

Ингибирование гексокиназы 2 приводит к снижению экспрессии ферментов гликолиза PFKP, BPGM и GPI в клеточной линии RKO

М.С. Федорова¹, И.Ю. Карпова¹, А.В. Липатова¹, Е.А. Пудова¹, З.Г. Гуватова¹, Д.В. Кочетков¹, А.В. Чайка², Б.Я. Алексеев², М.В. Киселева², А.Д. Каприн², А.В. Кудрявцева^{1,2}, А.В. Снежкина¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Колоректальный рак (КРР) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире, характеризующееся высоким уровнем смертности. Изучение ключевых аспектов формирования и прогрессии КРР необходимо для разработки новых подходов к его терапии, а также поиска новых диагностических, прогностических и предиктивных биомаркеров. Для многих видов опухолей важным изменением метаболизма является активация гликолиза, ассоциированная с нарушением экспрессии основных ферментов, принимающих участие в этом процессе, и регуляторных молекул. Чаще всего в опухолевых клетках наблюдается повышение экспрессии гексокиназы 2 (HK2), что делает ее многообещающей мишенью для таргетной терапии. В модифицированной нами клеточной линии RKO, постоянно экспрессирующей короткие шпилечные РНК для ингибирования гексокиназы 2, проведен количественный анализ экспрессии 15 генов (*GAPDH*, *ADPGK*, *ALDOA*, *ENO3*, *PFKL*, *PGK1*, *PGAM1*, *PKM2*, *ENO1*, *PDK1*, *PDK3*, *PFKP*, *ENO2*, *GPI* и *BPGM*), кодирующих ключевые ферменты гликолиза, а также гена *HIF1A*. Выявлено значительное снижение экспрессии генов *PFKP*, *BPGM* и *GPI* на уровне мРНК (в 5, 86 и 93 раза соответственно) и белка (в 2.5, 3.5 и 19 раз соответственно). Вероятно, снижение экспрессии *GPI* и *PFKP* связано с уменьшением количества их субстратов, глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата, при подавлении гексокиназы 2. Однако вопрос о причинах снижения уровня мРНК этих трех ферментов при одновременном сохранении уровня экспрессии других участников гликолиза требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: колоректальный рак; shRNA; кПЦР; Вестерн-блот; гликолиз; эффект Варбурга; HK2.

Knockdown of hexokinase 2 results in a decreased expression level of the glycolytic enzymes PFKP, BPGM, and GPI in RKO cell line

M.S. Fedorova¹, I.Y. Karpova¹, A.V. Lipatova¹, E.A. Pudova¹, Z.G. Guvatova¹, D.V. Kochetkov¹, A.V. Chaika², B.Y. Alekseev², M.V. Kiseleva², A.D. Kaprin², A.V. Kudryavtseva^{1,2}, A.V. Snezhkina¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

² National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant neoplasms in the world, and is characterized by a high mortality rate. The study of the key aspects of colorectal cancer formation and progression is necessary to develop new approaches to its therapy, as well as to search for new diagnostic, prognostic and predictive biomarkers of CRC. In many types of tumors, one of the key changes in metabolism is the activation of glycolysis, which is associated with alterations in the expression of the main glycolytic enzymes and regulatory molecules. There is often an increase in hexokinase 2 (HK2) exogenous expression in tumor cells, which makes it a promising target for anticancer therapy. Quantitative expression analysis of 15 genes (*GAPDH*, *ADPGK*, *ALDOA*, *ENO3*, *PFKL*, *PGK1*, *PGAM1*, *PKM2*, *ENO1*, *PDK1*, *PDK3*, *PFKP*, *ENO2*, *GPI*, and *BPGM*), encoding the key glycolysis enzymes, as well as *HIF1A* gene was carried out in a modified RKO cell line, which constantly expresses the short hairpin RNA (shRNA) for the inhibition of hexokinase 2. A significant decrease in the expression of *PFKP*, *BPGM*, and *GPI* genes both at the mRNA (5-, 86-, and 93-fold, respectively) and protein (2.5-, 3.5-, and 19-fold, respectively) levels was revealed. Probably, the downregulation of *GPI* and *PFKP* is associated with a decrease in the amount of their substrates, glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate, under the inhibition of hexokinase 2. Nevertheless, the cause of a decreased mRNA level of these three enzymes, while the expression level of other glycolytic participants is constant, requires further investigation.

