18	miR-10a	microRNA-10a-5p

3.5. Вплив ОСКНТ на експресію мікроРНК у нормальних астроцитах людини

Також було досліджено вплив низьких доз одностінних карбонових нанотрубок діаметром 1–2 нм на експресію мікроРНК, що мають сайти зв'язування на 3`- нетранслюємих областях досліджуваних мРНК.

Дослідження впливу нанотрубок на функцію геному в нормальних астроцитах людини виявили значні зміни на рівні експресії мікроРНК. Було показано, що рівень експресії всіх досліджуваних мікроРНК був підвищений під впливом одностінних карбонових нанотрубок, за винятком miR-19a-5p і miR-203-5p (рис. 2.4.). Так, обробка нормальних астроцитів людини (8 нг/мл протягом 24 годин) призвела до зниження рівня експресії miR-19a-5p і miR-27a-3p на 35 і 55%, відповідно. Біоінформатичний аналіз визначив сайти зв'язування цих мікроРНК на 3`- нетранслюємих областях мРНК IGFBP3, CLU та DNAJB9. Отримані результати добре узгоджуються зі значною активацією цих мРНК. Результати вказують на можливу участь miR-19a-5p і miR-27a-3p у пост-транскрипційній регуляції експресії мРНК IGFBP3, CLU та DNAJB9.

В той же час, обробка нормальних астроцитів людини лінії NHA/TS ОСКНТ протягом 24 годин призводила до підвищення рівня експресії miR-7-5p, miR-10a-3p, що мають сайти зв'язування в мРНК ZNF395 та KRT18, відповідно (рис. 2.4.). Підвищений рівень експресії цих мікроРНК добре корелює зі зниженням рівня мРНК ZNF395 та KRT18.

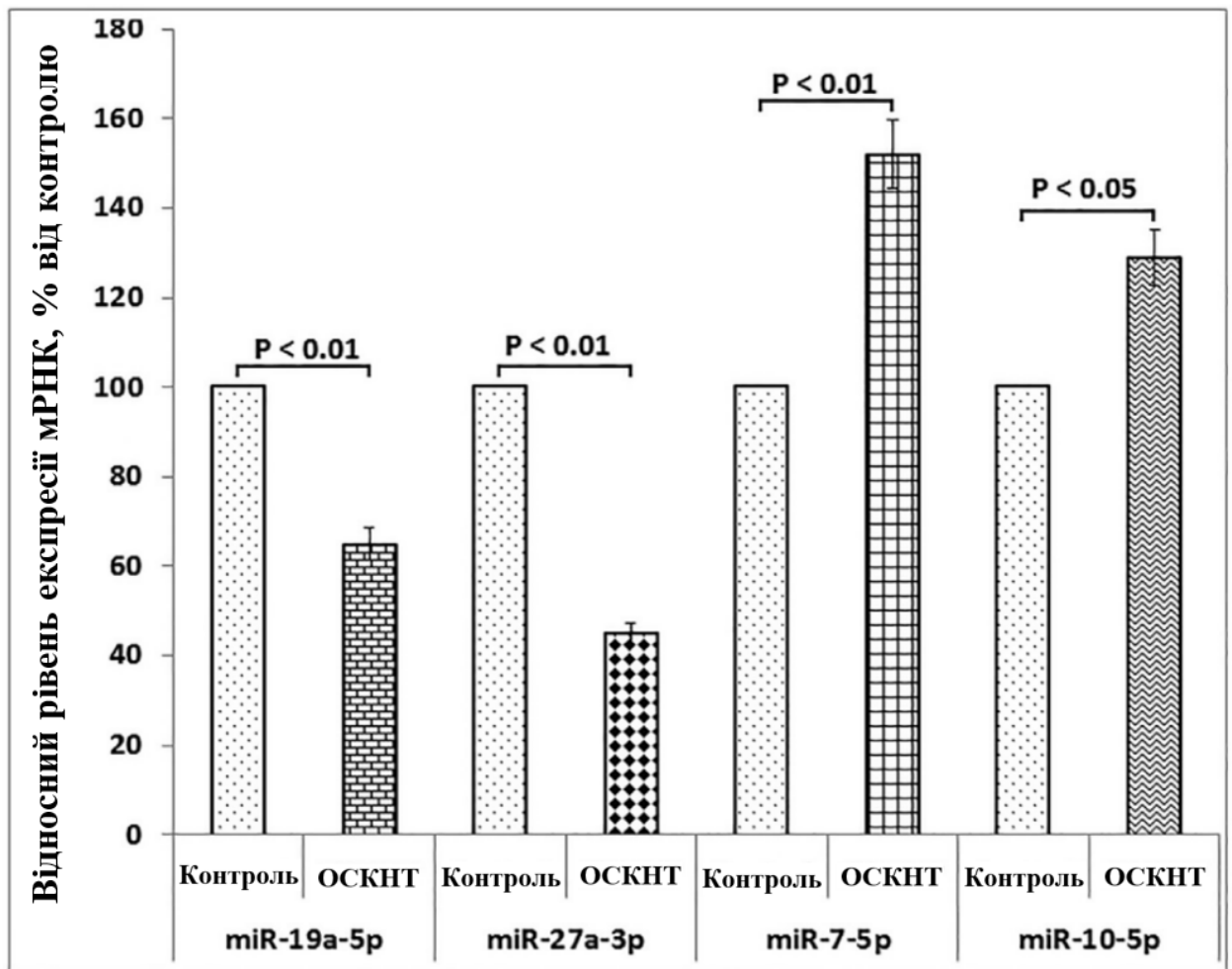


Рис. 2.4. Вплив ОСКНТ (8 нг/мл середовища, 24 год) на експресію мікроРНК miR-19a-5p, miR-27a-3p, miR-7-5p, та miR-10-5p у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Значення експресії мРНК нормували за значенням експресії РНК U6; n = 4.

Обробка клітин лінії NHA/TS одностінними карбоновими нанотрубками призводить також до підвищення рівня експресії miR-144-5p, miR-145-5p та miR-150-5p (+38, +685 і +84% , відповідно, рис. 2.5.). Ці результати добре узгоджуються зі зниженням рівня мРНК GJA1, HILPDA, MEST та IGFBP6.

