

# ТЕОРЕТИЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 577.112.7:616

Мінченко Д.О.

## ЕФЕКТ ГІПОКСІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ мРНК BNIP-3, BAX, BID ТА BCL-2 У КЛІТИНАХ ГЛЮМИ ЛІНІЇ U87 ЗМІНЮЄТЬСЯ ПРИ БЛОКАДІ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА IRE-1

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (м. Київ);  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України (м. Київ)

**Резюме.** Гіпоксія є однією із характерних рис ішемії, що індукує комплекс внутрішньоклітинних сигналів шляхом порушення фолдингу протеїнів, які сприймаються сенсорною сигнальною системою залежного від інозитолу ензиму-1альфа (IRE-1альфа). Ми досліджували вплив гіпоксії на експресію мРНК BNIP-3, BAX, BID та BCL-2 у клітинах глюми лінії U87 та її залежність від експресії гена IRE-1альфа. Встановлено, що блокада гена IRE-1альфа у клітинах глюми лінії U87 призводить до суттєвого зниження експресії мРНК BAX, BAX-дельта та BID та до вираженого посилення експресії мРНК BNIP-3 і BCL-2, що кодують синтез важливих регуляторів апоптозу. Крім того, було показано, що гіпоксія значно посилює експресію мРНК BNIP-3 і знижує експресію мРНК BCL-2 у клітинах глюми лінії U87, але величина ефекту гіпоксії на експресію цих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа. Таким чином, результати даної роботи свідчать про суттєві зміни в експресії ряду апоптоз-регулюючих генів у клітинах глюми лінії U87 в умовах гіпоксії та при блокаді гена IRE-1альфа, причому величина ефекту гіпоксії на експресію досліджуваних апоптоз-регулюючих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа.

**Ключові слова:** клітини глюми U87, гіпоксія, апоптоз, експресія генів, IRE-1, BNIP-3, BAX, BID, BCL-2.

Гіпоксія є однією із характерних рис злокісних пухлин, вона значною мірою визначає інтенсивність їх росту. Якщо роль індукуемого гіпоксією транскрипційного фактора HIF в рості злокісних пухлин достатньо добре вивчена, то роль додаткових механізмів ще недостатньо з'ясована [1–5]. Відомо, що умовах гіпоксії, коли має місце не лише дефіцит кисню, а і ATP, у клітинах індукується адаптивна реакція для виживання клітин, що представляє собою комплекс внутрішньоклітинних сигнальних подій на порушення згортання (фолдингу) протеїнів (Unfolded Protein Response; UPR) і їх накопичення у ендоплазматичному ретикулумі, які сприймаються трьома сенсорними сигнальними системами: активуючого транскрипційного фактора 6 (ATF6), протейніказою ендоплазматичного ретикулуму (PERP) та залежного від інозитолу ензиму-1альфа (IRE-1альфа), який має ще одну назву – сигнальний фактор ендоплазматичний ретикулум-ядро (ERN-1) [6–8].

Найбільш важливою, ключовою сигнальною системою є IRE-1альфа, трансмембраний протеїн, N-кінцева сенсорна частина якого знахо-

диться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, а C-кінцева частина – у цитоплазмі [9, 10]. Вона має дві каталітичні ділянки, серин/тронін кіназну та ендорибонуклеазну, які є складовими IRE-1 сигналювання. Сенсорно-сигнальний ензим IRE-1альфа є не лише сензором стресу ендоплазматичного ретикулуму, а і медіатором порушення фолдингу протеїнів.

Встановлено, що зв'язування неправильно згорнутих протеїнів з сенсорною ділянкою IRE-1альфа ініціює його димеризацію та активацію серин/тронін кінази, причому саме серин/тронін кіназа відповідає за аутофосфорилювання та димеризацію даного ензиму [10, 11]. Димеризація IRE-1альфа є надзвичайно важливим етапом в активації сигнальної системи IRE-1альфа, що приводить до змін в JNK-сигналюванні та індукує ендорибонуклеазний домен IRE-1, а це, в свою чергу, ініціює сплайсинг пре-мРНК XBP1 (Х-бокс зв'язуючого протеїну), а також деградацію ряду мРНК [11, 12].