Key words: colorectal cancer; shRNA; qPCR; Western blot; glycolysis; Warburg effect; HK2.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Федорова М.С., Карпова И.Ю., Липатова А.В., Пудова Е.А., Гуватова З.Г., Кочетков Д.В., Чайка А.В., Алексеев Б.Я., Киселева М.В., Каприн А.Д., Кудрявцева А.В., Снежкина А.В. Ингибирование гексокиназы 2 приводит к снижению экспрессии ферментов гликолиза PFKP, BPGM и GPI в клеточной линии RKO. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):932-936. DOI 10.18699/VJ17.315

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Fedorova M.S., Karpova I.Y., Lipatova A.V., Pudova E.A., Guvatova Z.G., Kochetkov D.V., Chaika A.V., Alekseev B.Y., Kiseleva M.V., Kaprin A.D., Kudryavtseva A.V., Snezhkina A.V. Knockdown of hexokinase 2 results in a decreased expression level of the glycolytic enzymes PFKP, BPGM, and GPI in RKO cell line. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):932-936. DOI 10.18699/VJ17.315 (in Russian)

Received 10.09.2017

Accepted for publication 27.11.2017

© AUTHORS, 2017

M.S. Fedorova and I.Y. Karpova equal contribution to manuscript preparation.

e-mail: rhizamoeba@mail.ru

Колоректальный рак (КРР) – наиболее распространенное новообразование и вторая ведущая причина смертности от рака во всем мире (Siegel et al., 2017). Это заболевание может долгое время протекать бессимптомно – на момент постановки диагноза около 25 % больных имеют отдаленные метастазы. При этом пятилетняя выживаемость пациентов с метастатическим КРР составляет менее 10 %. Необходимо развитие новых методов терапии данного заболевания, а также поиск новых биомаркеров для ранней диагностики, прогнозирования течения заболевания и персонализированного подбора лекарственных средств.

Для КРР характерны множественные генетические и эпигенетические нарушения, возникающие в ходе образования и развития опухоли (Haraldson et al., 2012; Kudryavtseva et al., 2016c). Одним из ключевых событий при развитии КРР является перестройка энергетического обмена клеток (Snezhkina et al., 2016; Graziano et al., 2017). Активная пролиферация и быстрый рост опухолевых клеток, находящихся в условиях гипоксии, требуют большого запаса энергии и строительных ресурсов, которые образуются на различных этапах гликолиза. При этом усиливается транспорт глюкозы в клетки и увеличивается скорость образования лактата. Однако даже при последующей васкуляризации опухоли и появлении кислорода в достаточном количестве клетки продолжают использовать гликолиз в качестве основного источника энергии (эффект Варбурга) (Warburg, 1956; Krasnov et al., 2013b; Kudryavtseva et al., 2016b).

Активация гликолиза происходит в злокачественных клетках настолько часто, что многие исследователи рассматривают ферменты, принимающие участие в этом процессе, как многообещающие мишени для таргетной терапии. Однако при выборе такой мишени и предварительной оценке возможности ее использования необходимо выявить все изменения в клетке, которые могут быть вызваны воздействием на нее. Прежде всего, следует определить нарушения экспрессии генов при экспериментальном подавлении на моделях *in vitro*.

В данной работе проведен количественный анализ экспрессии 15 генов (*GAPDH*, *ADPGK*, *ALDOA*, *ENO3*, *PFKL*, *PGK1*, *PGAM1*, *PKM2*, *ENO1*, *PDK1*, *PDK3*, *PFKP*, *ENO2*, *GPI* и *BPGM*), продукты которых являются ключевыми ферментами гликолиза, и гена *HIF1A*, кодирующего индуцируемый гипоксией фактор 1A, в условиях ингибирования экспрессии гена *HK2* в клеточной линии карциномы толстой кишки RKO. Для генов с изменением экспрессии на уровне мРНК проведена также оценка уровня экспрессии белка методом Вестерн-блот.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования. Использована клеточная линия карциномы толстой кишки RKO, полученная из лаборатории пролиферации клеток Института молекулярной биологии РАН под руководством П.М. Чумакова. Клеточную линию RKO культивировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), 100 ед/мл пенициллина (ПанЭко) и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко) при влажности 95 %, темпера-

туре 37 °С, а также в условиях содержания углекислого газа на уровне 5 %.