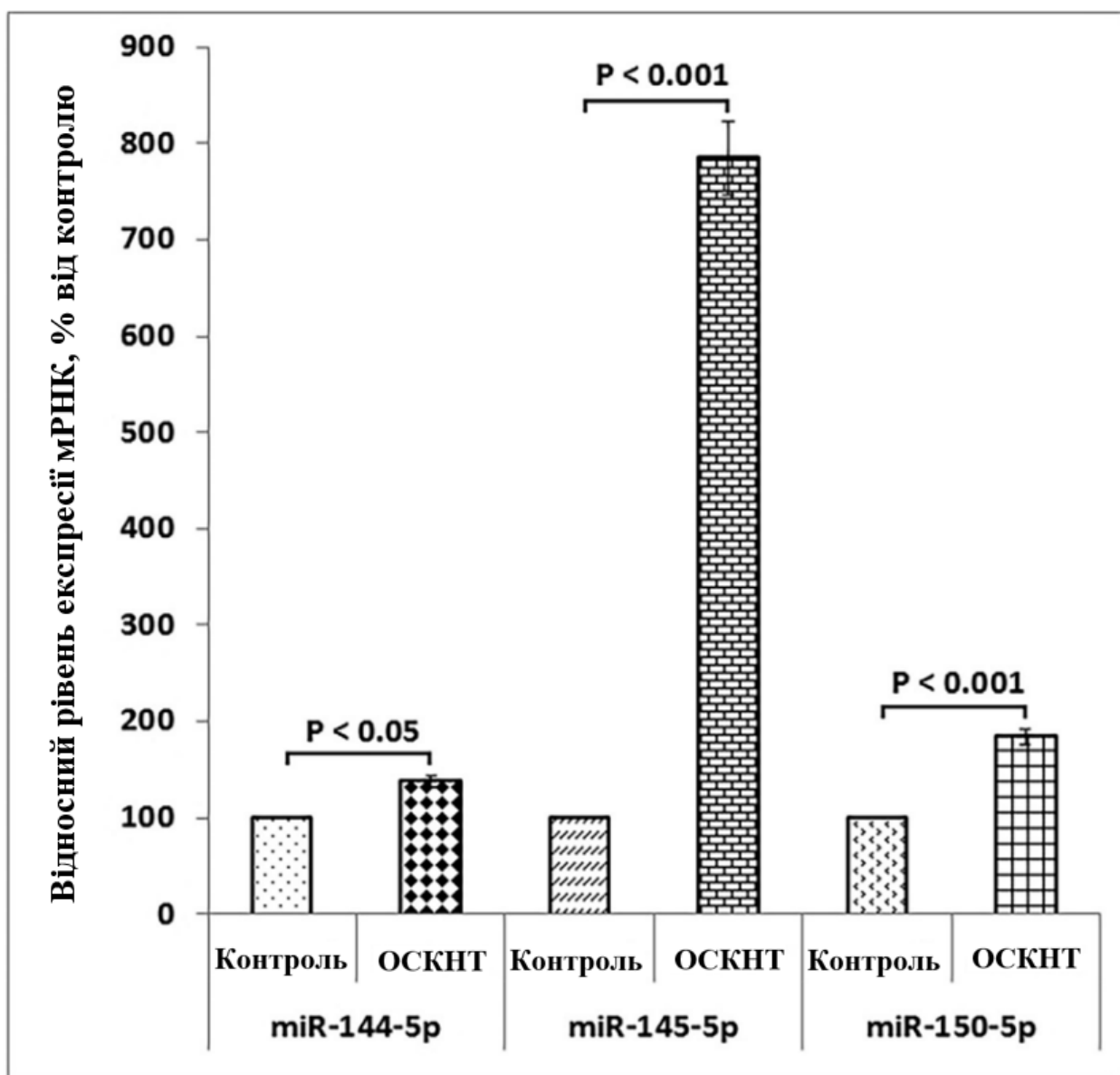


Рис. 2.5. Вплив ОСКНТ (8 нг/мл середовища, 24 год) на експресію мікроРНК miR-144-5p, miR-145-5p та miR-150-5p у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS. Значення експресії мРНК нормували за значенням експресії РНК U6; n = 4.

Таким чином, низькі дози одностінних карбонових нанотрубок порушують експресію численних мРНК і мікроРНК, що кодують різноманітні важливі регуляторні фактори, пов'язані зі стресом ендоплазматичного ретикулума, проліферацією клітин, апоптозом і канцерогенезом, у нормальних астроцитах людини. Було показано, що ці

ефекти можуть опосередковуватись як транскрипційною, так і пост-транскрипційною регуляцією (рис. 2.6.). Отримані результати підтверджують генотоксичний і нейротоксичний ефект цих унікальних сполук вуглецю.

Цілком можливо, що більшість спостережуваних змін у експресії численних мікроРНК та мРНК у нормальних астроцитах людини, оброблених ОСКНТ, опосередковані порушеннями функціональності генома за участі сигнальних шляхів стресу ендоплазматичного ретикулума. Більшість досліджених мРНК реагують на стрес ЕР, що підтверджує важливість стресу ендоплазматичного ретикулума у опосередкуванні впливу ОСКНТ. Однак, точні механізми токсичності одностінних карбонових нанотрубок досі значною мірою невідомі і потребують подальшого дослідження.