Ізоформа XBP1 мРНК, що експресується у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму,

кодує синтез меншого за розміром транскрипційного фактора, який змінює експресію великої групи специфічних генів, що контролюють фолдинг протеїнів та посилюють виживання клітин в умовах гіпоксії або знищують їх, посилюючи апоптоз [13, 14]. Недавно було показано, що XBPI має сайти зв'язування в промоторних ділянках великої групи генів [15]. Разом з тим, є дані, що інгібітор кінази активує ендорибонуклеазну активність IRE1alpha для захисту клітин в умовах стресу ендоплазматичного ретикулуму [16]. Встановлено, що IRE1альфа сигнальний каскад є важливим для індукованої ішемією експресії ендотеліального фактора росту судин А (VEGFA) і вносить свій вклад в ангіогенез та ріст злокісних пухлин *in vivo* [17].

Недавно були виявлені мутації гена IRE1 у злокісних пухлинах людини, що вказує на його важливість у контролі росту пухлин, включаючи гліоми, серед багатьох інших протеїнкіназ [18]. Дослідження на двох експериментальних моделях пухлин (імплантация пухлини в мозок мишів та в ембріоні курчат) показали, що IRE1 сигнальний шлях пов'язаний з процесом неоваскуляризації і росту пухлин, а також тісно пов'язаний з процесом смерті клітин [17, 19].

Всі три сигнальні системи стресу ендоплазматичного ретикулуму представлені трансмембраними протеїнами, що здатні зв'язувати неправильно згорнуті протеїни та шаперон BiP (GRP78, HSPA5) своєю сенсорною частиною, що знаходиться в люмені ендоплазматичного ретикулуму, а в цитозольній частині цих сенсорів генеруються сигнали, що передаються до ядра і опосередковують відповідь клітини на стрес, яка може бути направлена як на виживання клітин, так і на їх загибель шляхом апоптозу [8, 10, 12, 20]. Було також показано, що експресія шаперону GRP78 посилюється у відповідь на стрес ендоплазматичного ретикулуму [14]. Всі три сигнальні системи, що реагують на різні види стресу ендоплазматичного ретикулуму не є ізольованими, вони тісно взаємодіють між собою, оскільки їх функціональна роль є спільною і полягає у зміні метаболізму клітини з метою її адаптації до умов стресу або знищення клітини. Разом з тим, стрес ендоплазматичного ретикулуму є одним із факторів, що забезпечує виживання клітин злокісних пухлин в умовах гіпоксії та активує ріст пухлин [5, 8, 9, 11, 17].

Група апоптоз-контролюючих генів є досить чисельною, але у даній роботі ми дослідили експресію чотирьох про-апоптотичних (BNIP-3, BAX, BAXдельта та BID) і одного анти-апоптотичного (BCL2) гена. BNIP-3 (BCL2adenovirus E1B

19kD-interacting protein 3) та BID (BH3 interacting domain death agonist) досліджені в значно меншій мірі, порівняно з BAX (BCL2-associated X protein) та BCL-2 (B-cell CLLlymphoma 2) [21–24]. Недавно було показано, що BNIP3 може ініціювати різні сигнальні шляхи смерті клітин в ендоплазматичному ретикулумі та в мітохондріях, оскільки він має подвійну субклітинну локалізацію [22].

Оскільки роль генів, регулюючих апоптоз, у функціонуванні сигнального шляху інозитол-залежного синтиму-1альфа детально не досліджувалась, то метою даної роботи було вивчення ролі ряду апоптоз-регулюючих генів (BNIP-3, BAX, BAXдельта, BID та BCL-2) у функціонуванні IRE-1-сигнального шляху в клітинах гліоми, найбільш злокісних пухлинах мозку, що дуже тяжко піддаються лікуванню і є найбільшою проблемою антипухлинної терапії.

#### Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено на сублінії клітин гліоми лінії U87 з пригніченою експресією гена IRE-1альфа, яку було отримано в результаті селекції клонів, стабільно трансфекованих домінант-негативною конструкцією IRE-1альфа у векторі pcDNA3.1+. У якості контролю були використані клітини, стабільно трансфековані експресійним еукаріотичним вектором pcDNA3.1+. Клітини були отримані від проф. Моне (Франція) [17]. Ростили клітини у середовищі DMEM, як описано M. Moenner et al. [17]. При дослідженні впливу гіпоксії, клітини гліоми витримували протягом шести годин в інкубаторі, у якому підтримували концентрацію кисню та діоксиду вуглецю на рівні 3 та 5 %, відповідно.

Виділення РНК. РНК із клітин гліоми виділяли за допомогою реагенту Trizol (Trizol; Invitrogen, США) згідно протоколу виробника, як описано раніше [25]. Осаджували РНК рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали дівочі 75 % етанолом і розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз.

Аналіз експресії мРНК BNIP-3, BAX, BAXдельта, BID і BCL-2. Експресію мРНК BNIP-3, BAX, BAXдельта, BID і BCL-2 досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі), яку проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycler" (США), використовуючи SYBRGreen Mix (AB gene, Epson, Великобританія). Для цього тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) з допомогою набору "QuantiTect Reverse Transcription" (QIAGEN, Німеччина), який забезпечував елімінацію мож-

ливих залишків геномної ДНК. Для цього 1 мкг РНК спочатку короткочасно (протягом 2 хвилин) інкубували з буфером gDNA Wipeout, а потім з Quantiscript зворотною транскриптацією в присутності суміші праймерів (Primers mix) та буферу, що уже містив інгібітор рибонуклеаз і набір чотирьох дезоксирибонуклеотидів при 42°C протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняли прогріванням реакційної суміші при 95°C протягом 3 хвилин і отриману кДНК використовували для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Для проведення полімеразної ланцюгової реакції були використані такі пари праймерів: для BNIP3 5'- CTGACTGCATCCTTAGCTG -3' і 5'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -3', які відповідали нуклеотидним послідовностям 287–306 та 508–489 опублікованої кДНК BNIP3 людини (GenBank номер NM\_004052); для BAX 5'- CTGACT -3' і 3'-CAAGATG -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 7–306 та 508–489 кДНК BAX людини (GenBank номер NM\_004324); для BAXдельта 5'- CTGAC -3' і 3'-CAAGAT -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2–306 та 51–489 кДНК BAXдельта людини (GenBank номер U19599); для BID 5'- CTGAC -3' і 3'-CAAGAT -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2–2 та 5–489 опублікованої кДНК BID людини (GenBank номер NM\_001196) і для BCL-2 5'- CTGA -3' і 3'-CAAGAT -5', які відповідали нуклеотидним послідовностям 2–306 та 5–489 опублікованої кДНК BCL-2 людини (GenBank номер NM\_000633).

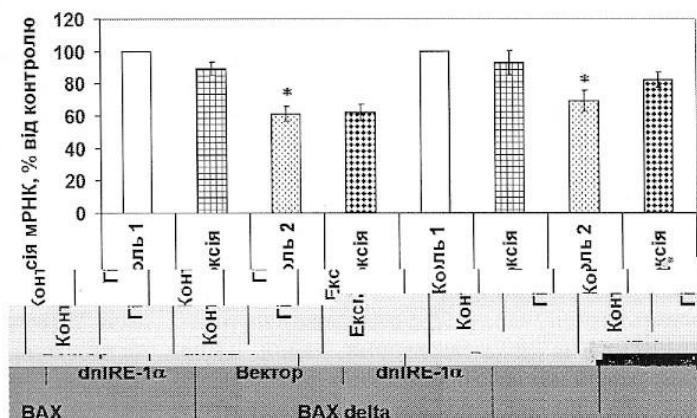
Відносну кількість транскриптів BNIP-3, BAX, BAXдельта, BID і BCL-2 розраховували по кількості транскриптів бета-актину. Для ампліфікації бета-актину використовували наступні праймери: прямий – 5'- GGACTTC-GAGCAAGAGATGG -3' та зворотний – 5'- AGCACTGTGTTG-GCGTACAG -3'.

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції використовували по три незалежно виділених препарати РНК. Аналіз результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator" а статистичний аналіз – в Excel програмі.