Создание лентивирусных конструкций и получение стабильной линии клеток. Для получения стабильной клеточной линии RKO с подавленной экспрессией гена *HK2* созданы конструкции лентивирусного вектора pLSLP, экспрессирующие короткие шпилечные РНК (shRNA) (Kudryavtseva et al., 2016a). Трансдукцию проводили в четырех повторях. После лентивирусной трансдукции фракции клеток с интегрированной конструкцией выделяли путем селекции на среде с пуромицином (2 мкг/мл) (Thermo Fisher Scientific) в течение пяти дней. Степень подавления *HK2* определяли с помощью методов количественной ПЦР (кПЦР) и Вестерн-блота.

Выделение РНК и белка. Выделение тотальной РНК и белка из клеточной линии RKO проводили с использованием набора AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Количество выделенных РНК и белка оценивали с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Очищенные препараты РНК хранили при температуре –80 °С, препараты белка – при температуре –20 °С.

Получение кДНК. Выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием ревертазы M-MuLV (Thermo Fisher Scientific) и набора случайных гексануклеотидов.

Метод количественной ПЦР (кПЦР). Для количественной оценки уровня мРНК целевых генов методом кПЦР использованы коммерческие наборы праймеров и проб TaqMan Gene Expression Assay (*HK2*: Hs00606086_m1; *HIF1A*: Hs00153153_m1; *ADPGK*: Hs00229849_m1; *PFKP*: Hs00242993_m1; *GAPDH*: Hs02758991_g1; *PDK1*: Hs01561850_m1; *PDK3*: Hs00178440_m1; *ENO1*: Hs00361415_m1; *GPI*: Hs00976711_m1; *ENO3*: Hs01093275_m1; *PKM2*: Hs00762869_s1; *PFKL*: Hs00160027_m1; *PGAM1*: Hs01652468_g1; *BPGM*: Hs00156139_m1; *PGK1*: Hs00943178_g1; *ENO2*: Hs00157360_m1; *ALDOA*: Hs00605108_g1) (Thermo Fisher Scientific). В качестве эндогенного контроля выбраны гены *RPN1* и *GUSB*. Ранее нами показана возможность их использования для транскриптомных исследований колоректального рака (Krasnov et al., 2015). Каждую реакцию ПЦР проводили в трех повторях на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) по протоколу, описанному в работе (Snezhkina et al., 2016).

Данные кПЦР обрабатывали при помощи оригинального программного приложения АТГ (Melnikova et al., 2016). Относительный уровень мРНК оценивали методом относительных измерений ($\Delta\Delta C_t$ -метод) с учетом эффективности реакций, как описано ранее (Dmitriev et al., 2016).

Разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ) и Вестерн-блот. Электрофорез белков осуществляли в ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Для отмывки геля от лаурилсульфата натрия (SDS) использовали трис-глицериновый буфер, содержащий 10 % метанола. Затем гель перенесли на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) (Millipore, США). Мембрану промывали буферным раствором (TBS), содержащим 0.1 % Твин 20, и блокировали в 3 % бычьего

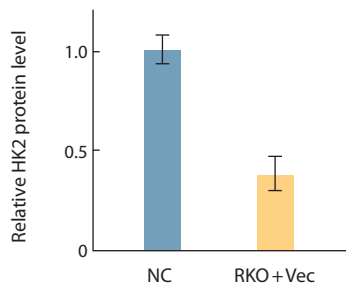


Fig. 1. Expression of *HK2* in RKO cells after the application of the lentiviral vector carrying shRNA.

NC, negative control, Vec, lentiviral vector pLSLP carrying shRNA; $p < 0.05$.

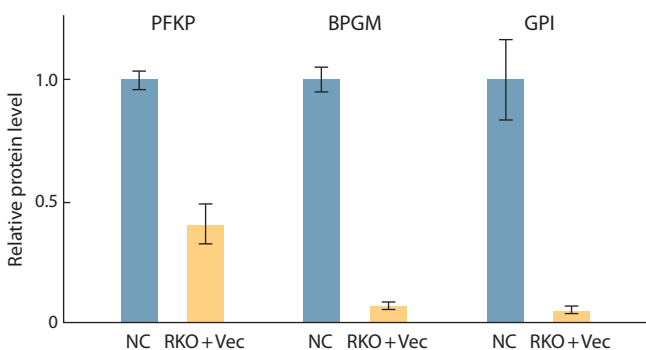


Fig. 2. Expression of PFKP, GPI, and BPGM in RKO cells with repressed *HK2* expression.