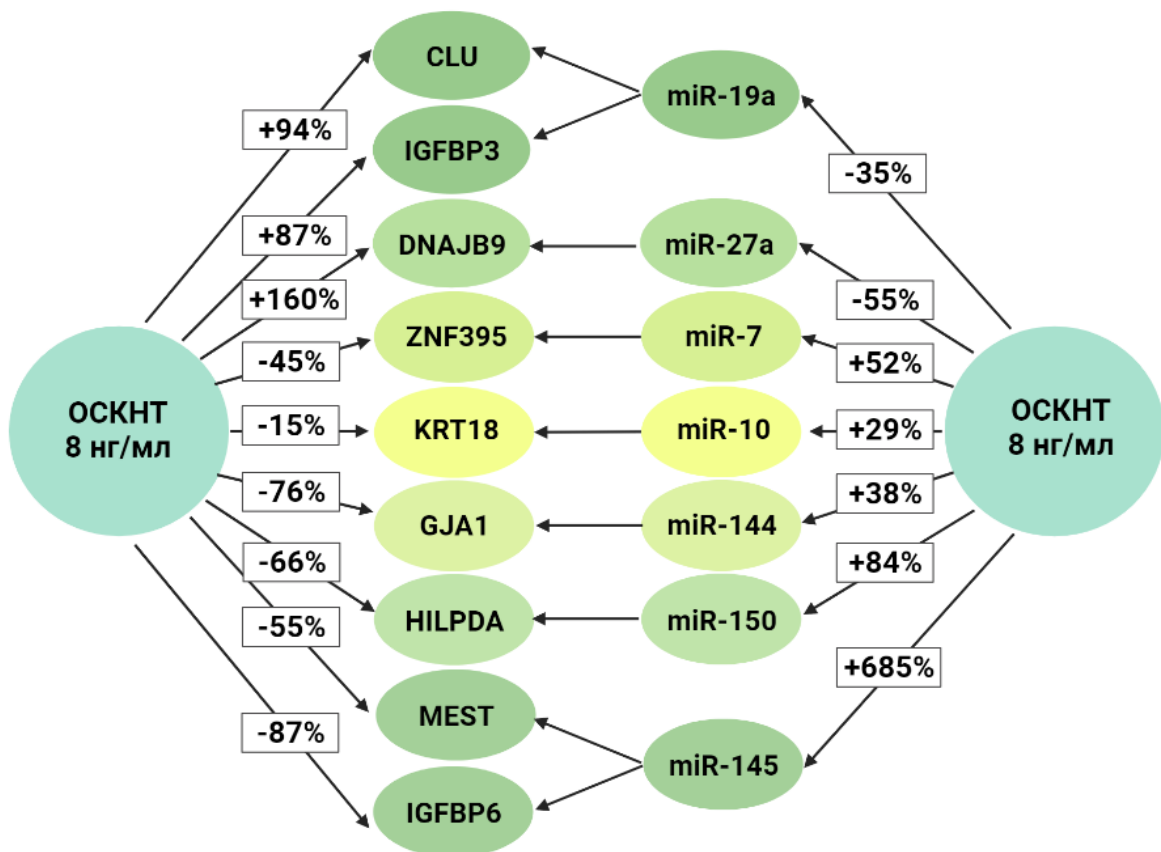


Рис. 2.6. Схематичне представлення ефектів одностінних карбонових нанотрубок на рівні експресії досліджуваних мРНК та мікроРНК.

ВИСНОВКИ

- 1) Встановлено, що низькі дози одностінних вуглецевих нанотрубок (2 і 8 нг/мл) індукують дозозалежне збільшення рівня експресії генів *CLU*, *DNAJB9* та *IGFBP3* у нормальних астроцитах людини лінії NHA/TS.
- 2) Показано, що за присутності низьких доз одностінних вуглецевих нанотрубок у нормальних астроцитах людини рівень експресії генів *IGFBP6*, *ZNF395*, *GJA1*, *HILPDA*, *MEST* та *KRT18* зменшується
- 3) В 3'-нетранслюємих послідовностях мРНК *CLU*, *DNAJB9*, *IGFBP3*, *IGFBP6*, *ZNF395*, *GJA1*, *HILPDA*, *MEST* та *KRT18* виявлено сайти зв'язування мікроРНК -7, -10, -19а, -27а, -144, -145 і -150.
- 4) Показано, що за дії одностінних вуглецевих нанотрубок в нормальних астроцитах людини спостерігається зниження рівня експресії *miR-19a* та *miR-27a* і збільшення експресії мікроРНК *microRNA-145*, *microRNA-19a*, *microRNA-7*, *microRNA-144* та *microRNA-150*.
- 5) Отримані результати відображають генотоксичні та нейротоксичні ефекти одностінних вуглецевих нанотрубок, які опосередковуються змінами в експресії генів як на транскрипційному, так і пост-транскрипційному рівнях.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1) Singh BGP, Baburao C, Pispati V, et al. Carbon nanotubes. A novel drug delivery system. *Int J Res Pharm Chem*. 2012;2:523–32.
- 2) He, H.; Pham-Huy, L. A.; Dramou, P.; Xiao, D.; Zuo, P.; Pham-Huy, C. Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. *Biomed Res. Int*. 2013, 578290.
- 3) Inami N, Mohamed MA, Shikoh E, Fujiwara A. Synthesis-condition dependence of carbon nanotube growth by alcohol catalytic chemical vapor deposition method. *Sci Technol Adv Mater* 2007; 8: 292–295.
- 4) Francis AP, Devasena T. Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicol Ind Health*. 2018 Mar;34(3):200-210. doi: 10.1177/0748233717747472. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29506458.
- 5) Minchenko, O.H., Tsymbal, D.O., Minchenko, D.O., Prylutska, S.V., Cherepanov, V.V., Prylutsky, Y.I. and Tsierkezos, N.G. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of the CCND2 gene in human U87 glioma cells. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, 2016, 47: 180-188. <https://doi.org/10.1002/mawe.201600462>.
- 6) Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):326-332. 37.
- 7) Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, et al. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry*. 2000;39:15953–15960.
- 8) Maki RG. Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(33):4985-4995. doi:10.1200/JCO.2009.27.5040.
- 9) Bach LA. Recent insights into the actions of IGFBP-6. *J Cell Commun Signal*. 2015;9(2):189-200. doi:10.1007/s12079-015-0288-4.

- 10) Cai Q, Dozmorov M, Oh Y. IGFBP-3/IGFBP-3 Receptor System as an Anti-Tumor and Anti-Metastatic Signaling in Cancer. *Cells*. 2020;9(5):1261. Published 2020 May 20. doi:10.3390/cells9051261.
- 11) Hasegawa R, Tomaru Y, De HM, Suzuki H, Hayashizaki Y, Shin JW. Identification of ZNF395 as a novel modulator of adipogenesis. *Exp Cell Res*. 2013;319(3):68–76.
- 12) Schulz, R.; Gorge, P.M.; Gorbe, A.; Ferdinandy, P.; Lampe, P.D.; Leybaert, L. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacol. Ther.*, 2015, 153, 90-106.
- 13) Gago-Fuentes, R.; Bechberger, J.F.; Varela-Eirin, M.; VarelaVazquez, A.; Acea, B.; Fonseca, E.; Naus, C.C.; Mayan, M.D. The C-terminal domain of connexin43 modulates cartilage structure via chondrocyte phenotypic changes. *Oncotarget*, 2016, 7(45), 73055- 73067.
- 14) Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S. C., Ishino, F., Keverne, E. B., and Surani, M. A. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat. Genet.*, 1998, 20, 163–169. doi: 10.1038/2464.
- 15) Weng YR, Cui Y, Fang JY. Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol Cancer Res*. 2012 Apr;10(4):485-93. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0222. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22452884.
- 16) Nishimura S, Tsuda H, Ito K, Takano M, Terai Y, Jobo T, Kigawa J, Sugiyama T, Yaegashi N, Aoki D. Differential expression of hypoxia-inducible protein 2 among different histological types of epithelial ovarian cancer and in clear cell adenocarcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Feb;20(2):220-6. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181ca1e16. PMID: 20134266.
- 17) Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 2001;154:763–73.