### Результати дослідження та їх обговорення

Як видно із даних, приведених на рисунку 1, експресія мРНК про-апоптичних генів BAX та BAXдельта по даним кількісної полімеразної ланцюгової реакції суттєво знижується (на 39 та 31 %, відповідно) у сублінії клітин гліоми з заблокованим геном IRE-1альфа, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфековані еукаріотичним експресійним вектором pcDNA3.1+ без вставки. Разом з тим, не було виявлено суттєвих змін в експресії генів BAX та BAXдельта в клітинах, що знаходилися протягом шести годин в умовах гіпоксії, і ефект гіпоксії не проявлявся як у контрольних клітинах, так і при блокаді експресії гена IRE-1альфа.

На рисунку 2 приведено результати дослідження впливу гіпоксії на експресію генів методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі у клітинах гліоми лінії U87 в залежності від рівня експресії гена IRE-1альфа. Встановлено, що експресія мРНК BID суттєво не змінюється в умовах гіпоксії як у контрольних клітинах, так і при блокаді експресії гена IRE-1альфа, але знижується (на 34%) у клітинах з виключеним геном IRE-1альфа, порівняно з контрольними клітинами, трансфектованими вектором. У той же час, експресія гена BCL-2 суттєво посилюється (на



**Рис. 1.** Вплив гіпоксії на експресію мРНК BAX та BAXдельта у клітинах гліоми лінії U87, трансфектованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфектованих домінант/негативною конструкцією інозитом-залежного ензиму-1альфа (dnIRE-1 $\alpha$ ) у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (у реальному часі). Величину експресії мРНК BAX та BAXдельта нормалізували по експресії бета-актину; n = 3. У цьому та наступних рисунках: Контроль 1 – клітини, трансфековані вектором pcDNA3.1; Контроль 2 – клітини, трансфековані dnIRE-1 $\alpha$ ; \* - P < 0,05 у порівнянні з контролем 1, а \*\* - P < 0,05 у порівнянні з контролем 2.

75%) у клітинах з виключеним геном IRE-Іальфа, якщо порівнювати з контрольними клітинами (рисунок 2). В умовах гіпоксії експресія гена BCL-2 суттєво в клітинах, трансфектованих вектором, але майже вдвічі пригнічується при блокаді експресії гена IRE-Іальфа.

Із даних, приведених на рисунку 3, видно, що експресія мРНК про-апоптичного гена BNIP3 по даним кількісної полімеразної ланцюгової реакції різко посилюється (в 3,4 рази) у сублінії U87 клітин гліоми із заблокованим геном IRE-Іальфа, порівняно з контрольними клітинами, які були трансфековані еукаріотичним експресійним вектором pcDNA3.1+. Більше того, експресія мРНК BNIP3 у клітинах, що знаходилися протягом шести годин в умовах гіпоксії, також різко (у 4 рази) посилювалась у контрольних (трансфектованих вектором) клітинах, але у клітинах з виключеною експресією гена IRE-Іальфа ефект гіпоксії на експресію мРНК BNIP3 був значно меншим (+ 23 %) у порівнянні з контролем 2, хоча у абсолютних величинах він був навіть дещо більшим, ніж у трансформованих вектором клітинах в умовах гіпоксії (рисунок 3).

Таким чином, експресія мРНК про-апоптичних генів BAX, BAXдельта та BID суттєво не змінюється в умовах гіпоксії, але при блокаді експресії гена IRE-Іальфа – знижується майже в рівній мірі, що вказує на залежність експресії цих генів від функціонування IRE-Іальфа сигнальної системи BCL-2 BNIP3 по клітинах, так і при блокаді експресії гена. Відсутність змін в експресії цих про-апоптичних генів в умовах гіпоксії у наших дослідах можна пояснити відносно високим рівнем кисню (3 %) порівняно з тим (< 0,1 %), що індукує апоптоз [5], а зниження експресії гена BID узгоджується з даними літератури про наявність сайту зв'язування транскрипційного фактора XBPI у промоторній зоні гена BID [15]. Можна припустити, що стрес ендоплазматичного ретикулуму, що спостерігається при нашій моделі гіпоксії, індукував сигнальні шляхи, направлені на адаптацію клітин до умов гіпоксії та їх виживання. Наявних на даний час даних про функціональну роль BNIP3 в сенсорних сигналь-