Designations follow fig. 1.

сывороточного альбумина (BSA) в TBS, содержащем 0.1 % Твин 20 в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами в течение 10–16 ч при 4 °С, затем ее три раза отмывали в TBS, содержащем 0.1 % Твин-20. После отмывки мембрану инкубировали в растворе вторичных антител в течение 1 часа при комнатной температуре и затем отмывали пять раз, как описано ранее. Нормализацию проводили по β-актину.

В работе использовали первичные антитела, специфичные к *HK2* (MA5-14849), β-actin (PA1-183), PFKP (PA5-28673), *ENO2* (PA5-27452), GPI (PA5-29665), BPGM (PA5-21821), и вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488 (A-11008) (Thermo Fisher Scientific). Детекцию флуоресценции проводили с использованием Турбоон FLA 9500 (General Electric, США).

Статистический анализ. В качестве критерия достоверности использован *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Подавление экспрессии гена *HK2* в клеточной линии RKO. С помощью shRNA, встроенной в лентивирусный вектор, получена стабильная линия клеток RKO со сниженной экспрессией *HK2*. Методом кПЦР показано снижение экспрессии мРНК гена *HK2* в линии RKO в четыре раза. Уровень экспрессии белкового продукта –

гексокиназы 2, определенный методом Вестерн-блот, понизился в три раза (рис. 1).

Снижение экспрессии генов *PFKP*, *GPI* и *BPGM* в клеточной линии RKO в условиях подавления экспрессии *HK2*. С помощью метода кПЦР проведен анализ экспрессии 15 генов, кодирующих ключевые ферменты гликолиза (*GAPDH*, *ADPGK*, *ALDOA*, *ENO3*, *PFKL*, *PGK1*, *PGAM1*, *PKM2*, *ENO1*, *PDK1*, *PDK3*, *PFKP*, *ENO2*, *GPI* и *BPGM*), а также гена *HIF1A* в клеточной линии RKO со сниженной экспрессией *HK2*. Выявлено, что уровень мРНК большинства исследуемых генов (*GAPDH*, *ADPGK*, *ALDOA*, *ENO3*, *PFKL*, *PGK1*, *PGAM1*, *PKM2*, *ENO1*, *PDK1*, *PDK3* и *HIF1A*) не изменялся. Уровень мРНК гена *PFKP* снижался в пять раз ($p < 0.05$), гена *ENO2* – в три раза ($p < 0.05$) в клеточной линии RKO со сниженной экспрессией *HK2*. Еще для двух генов, *BPGM* и *GPI*, было характерно значительное подавление экспрессии в 86 и 93 раза ($p < 0.05$) соответственно. Методом Вестерн-блот подтверждено снижение экспрессии белков PFKP, BPGM и GPI от 2.5 до 19 раз (рис. 2). Экспрессия белка *ENO2* не изменялась.

Обсуждение

Первая ферментативная реакция гликолиза – АТФ-зависимое фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата – катализируется ферментами гексокиназами (Oragina et al., 2013). В тканях животных описано четыре изофермента гексокиназ, кодируемых соответствующими генами – *HK1*, *HK2*, *HK3* и *HK4* (*GCK*) (Wilson, 2003). Гексокиназа 2 играет важную роль на начальных этапах развития опухоли и характеризуется повышенной экспрессией во многих видах рака, что связано главным образом с увеличением транспорта глюкозы в клетку (Mathupala et al., 2001). Это способствует повышению скорости гликолиза, адаптирует энергетический метаболизм для поддержания бесконтрольного роста и деления опухолевых клеток, которые даже в присутствии кислорода продолжают использовать гликолиз в качестве основного источника аденозинтрифосфата (АТФ) (эффект Варбурга). Происходит быстрое преобразование глюкозы в лактат, что сопровождается закислением внеклеточной среды и способствует метастазированию (Hsu, Sabatini, 2008; Wang et al., 2017). При онко-ассоциированной активации *HK2* связывается с потенциал-зависимым анионным каналом (VDAC) на наружной мембране митохондрий, препятствуя пермеабилзации митохондриальной мембраны и, как следствие, гибели опухолевых клеток (Pastorino et al., 2002; Krasnov et al., 2013a). Связывание между комплексом VDAC и *HK2* позволяет также избежать ингибирования гексокиназы 2 глюкозо-6-фосфатом и обеспечивает прямой доступ к АТФ, генерируемому суперкомплексом АТФ-синтасомой в митохондриях, поддерживая, таким образом, высокую скорость метаболизма в опухолевых клетках (Kim, Dang, 2005).