- 18) Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB. Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4373–8.
- 19) Galarneau L, Loranger A, Gilbert S, Marceau N. Keratins modulate hepatic cell adhesion, size and G1/S transition. *Exp Cell Res* 2007;313:179–94.
- 20) Coulombe PA, Omary MB. ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:110–22.
- 21) de la Rosa Rodriguez MA, Kersten S. Regulation of lipid droplet homeostasis by hypoxia inducible lipid droplet associated HILPDA. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020 Sep;1865(9):158738. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158738. Epub 2020 May 11. PMID: 32417386.
- 22) N. Denko, C. Schindler, A. Koong, K. Laderoute, C. Green, A. Giacci a Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment *Clin. Cancer Res.*, 6, 2000, pp. 480-487.
- 23) Singh, B., C. Baburao, V. Pispati, H. Pathipati, N. Muthy, S. Prassana and B. G. Rathode. Carbon nanotubes. A novel drug delivery system, *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, vol. 2, no. 2, pp. 523–532, 2012.
- 24) Meng L, Zhang X, Lu Q, Fei Z, Dyson PJ. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: targeting doxorubicin to tumors. *Biomaterials*. 2012 Feb;33(6):1689-98. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.004. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22137127.
- 25) Y. Zhang, Y. Bai, and B. Yan. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications, *Drug Discovery Today*, vol. 15, no. 11-12, pp. 428–435, 2010.
- 26) Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, and H. Dai, Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery, *ACS Nano*, vol. 1, no. 1, pp. 50–56, 2007.

- 27) Busby, M., Hallett, M. T., & Plante, I. The Complex Subtype-Dependent Role of Connexin 43 (GJA1) in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 2018, 19(3), 693. <https://doi.org/10.3390/ijms19030693>.
- 28) M. S. Digge, R. S. Moon, and S. G. Gattani. Applications of carbon nanotubes in drug delivery: a review, *International Journal of PharmTech Research*, vol. 4, no. 2, pp. 839–847, 2012.
- 29) He H, Pham-Huy LA, Dramou P, Xiao D, Zuo P, Pham-Huy C. Carbon nanotubes: applications in pharmacy and medicine. *Biomed Res Int*. 2013;2013:578290. doi: 10.1155/2013/578290. Epub 2013 Sep 30. PMID: 24195076; PMCID: PMC3806157.
- 30) Mitchell DT, Lee SB, Trofin L, Li N, Nevanen TK, Söderlund H, Martin CR. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. *J Am Chem Soc*. 2002 Oct 9;124(40):11864-5. doi: 10.1021/ja027247b. PMID: 12358526.
- 31) Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery. *Nano Res*. 2009 Feb 1;2(2):85-120. doi: 10.1007/s12274-009-9009-8. PMID: 20174481; PMCID: PMC2824900.
- 32) Pastorin G. Double functionalization of carbon nanotubes for multi modal drug delivery. *Chem Commun* 2006; 1182–1184.
- 33) Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, Partidos CD, Briand JP, Prato M, Bianco A, Kostarelos K. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J Am Chem Soc*. 2005 Mar 30;127(12):4388-96. doi: 10.1021/ja0441561. PMID: 15783221.
- 34) Badawi Anis¹, Wagdy K B Khalil², Nagwa A Kamel³ and Salwa L Abd El-Messieh³. Preparation, characterization, and genotoxicity of Polyvinyl alcohol-single-wall carbon nanotubes (PVA/SWCNTs) nanocomposites for tissue engineering applications, *Nanosci and Nanotech*, 2022 Jan; 12 045017.

- 35) Martin CR, Kohli P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 29–37.
- 36) Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K, Bianco A Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43: 5242–5246.
- 37) Beg S, Rizwan M, Sheikh AM, Hasnain MS, Anwer K, Kohli K. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. *J Pharm Pharmacol*. 2011 Feb;63(2):141-63. doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01167.x. Epub 2010 Nov 16. PMID: 21235578.
- 38) Wang X, Ren J, Qu X. Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *ChemMedChem*. 2008 Jun;3(6):940-5. doi: 10.1002/cmdc.200700329. PMID: 18286553.
- 39) Mohapatra SS, Kumar A. Method of drug delivery by carbon nanotube-chitosan nanocomplexes. US20080214494, 2008. 260.
- 40) VandeKopple MJ, Wu J, Auer EN, Giaccia AJ, Denko NC, Papandreou I. HILPDA Regulates Lipid Metabolism, Lipid Droplet Abundance, and Response to Microenvironmental Stress in Solid Tumors. *Mol Cancer Res*. 2019 Oct;17(10):2089-2101. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1343. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31308147; PMCID: PMC6774878.
- 41) Jingyi C et al. Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 16778–16785.
- 42) Liz K. Carbon nanotubes pass through body fast. *Nanotechweb org*. [online] 2009; 24233.
- 43) McDevitt MR, Chattopadhyay D, Kappel BJ, Jaggi JS, Schiffman SR, Antczak C, Njardarson JT, Brentjens R, Scheinberg DA. Tumor targeting with antibody-functionalized, radiolabeled carbon nanotubes. *J Nucl Med*. 2007 Jul;48(7):1180-9. doi: 10.2967/jnumed.106.039131. PMID: 17607040.

- 44) Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005 Jan;2(1):3-14. doi: 10.1602/neurorx.2.1.3. PMID: 15717053; PMCID: PMC539316.
- 45) VanHandel M, Alizadeh D, Zhang L, Kateb B, Bronikowski M, Manohara H, Badie B. Selective uptake of multi-walled carbon nanotubes by tumor macrophages in a murine glioma model. *J Neuroimmunol*. 2009 Mar 31;208(1-2):3-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.12.006. Epub 2009 Jan 31. PMID: 19181390.
- 46) Rosen Y, Elman NM. Carbon nanotubes in drug delivery: focus on infectious diseases. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6: 517–530.
- 47) Pan B, Cui D, Xu P, Ozkan C, Feng G, Ozkan M, Huang T, Chu B, Li Q, He R, Hu G. Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimer-coated multi-walled carbon nanotubes and their application in gene delivery systems. *Nanotechnology*. 2009 Mar 25;20(12):125101. doi: 10.1088/0957-4484/20/12/125101. Epub 2009 Mar 3. PMID: 19420458.
- 48) Ou Z, Wu B, Xing D, Zhou F, Wang H, Tang Y. Functional single-walled carbon nanotubes based on an integrin $\alpha v \beta 3$ monoclonal antibody for highly efficient cancer cell targeting. *Nanotechnology*. 2009 Mar 11;20(10):105102. doi: 10.1088/0957-4484/20/10/105102. Epub 2009 Feb 16. PMID: 19417509.
- 49) Pramanik M, Swierczewska M, Green D, Sitharaman B, Wang LV. Single-walled carbon nanotubes as a multimodal-thermoacoustic and photoacoustic-contrast agent. *J Biomed Opt*. 2009 May-Jun;14(3):034018. doi: 10.1117/1.3147407. PMID: 19566311; PMCID: PMC2732201.
- 50) Penman D. Carbon nanotubes show drug delivery promise. *New scientist.com* [online] 2003.
- 51) Francis AP, Ganapathy S, Palla VR, Murthy PB, Ramaprabhu S, Devasena T. One time nose-only inhalation of MWCNTs: Exploring the mechanism of toxicity by intermittent sacrifice in Wistar rats. *Toxicol Rep*.