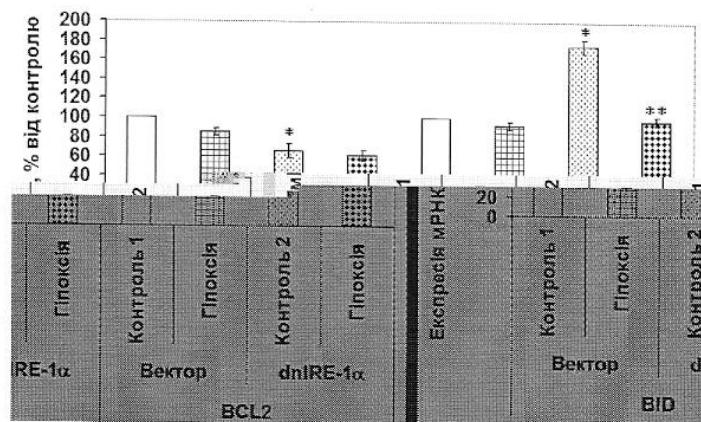


Рис. 2. Вплив гіпоксії на експресію мРНК BID та BCL-2 у клітинах гліоми лінії U87, трансфектованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфектованих домінант/негативною конструкцією інозитом-залежного ензиму-Іальфа (dnIRE-1a) у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Величину експресії мРНК BID та BCL-2 нормалізували по експресії бета-актину;  $n = 3$

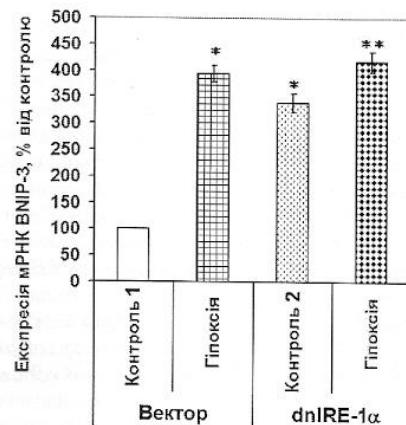


Рис. 3. Вплив гіпоксії на експресію мРНК BNIP-3 у клітинах гліоми лінії U87, трансфектованих вектором pcDNA3.1 (Вектор) та сублінії цих клітин, трансфектованих домінант/негативною конструкцією інозитом-залежного ензиму-Іальфа (dnIRE-1a) у векторі pcDNA3.1, яку визначали з допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Величину експресії мРНК BNIP-3 нормалізували по експресії бета-актину;  $n = 3$

них системах стресу ендоплазматичного ретикулуму та апоптозі ще недостатньо для того, щоб говорити про значення змін в експресії BNIP3, що були наведені вище.

Результати даної роботи переконливо свідчать про суттєві зміни в експресії ряду генів, що регу-

люють апоптоз, у клітинах гліоми лінії U87 в умовах гіпоксії та при блокаді гена IRE-1альфа, причому величина ефекту гіпоксії на експресію деяких із цих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа. Ці принципово нові дані щодо залежності змін в експресії ряду апоптоз-регулюючих генів від функції гена IRE-1альфа заслуговують на подальше поглиблене дослідження з метою пошуку можливих терапевтичних мішень для селективного блокування про-пухлинної активності IRE1 шляхом дизайну специфічних інгібіторів росту злойкісних пухлин.

#### Висновки

1. Встановлено, що блокада гена IRE-1альфа у клітинах гліоми лінії U87 призводить до суттєвого зниження експресії важливих про-апоптичних генів BAX, BAXдельта і BID.

2. Показано, що блокада гена IRE-1альфа суттєво посилює експресію мРНК BNIP-3 і BCL-2, що кодують синтез важливих регуляторів апоптозу, у клітинах гліоми лінії U87.

3. Встановлено, що гіпоксія значно посилює експресію мРНК BNIP-3 і знижує експресію мРНК BCL-2 у клітинах гліоми лінії U87, але величина ефекту гіпоксії на експресію цих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа.