В ряде исследований показана вовлеченность *HK2* в развитие КРР, при котором наблюдается как повышение экспрессии гена *HK2* (Izuishi et al., 2012), так и ее снижение (Krasnov et al., 2015). С помощью иммуногистохимического анализа выявлена связь между экспрессией *HK2* и размером опухоли, стадией заболевания, степенью

инвазии, а также наличием отдаленных метастазов. Подавление HK2 в клеточных линиях KPP (HCT8 и HT29) приводит как к снижению образования лактата, так и к пониженной пролиферативной и миграционной активности опухолевых клеток (Katagiri et al., 2017). Одновременное подавление HK1 и HK2, как показано нами ранее, также ассоциировано со снижением жизнеспособности клеток линий KPP HT-29, SW480, HCT-15, RKO и HCT116 (Kudryavtseva et al., 2016a).

На модели клеточной линии RKO нами проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты гликолиза, а также гена *HIF1A* в условиях ингибирования экспрессии *HK2*. Уровень экспрессии большинства генов не изменялся, для гена *ENO2* обнаружено снижение экспрессии только на уровне мРНК, для генов *PFKP*, *BPGM* и *GPI* – на уровне мРНК и белка.

Ген *GPI* кодирует фермент глюкозо-6-фосфат изомеразу, которая катализирует второй этап гликолиза. Недавние исследования показали участие белка GPI в регуляции роста опухолевых клеток и процесса метастазирования. Обнаружено (Funasaka et al., 2005), что в условиях гипоксии наблюдается повышение экспрессии гена *GPI* в клеточных линиях рака молочной железы (BT-549), а ингибирование его экспрессии приводит к снижению подвижности опухолевых клеток. При стимуляции гликолиза D-(+)-глюкозой в клеточных линиях KPP (SW480 и SW620) отмечено повышение экспрессии гена *GPI* и, наоборот, при обработке клеток ингибитором гликолиза 2-дезоксид-D-глюкозой (2-DG) экспрессия *GPI* снижалась (Yeh et al., 2008). Нами выявлено значительное подавление экспрессии гена *GPI* в условиях ингибирования *HK2*. По-видимому, снижение экспрессии *GPI* связано с уменьшением производства его субстрата – глюкозо-6-фосфата, который является продуктом первой реакции гликолиза, катализируемой гексокиназой 2.

При ингибировании *HK2* обнаружено также снижение экспрессии гена *PFKP*, кодирующего фосфофруктокиназу. Этот фермент катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата в процессе гликолиза. Следует отметить, что экспрессия гена *PFKP* снижалась в меньшей степени, чем экспрессия *GPI*. Этот факт может объясняться тем, что в условиях ингибирования экспрессии *HK2* и, соответственно, снижения содержания продукта катализируемой ей реакции, фруктозо-6-фосфата, происходит постепенное уменьшение количества субстрата для последующих реакций гликолиза. Известно, что PFKP часто вовлечен в канцерогенез и играет важную роль в нарушении энергетического обмена опухолевых клеток (Wang et al., 2016). Показано, что в клеточных линиях светлоклеточной почечно-клеточной карциномы (786-O, 769-P и Saki-1) подавление экспрессии фосфофруктокиназы приводит к ингибированию роста клеток, а также вызывает остановку клеточного цикла и индуцирует апоптоз (Wang et al., 2016). Согласно полученным нами данным, ингибирование экспрессии *HK2* приводит к снижению уровня мРНК и белка PFKP, что, в свою очередь, может индуцировать гибель опухолевых клеток, особенно в условиях *in vivo*. Таким образом, ингибирование гена *PFKP* в дополнение к *HK2* может быть рассмотрено как вариант усиления противоопухолевого эффекта.