- 2015 Feb 7;2:111-120. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.02.003. PMID: 28962343; PMCID: PMC5598153.
- 52) Arul Prakash, F, Babu, G, Lavanya, M. Toxicity studies of aluminium oxide nanoparticles in cell lines. 2011; *Int. J. Nano. App.* 5: 99-107.
- 53) Durga, M, Arul Prakash, F, Rajasekar, A. Potential cell line toxicity of environmental nanoparticles. 2012; *Int Res J of Pharm* 3: 145-149.
- 54) Yan H, Xue Z, Xie J, Dong Y, Ma Z, Sun X, Kebebe Borga D, Liu Z, Li J. Toxicity of Carbon Nanotubes as Anti-Tumor Drug Carriers. *Int J Nanomedicine.* 2019 Dec 31;14:10179-10194. doi: 10.2147/IJN.S220087. PMID: 32021160; PMCID: PMC6946632.
- 55) Pulskamp K, Diabaté S, Krug HF. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol Lett.* 2007 Jan 10;168(1):58-74. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.001. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17141434.
- 56) Pantarotto D, Briand JP, Prato M, Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem Commun (Camb).* 2004 Jan 7;(1):16-7. doi: 10.1039/b311254c. Epub 2003 Nov 3. PMID: 14737310.
- 57) Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, Baron P. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2003 Oct 24;66(20):1909-26. doi: 10.1080/713853956. PMID: 14514433.
- 58) Shvedova, AA, Kisin, E, Keshava, N. (2004) Cytotoxic and genotoxic effects of single wall carbon nanotube exposure on human keratinocytes and bronchial epithelial cells. In: Abstracts of papers of the American Chemical Society. 1155. Washington, DC: ACS Publications, pp. U1233–U1233.
- 59) Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung

- fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 Dec;70(24):2071-9. doi: 10.1080/15287390701601251. PMID: 18049996.
- 60) Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M, Gao H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol Lett*. 2005 Jan 15;155(1):73-85. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.08.015. PMID: 15585362.
- 61) Minchenko OH, Khita OO, Rudnytska OV, Yefimova YV, Tsymbal DO, Minchenko DO, Sliusar MY, He Q, Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr Regul*. 2022 Apr 30;56(2):115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. PMID: 35489050.
- 62) Minchenko OH, Tsymbal DO, Minchenko DO, Prylutska SV, Hnatiuk OS, Prylutskyi YI, Tsierkezos NG, Ritter U. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of genes associated with immune response in normal human astrocytes. *Toxicol In Vitro*. 2018 Oct;52:122-130. doi: 10.1016/j.tiv.2018.06.011. Epub 2018 Jun 12. PMID: 29906516.
- 63) Luanpitpong S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y. Induction of stem-like cells with malignant properties by chronic exposure of human lung epithelial cells to single-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol*. 2014 May 11;11:22. doi: 10.1186/1743-8977-11-22. PMID: 24885671; PMCID: PMC4040122.
- 64) Lohcharoenkal W, Wang L, Stueckle TA, Dinu CZ, Castranova V, Liu Y, Rojanasakul Y. Chronic exposure to carbon nanotubes induces invasion of human mesothelial cells through matrix metalloproteinase-2. *ACS Nano*. 2013 Sep 24;7(9):7711-23. doi: 10.1021/nn402241b. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23924264; PMCID: PMC3875633.
- 65) Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 2004 Jan;77(1):126-34. doi: 10.1093/toxsci/kfg243. Epub 2003 Sep 26. PMID: 14514958.

- 66) Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 15;207(3):221-31. doi: 10.1016/j.taap.2005.01.008. PMID: 16129115.
- 67) Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V, Baron P. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Nov;289(5):L698-708. doi: 10.1152/ajplung.00084.2005. Epub 2005 Jun 10. PMID: 15951334.
- 68) Li Z, Hulderman T, Salmen R, Chapman R, Leonard SS, Young SH, Shvedova A, Luster MI, Simeonova PP. Cardiovascular effects of pulmonary exposure to single-wall carbon nanotubes. *Environ Health Perspect*. 2007 Mar;115(3):377-82. doi: 10.1289/ehp.9688. Epub 2006 Dec 4. PMID: 17431486; PMCID: PMC1849906.
- 69) Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L. Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS Nano*. 2011 Jun 28;5(6):4624-33. doi: 10.1021/nn200372g. Epub 2011 Jun 3. PMID: 21615177.
- 70) Kurisu J, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M, Imaizumi K. MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes to Cells*. 2003;8(2):189-202.
- 71) Shen Y, Meunier L, Hendershot LM. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15947-15956.

- 72) Lai CW, Otero JH, Hendershot LM, Snapp E. ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery. *J Biol Chem.* 2012;287(11):7969-7978
- 73) Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19620-19627.
- 74) Hwang J, Qi L. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(8):593-605.
- 75) Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol.* 2015;17(7):829-838.
- 76) López I, Tournillon AS, Prado Martins R, Karakostis K, Malbert-Colas L, Nylander K, Fåhraeus R. p53-mediated suppression of BiP triggers BIK-induced apoptosis during prolonged endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2017 Oct;24(10):1717-1729. doi: 10.1038/cdd.2017.96. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28622297; PMCID: PMC5596431.
- 77) Lee HJ, Kim JM, Kim KH, Heo JI, Kwak SJ, Han JA. Genotoxic stress/p53-induced DNAJB9 inhibits the pro-apoptotic function of p53. *Cell Death Differ.* 2015 Jan;22(1):86-95. doi: 10.1038/cdd.2014.116. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25146923; PMCID: PMC4262772.
- 78) Hodgkinson SC, Davis SR, Moore LG, Henderson HV, Gluckman PD. Metabolic clearance of insulin-like growth factor-II in sheep. *J Endocrinol.* 1989 Dec;123(3):461-8. doi: 10.1677/joe.0.1230461. PMID: 2607256.
- 79) Varma Shrivastav S, Bhardwaj A, Pathak KA, Shrivastav A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:286. Published 2020 May 5. doi:10.3389/fcell.2020.00286.
- 80) Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Graslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* 2011:414729.