## ЕФФЕКТ ГІПОКСІИ НА ЕКСПРЕССІЮ мРНК BNIP-3, BAX, BID И BCL-2 В КЛЕТКАХ ГЛІОМЫ ЛІНИИ U87 ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ БЛОКАДЕ ЕКСПРЕССІИ ГЕНА IRE-1

Минченко Д.А.

**Резюме.** Гіпоксія являється одним із характерних признаків ішемії, що веде до індукції комплекса внутріклеточних сигналів путем нарушения фолдинга протеїнов, які відповідають за сенсорний сигналний системій зависімого від інозитола ензима-1альфа (IRE-1альфа). Ми досліджували вплив гіпоксії на експресію мРНК BNIP-3, BAX, BID і BCL-2 в клітинах глюоми лінії U87 та її залежність від експресії гена IRE-1альфа. Установлено, що блокада гена IRE-1альфа в клітинах глюоми лінії U87 приводить до суттєвому зниженню експресії мРНК BAX, BAXдельта і BID і до вираженному усиленню експресії мРНК BNIP-3 і BCL-2, які кодують синтез важливих регуляторів апоптозу. Крім того, було показано, що гіпоксія значително усилує експресію мРНК BNIP-3 і знижує експресію мРНК BCL-2 в клітинах глюоми лінії U87, але величина ефекта гіпоксії на експресію цих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа. Таким чином, результати цієї роботи свідчать про те, що відбуваються значущі зміни в експресії мРНК ряду апоптоз-регулюючих генів в клітинах глюоми лінії U87 в умовах гіпоксії та при блокаді гена IRE-1альфа, причому величина ефекта гіпоксії на експресію дослідженіх апоптоз-регулюючих генів суттєво залежить від функції гена IRE-1альфа.

**Ключові слова:** клітини глюоми, гіпоксія, ішемія, апоптоз, експресія генів, IRE-1, BNIP-3, BAX, BID, BCL-2.

## EFFECT OF HYPOXIA ON BNIP-3, BAX, BID?AND BCL-2 mRNA EXPRESSION IN GLIOMA CELL LINE U87 IS CHANGED IN BLOCKADE OF IRE-1 GENE EXPRESSION

Minchenko D.O.

**Abstract.** Hypoxia is an essential features of ischemia, have been shown to induce a set of complex intracellular signaling events known as the unfolded protein response which is mediated by inositol requiring enzyme-1 (IRE-1). We studied effect of hypoxia on the expression of BNIP-3, BAX, BID and BCL-2 mRNA in U87 glioma cells and its dependence from IRE-1alpha signaling enzyme expression. It was shown that blockade of IRE-1 gene expression in glioma cell line U87 is significantly changed the expression of important apoptosis regulators: decreased the expression of BAX, BAXdelta and BID mRNA, but increased BNIP-3 and BCL-2 mRNA expression. Hypoxia significantly induces expression of BNIP-3 mRNA and decreases BCL-2 mRNA expression in glioma cell line U87, however, effect of hypoxia on the expression of these mRNA depends from IRE-1alpha gene expression. Thus, results of this investigation clearly demonstrated that expression of several apoptosis regulated genes depends from hypoxia and IRE-1alpha expression and that effect of hypoxia on some apoptosis regulated genes is modulated by IRE-1alpha.

**Key words:** glioma cells U87, hypoxia, apoptosis, gene expression, IRE-1, BNIP-3, BAX, BID, BCL-2.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // *Mutat. Res.* - 2008. - Vol. 640. - P. 174 - 179.
2. Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour // *Nature Reviews Cancer.* - 2008. - Vol. 8. - P. 705 - 713.
3. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription // *Mutat. Res.* - 2008. - Vol. 640. - P. 174 - 179.
4. Brahimi-Horn M.C., Chiche J., Pouyssgur J. Hypoxia and cancer // *J. Mol. Med.* - 2007. - Vol. 85, N 12. - P. 1301-1307.
5. Bi M., Naczki C., Koritzinsky M., Fels D., Blais J., Hu N., Harding H., Novoa I., Varia M., Raleigh J., Scheuner D., Kaufman R.J., Bell J., Ron D., Wouters B.G., Koumenis C. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth // *EMBO J.* - 2005. - 24, N 19. - P. 3470-3481.
6. Blais J.D., Filipenko V., Bi M., Ron D., Koumenis C., Wouters B.G., Bell J.C. Transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress // *Mol. Cell. Biol.* - 2004. - 24. - P. 7469 - 7482.
7. Aragon T., van Anken E., Pincus D., Serafimova I.M., Korennykh A.V., Rubio C.A., Walter P. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites // *Nature.* - 2009. - 457, N 7230. - P. 736 - 740.
8. Fels D.R., Koumenis C. The PERK/eIF2a/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth // *Cancer Biology & Therapy.* - 2006. - 5, N 7. - P. 723 - 728.
9. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer // *Cancer Res.* 2007. - 67, N 22. - P. 10631 - 10634.
10. Korennykh A.V., Egea P.F., Korostelev A.A., Finer-Moore J., Zhang C., Shokat K.M., Stroud R.M., Walter P. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1 // *Nature.* - 2009. - 457, N 7230. - P. 687 - 693.
11. Romero-Ramirez L., Cao H., Nelson D., Hammond E., Lee A.H., Yoshida H., Mori K., Glimcher L.H., Denko N.C., Giaccia A.J., Le Q.-T., Koong A.C. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth // *Cancer Res.* - 2004. - 64. - P. 5943 - 5947.
12. Hollien J., Lin J.H., Li H., Stevens N., Walter P., Weissman J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells // *J. Cell. Biol.* - 2009. - 186, N 3. - P. 323 - 331.
13. Lin J.H., Li H., Yasumura D., Cohen H.R., Zhang C., Panning B., Shokat K.M., Lavail M.M., Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response // *Science.* - 2007. - 318. - P. 944 - 949.
14. Guan D., Xu Y., Yang M., Wang H., Wang X., Shen Z. N-acetyl cysteine and penicillamine induce apoptosis via the ER stress response-signaling pathway // *Mol. Carcinog.* - 2010. - 49, N 1. - P. 68 - 74.
15. Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A., Tsikitis M., Lents N.H., Arias C., Lennon C.J., Kluger Y., Dynlacht D.D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks // *Molecular Cell.* - 2007. - 27. - P. 53 - 66.
16. Han D., Upton J.-P., Hagen A., Callahan J., Oakes S.A., Papa F.R. A kinase inhibitor activates the IRE1alpha RNase to confer cytoprotection against ER stress // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - 365. - P. 777 - 783.
17. Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., Bouchecareilh M., Pineau R., Nalbantoglu J., Kaufman R.J., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo // *Cancer Res.* - 2007. - 67. - P. 6700-6707.
18. Greenman C., Stephans P., Smith R., Dalgleish G.L., Hunter C. et al. Patterns of somatic mutation in human genomes // *Nature.* - 2007. - 446. - P. 153 - 158.
19. Hetz C., Glimcher L.H. Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1alpha interactome // *Mol. Cell.* - 2009. - 35, N 9. - P. 551 - 561.
20. DuRose J.B., Tam A.B., Niwa M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress // *Mol. Biol. Cell.* - 2006. - 17. - P. 3095-3107.
21. Farrall A.L., Whitelaw M.L. The HIF1alpha-inducible pro-cell death gene BNIP3 is a novel target of SIM2s repression through cross-talk on the hypoxia response element // *Oncogene.* - 2009. - 28, N 41. - P. 3671 - 3680.
22. Zhang L., Li L., Liu H., Borowitz J.L., Isom G.E. BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion // *FASEB J.* - 2009. - 23, N 10. - P. 3405-3414.
23. Haddad J.J. The role of Bax/Bcl-2 and pro-caspase peptides in hypoxia/reperfusion-dependent regulation of MAPK(ERK): discordant proteomic effect of MAPK(p38) // *Protein Pept. Lett.* - 2007. - 14, N 4. - P. 361 - 371.
24. Oh J.M., Kim S.H., Cho E.A., Song Y.S., Kim W.H., Juhnn Y.S. Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells // *Carcinogenesis.* - 2010. - 31, N 3. - P. 402 - 410.
25. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Ochiai A., Minchenko D.O., Esumi H. Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation // *Mol. Cell. Biochem.* - 2005. - 280, N 1-2. - P. 227 - 234.