- 81) Shahjee H, Bhattacharyya N, Zappala G, Wiench M, Prakash S, Rechler MM. An N-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) induces apoptosis in human prostate cancer cells in an IGF-independent manner. *Growth Horm IGF Res.* 2008 Jun;18(3):188-97. doi: 10.1016/j.ghir.2007.08.006. Epub 2007 Oct 23. PMID: 17959403.
- 82) Lin MZ, Marzec KA, Martin JL, Baxter RC. The role of insulin-like growth factor binding protein-3 in the breast cancer cell response to DNA-damaging agents. *Oncogene.* 2014 Jan 2;33(1):85-96. doi: 10.1038/onc.2012.538. Epub 2012 Nov 26. PMID: 23178489.
- 83) Grkovic S, O'Reilly VC, Han S, Hong M, Baxter RC, Firth SM. IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments. *Oncogene.* 2013 May 9;32(19):2412-20. doi: 10.1038/onc.2012.264. Epub 2012 Jul 2. PMID: 22751133.
- 84) Zhong Y, Duan C. Lamprey IGF-Binding Protein-3 Has IGF-Dependent and -Independent Actions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017 Jan 18;7:174. doi: 10.3389/fendo.2016.00174. PMID: 28149290; PMCID: PMC5241279.
- 85) Bai R, Cui Z, Ma Y, Wu Y, Wang N, Huang L, Yao Q, Sun J. The NF- κ B-modulated miR-19a-3p enhances malignancy of human ovarian cancer cells through inhibition of IGFBP-3 expression. *Mol Carcinog.* 2019 Dec;58(12):2254-2265. doi: 10.1002/mc.23113. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31513316.
- 86) B. Singh, S. Lohan, P.S. Sandhu, A. Jain, S.K. Mehta, Functionalized carbon nanotubes and their promising applications in therapeutics and diagnostics, *Nanobiomater. Med. Imag.* 2016, 455e478.
- 87) Neumann GM, Marinaro JA, Bach LA. Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry.* 1998 May 5;37(18):6572-85. doi: 10.1021/bi972894e. PMID: 9572875.

- 88) Raykha C, Crawford J, Gan BS, Fu P, Bach LA, O'Gorman DB. IGF-II and IGFBP-6 regulate cellular contractility and proliferation in Dupuytren's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1511-9. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.04.018. Epub 2013 Apr 24. PMID: 23623986.
- 89) Hale K, Murray AW, Cosgrove LJ, Bach LA, Hartfield PJ. Prevention of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II is differentially attenuated by IGF-binding proteins in PC12 cells. *Neurosci Res Commun*. 2000; 27:75–83.
- 90) Iosef C, Gkourasas T, Jia CY, Li SS, Han VK. A functional nuclear localization signal in insulin-like growth factor binding protein-6 mediates its nuclear import. *Endocrinology*. 2008 Mar;149(3):1214-26. doi: 10.1210/en.2007-0959. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18039785.
- 91) Zhang C, Lu L, Li Y, Wang X, Zhou J, Liu Y, Fu P, Gallicchio MA, Bach LA, Duan C. IGF binding protein-6 expression in vascular endothelial cells is induced by hypoxia and plays a negative role in tumor angiogenesis. *Int J Cancer*. 2012 May 1;130(9):2003-12. doi: 10.1002/ijc.26201. Epub 2011 Aug 5. PMID: 21618524; PMCID: PMC3259243.
- 92) Messmer-Blust A, An X, Li J. Hypoxia-regulated angiogenic inhibitors. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 Nov;19(8):252-6. doi: 10.1016/j.tcm.2010.02.006. PMID: 20447566; PMCID: PMC2866290.
- 93) Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 May;34(5):427-31. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00155-8. PMID: 11906815.
- 94) Zhang F, Kumano M, Beraldi E. Clusterin facilitates stress-induced lipidation of LC3 and autophagosome biogenesis to enhance cancer cell survival. *Nat Commun*. 2014;5:6775.
- 95) Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat-shock proteins. *J Biol Chem*. 1999;274:6875–6881.
- 96) Yerbury JJ, Poon S, Meehan S, Thompson B, Kumita JR, Dobson CM, Wilson MR. The extracellular chaperone clusterin influences amyloid

- formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB J.* 2007 Aug;21(10):2312-22. doi: 10.1096/fj.06-7986com. Epub 2007 Apr 5. PMID: 17412999.
- 97) Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep.* 2005 Dec;6(12):1131-6. doi: 10.1038/sj.embor.7400586. PMID: 16319958; PMCID: PMC1369217.
- 98) Wyatt AR, Yerbury JJ, Ecroyd H, Wilson MR. Extracellular chaperones and proteostasis. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:295-322. doi: 10.1146/annurev-biochem-072711-163904. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23350744.
- 99) Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep.* 2005 Dec;6(12):1131-6. doi: 10.1038/sj.embor.7400586. PMID: 16319958; PMCID: PMC1369217.
- 100) So Ri Kim, Yong Chul Lee, Hae Jin Park, Kyeong Hwa Park. An inhaled IGFBP-3 peptide attenuates steroid-resistant neutrophilic bronchial asthma through modulation of ER stress. *European Respiratory Journal* 2019 54: OA4955; DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.OA4955
- 101) Boeckle S, Pfister H, Steger G. A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2. *Virology.* 2002 Feb 1;293(1):103-17. doi: 10.1006/viro.2001.1231. PMID: 11853404.
- 102) Pei H, Yao Y, Yang Y, Liao K, Wu J-R. Kruppel-like €factor KLF9 regulates PPARc transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell Death Differ.* 2011; 18(2):315–327.
- 103) Hasegawa R, Tomaru Y, De HM, Suzuki H, Hayashizaki Y, Shin JW. Identification of ZNF395 as a novel modulator of adipogenesis. *Exp Cell Res.* 2013;319(3):68–76.
- 104) Geiger K, Leiherer A, Muendlein A, Stark N, Geller-Rhomberg S, Saely CH, Wabitsch M, Fraunberger P, Drexel H. Identification of hypoxia-induced genes in human SGBS adipocytes by microarray analysis. *PLoS*

- One. 2011;6(10):e26465. doi: 10.1371/journal.pone.0026465. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22039494; PMCID: PMC3198480.
- 105) Zhang B, Wang J, Liu W, Yin Y, Qian D, Zhang H, Shi B, Li C, Zhu J, Zhang L, Gao L, Wang C. Cytokeratin 18 knockdown decreases cell migration and increases chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Dec;142(12):2479-2487. doi: 10.1007/s00432-016-2253-x. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27601168.
- 106) Erdenee S, Li J, Kang Z, Xu H, Zang R, Cao X, Yang J, Cai Y, Lan X. Sheep zinc finger proteins 395 (ZNF395): insertion/deletion variations, associations with growth traits, and mRNA expression. *Anim Biotechnol*. 2020 Jun;31(3):237-244. doi: 10.1080/10495398.2019.1585865. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30890014.
- 107) Jordanovski D, Herwartz C, Pawlowski A, Taute S, Frommolt P, Steger G. The hypoxia-inducible transcription factor ZNF395 is controlled by I κ B kinase-signaling and activates genes involved in the innate immune response and cancer. *PLoS One*. 2013 Sep 23;8(9):e74911. doi: 10.1371/journal.pone.0074911. PMID: 24086395; PMCID: PMC3781154.
- 108) Iyyathurai J, D'hondt C, Wang N, De Bock M, Himpens B, Retamal MA, Stehberg J, Leybaert L, Bultynck G. Peptides and peptide-derived molecules targeting the intracellular domains of Cx43: gap junctions versus hemichannels. *Neuropharmacology*. 2013 Dec;75:491-505. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.050. Epub 2013 May 7. PMID: 23664811.
- 109) Upham, B.L.; Sovadinova, I.; Babica, P. Gap junctional intercellular communication: A functional biomarker to assess adverse effects of toxicants and toxins, and health benefits of natural products. *J. Vis. Exp.*, 2016, (118). doi: 10.3791/54281.
- 110) Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Feb;11(2):87-99. doi: 10.1038/nrn2757. PMID: 20087359.

- 111) C. Wang, K. Jiang, D. Gao, X. Kang, C. Sun, Q. Zhang, Y. Li, L. Sun, S. Zhang, K. Guo, Y. Liu Clusterin protects hepatocellular carcinoma cells from endoplasmic reticulum stress induced apoptosis through GRP78. *PLoS One*, 8 (2013), p. e55981.
- 112) Meng S, Fan X, Zhang J, An R, Li S. GJA1 Expression and Its Prognostic Value in Cervical Cancer. *Biomed Res Int*. 2020 Nov 24;2020:8827920. doi: 10.1155/2020/8827920. PMID: 33299882; PMCID: PMC7709497.
- 113) VandeKopple MJ, Wu J, Auer EN, Giaccia AJ, Denko NC, Papandreou I. HILPDA Regulates Lipid Metabolism, Lipid Droplet Abundance, and Response to Microenvironmental Stress in Solid Tumors. *Mol Cancer Res*. 2019 Oct;17(10):2089-2101. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1343. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31308147; PMCID: PMC6774878.
- 114) A. Togashi, T. Katagiri, S. Ashida, T. Fujioka, O. Maruyama, Y. Wakumoto, Y. Sakamoto, M. Fujime, Y. Kawachi, T. Shuin, Y. Nakamura Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy *Cancer Res.*, 65 (2005), pp. 4817-4826.
- 115) Kim SH, Wang D, Park YY, Katoh H, Margalit O, Sheffer M, Wu H, Holla VR, Lee JS, DuBois RN. HIG2 promotes colorectal cancer progression via hypoxia-dependent and independent pathways. *Cancer Lett*. 2013 Dec 1;341(2):159-65. doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.028. Epub 2013 Aug 2. PMID: 23916472; PMCID: PMC3928010.
- 116) S. Nishimura, H. Tsuda, H. Nomura, F. Kataoka, T. Chiyoda, H. Tanaka, K. Tanaka, N. Susumu, D. Aoki Expression of hypoxia-inducible 2 (HIG2) protein in uterine cancer *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 32 (2011), pp. 146-149.
- 117) Tilghman, S. M. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 1999; 96:185-193.

- 118) Lord CC, Thomas G, Brown JM. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1831(4):792-802. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.01.002. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23328280; PMCID: PMC4765316.
- 119) Kaneko-Ishino T, Kuroiwa Y, Miyoshi N, Kohda T, Suzuki R, Yokoyama M, Viville S, Barton SC, Ishino F, Surani MA. Peg1/Mest imprinted gene on chromosome 6 identified by cDNA subtraction hybridization. *Nat Genet*. 1995 Sep;11(1):52-9. doi: 10.1038/ng0995-52. PMID: 7550314.
- 120) Ineson, J., Stayner, C., Hazlett, J., Slobbe, L., Robson, E., Legge, M. Somatic reactivation of expression of the silent maternal Mest allele and acquisition of normal reproductive behaviour in a colony of Peg1/Mest mutant mice. *J. Reprod. Dev.* 2012, 58, 490–500.
- 121) Imamura, T., Kerjean, A., Heams, T., Kupiec, J. J., Thenevin, C., and Pàldi, A. Dynamic CpG and non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 20171–20175. doi: 10.1074/jbc.M501749200.
- 122) Mesman S, van Hooft JA, Smidt MP. Mest/Peg1 Is Essential for the Development and Maintenance of a SNc Neuronal Subset. *Front Mol Neurosci*. 2017 Jan 13;9:166. doi: 10.3389/fnmol.2016.00166. PMID: 28133444; PMCID: PMC5233686.
- 123) Mesman, S., von Oerthel, L., and Smidt, M. P. Mesodiencephalic dopaminergic neuronal differentiation does not involve GLI2A-mediated SHH-signaling and is under the direct influence of canonical WNT signaling. *PLoS ONE*. 2014; 9:e97926. doi: 10.1371/journal.pone.0097926.
- 124) Pan Y, Wang X, Li Y, Yan P, Zhang H. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-503-3p inhibits progression of human endometrial cancer cells through downregulating

- MEST. *Cancer Gene Ther.* 2022 Jan 7. doi: 10.1038/s41417-021-00416-3. Epub ahead of print. PMID: 34997218.
- 125) Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol.* 2004 Aug;6(8):699-706. doi: 10.1038/ncb0804-699. PMID: 15303099.
- 126) Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 2001;114:2569–75.
- 127) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11–24.
- 128) Oshima RG, Baribault H, Caulín C. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:445–71.
- 129) Kulesh DA, Oshima RG. Cloning of the human keratin 18 gene and its expression in nonepithelial mouse cells. *Mol Cell Biol* 1988;8:1540–50.
- 130) Menon MB, Schwermann J, Singh AK, Franz-Wachtel M, Pabst O, Seidler U, et al p38 MAP kinase and MAPKAP kinases MK2/3 cooperatively phosphorylate epithelial keratins. *J Biol Chem* 2010;285:33242–51.
- 131) Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 2004;6:699–706.
- 132) Kumemura H, Harada M, Yanagimoto C, Koga H, Kawaguchi T, Hanada S, et al Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:33–40.
- 133) Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016 Jan 28;1:15004. doi: 10.1038/sigtrans.2015.4. PMID: 29263891; PMCID: PMC5661652.
- 134) Borchert GM, Lanier W, Davidson BL . RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097–1101.

- 135) Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051–4060.
- 136) Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA . Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318: 1931–1934.
- 137) Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K et al. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 604–611.
- 138) Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A . SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454: 56–61.
- 139) Kenny PJ. Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014 Sep;16(3):335-44. doi: 10.31887/DCNS.2014.16.3/pkenny. PMID: 25364284; PMCID: PMC4214176.
- 140) Esfandyari D, Idrissou BMG, Hennis K, Avramopoulos P, Dueck A, El-Battrawy I, Grüter L, Meier MA, Näger AC, Ramanujam D, Dorn T, Meitinger T, Hagl C, Milting H, Borggrefe M, Fenske S, Biel M, Dendorfer A, Sassi Y, Moretti A, Engelhardt S. MicroRNA-365 regulates human cardiac action potential duration. *Nat Commun.* 2022 Jan 11;13(1):220. doi: 10.1038/s41467-021-27856-7. PMID: 35017523; PMCID: PMC8752767.
- 141) Zhao J, Zhou Y, Guo M, Yue D, Chen C, Liang G, Xu L. MicroRNA-7: expression and function in brain physiological and pathological processes. *Cell Biosci.* 2020 Jun 10;10:77. doi: 10.1186/s13578-020-00436-w. PMID: 32537124; PMCID: PMC7288475.
- 142) He Y, Jiang X, Chen J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* 2014 Jul 24;33(30):3887-93. doi: 10.1038/onc.2013.346. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23955084.
- 143) Li X, Xu M, Ding L, Tang J. MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors. *J Cancer* 2019; 10(12):2836-2848. doi:10.7150/jca.31361.

- 144) Jia Z, Wang K, Zhang A, Wang G, Kang C, Han L, Pu P. miR-19a and miR-19b overexpression in gliomas. *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct;19(4):847-53. doi: 10.1007/s12253-013-9653-x. Epub 2013 Jul 4. PMID: 23824915.
- 145) Korać P, Antica M, Matulić M. MiR-7 in Cancer Development. *Biomedicines.* 2021 Mar 23;9(3):325. doi: 10.3390/biomedicines9030325. PMID: 33806891; PMCID: PMC8004586.
- 146) Sachdeva M, Mo YY. miR-145-mediated suppression of cell growth, invasion and metastasis. *Am J Transl Res.* 2010 Mar 25;2(2):170-80. PMID: 20407606; PMCID: PMC2855636.
- 147) Auf, G., Jabouille, A., Delugin, M., Guérit, S., Pineau, R., North, S., Platonova, N., Maitre, M., Favereaux, A., Seno, M., Bikfalvi, A., Minchenko, D., Minchenko, O., Moenner, M., 2013. High epiregulin expression in human U87 glioma cells relies on IRE1 α and promotes autocrine growth through EGF receptor. *BMC Cancer* 13, 597.
- 148) Minchenko OH, Khita OO, Rudnytska OV, Yefimova YV, Tsymbal DO, Minchenko DO, Sliusar MY, He Q, Liu K. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr Regul.* 2022 Apr 30;56(2):115-125. doi: 10.2478/enr-2022-0013. PMID: 35489050.
- 149) Simon M, Saez G, Muggiolu G, Lavenas M, Le Trequesser Q, Michelet C, Devès G, Barberet P, Chevet E, Dupuy D, Delville MH, Sez nec H. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity. *Nanotoxicology.* 2017 Feb;11(1):134-145. doi: 10.1080/17435390.2017.1278803. PMID: 28044465.
- 150) Hu H, Li L, Guo Q, Zong H, Yan Y, Yin Y, Wang Y, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. RNA sequencing analysis shows that titanium dioxide nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress, which has a central role in mediating plasma glucose in mice. *Nanotoxicology.* 2018 May;12(4):341-

356. doi: 10.1080/17435390.2018.1446560. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29510645.
- 151) Hu H, Li L, Guo Q, Zong H, Yan Y, Yin Y, Wang Y, Oh Y, Feng Y, Wu Q, Gu N. RNA sequencing analysis shows that titanium dioxide nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress, which has a central role in mediating plasma glucose in mice. *Nanotoxicology*. 2018 May;12(4):341-356. doi: 10.1080/17435390.2018.1446560. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29510645.
- 152) Wang HH, Wang YC, Wu DW, Hung CS, Chen CY, Lee H. Targeting insulin-like growth factor-binding protein-3 by microRNA-125b promotes tumor invasion and poor outcomes in non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2017 Apr;39(4):1010428317694316. doi: 10.1177/1010428317694316. PMID: 28378642.
- 153) Bai R, Cui Z, Ma Y, Wu Y, Wang N, Huang L, Yao Q, Sun J. The NF- κ B-modulated miR-19a-3p enhances malignancy of human ovarian cancer cells through inhibition of IGFBP-3 expression. *Mol Carcinog*. 2019 Dec;58(12):2254-2265. doi: 10.1002/mc.23113. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31513316.
- 154) Schroeder L, Herwartz C, Jordanovski D, Steger G. ZNF395 Is an Activator of a Subset of IFN-Stimulated Genes. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1248201. doi: 10.1155/2017/1248201. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28316371; PMCID: PMC5339479.
- 155) Minchenko OH, Tsymbal DO, Minchenko DO, Prylutska SV, Hnatiuk OS, Prylutskyi YI, Tsierkezos NG, Ritter U. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of genes associated with immune response in normal human astrocytes. *Toxicol In Vitro*. 2018 Oct;52:122-130. doi: 10.1016/j.tiv.2018.06.011. Epub 2018 Jun 12. PMID: 29906516.