В норме ген *BPGM* экспрессируется в различных тканях организма, преобладая в костном мозге, плаценте, сердце и эндотелиальных клетках, и кодирует фермент бисфосфоглицеромутазу, катализирующую образование 2,3-бисфосфоглицерата. Эта реакция называется шунтом Рапопорта–Люберинга (Cho et al., 2008). Известно, что в метаболических путях при проксимальных нарушениях (в случае шунта Рапопорта–Люберинга это, например, недостаточность гексокиназы, фосфоглюкоизомеразы или альдолазы А) уровни фермента, катализирующего определенный этап, и его продукта будут снижены, так как уменьшается интенсивность синтеза предшественников. Если же нарушение расположено дистально, то, наоборот, концентрация увеличивается. По-видимому, экспрессия гена *BPGM* значительно подавляется при ингибировании *HK2* именно на фоне общего сокращения количества промежуточных продуктов гликолиза на предшествующих этапах. Вероятно, не во всех случаях количество продуктов гликолиза напрямую связано с изменениями экспрессии ферментов, катализирующих их образование, нами выявлено подавление только трех из них.

Таким образом, получены данные об изменении экспрессии генов при экспериментальном подавлении наиболее часто активирующегося в опухолях различных локализаций фермента гликолиза – гексокиназы 2 – на модели карциномы толстой кишки. Полученные данные важны для понимания результатов и последствий воздействия на ту или иную молекулу, рассматриваемую в качестве мишени при разработке способов таргетной терапии онкологических заболеваний.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation, project 14-15-01083.

The authors are grateful to the staff of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, for providing access to its facilities, where the RKO cell line was cultured and experiments on lentivirus transduction followed by selection of stable clones were conducted. The authors also acknowledge the access to equipment of the Genome Shared Access Center, Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php) and to computing facilities of Initium-Farm Company.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Cho J., King J.S., Qian X., Harwood A.J., Shears S.B. Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPK expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(16):5998-6003. DOI 10.1073/pnas.0710980105.
- Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Koroban N.V., Speranskaya A.S., Krintsina A.A., Belenikin M.S., Snehkina A.V., Sadritdinova A.F., Kishlyan N.V., Rozhmina T.A., Yurkevich O.Y., Muravenko O.V., Bolsheva N.L., Melnikova N.V. Gene expression profiling of flax (*Linum usitatissimum* L.) under edaphic stress. *BMC Plant Biol.* 2016;16(Suppl. 3):237. DOI 10.1186/s12870-016-0927-9.
- Funasaka T., Yanagawa T., Hogan V., Raz A. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. *FASEB J.* 2005;19(11):1422-1430. DOI 10.1096/fj.05-3699com.

- Graziano F., Ruzzo A., Giacomini E., Ricciardi T., Aprile G., Loupakis F., Lorenzini P., Ongaro E., Zoratto F., Catalano V., Sarti D., Rulli E., Cremolini C., De Nicolis M., De Maglio G., Falcone A., Fiorentini G., Magnani M. Glycolysis gene expression analysis and selective metabolic advantage in the clinical progression of colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(3):258-264. DOI 10.1038/tpj.2016.13.
- Haraldson K., Kashuba V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Kudryavtseva A.V., Pavlova T.V., Braga E.A., Pronina I.V., Kondratov A.G., Rynditch A.V., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. LRRC3B gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibit cell growth and replication. *Biochimie.* 2012;94:1151-1157. DOI 10.1016/j.biochi.2012.01.019.
- Hsu P.P., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703-707. DOI 10.1016/j.cell.2008.08.021.
- Izuishi K., Yamamoto Y., Sano T., Takebayashi R., Nishiyama Y., Mori H., Masaki T., Morishita A., Suzuki Y. Molecular mechanism underlying the detection of colorectal cancer by 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *J. Gastrointest. Surg.* 2012;16(2):394-400. DOI 10.1007/s11605-011-1727-z.
- Katagiri M., Karasawa H., Takagi K., Nakayama S., Yabuuchi S., Fujishima F., Naitoh T., Watanabe M., Suzuki T., Unno M. Hexokinase 2 in colorectal cancer: a potent prognostic factor associated with glycolysis, proliferation and migration. *Histol. Histopathol.* 2017;32(4):351-360. DOI 10.14670/HH-11-799.
- Kim J.W., Dang C.V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 2005;30(3):142-150. DOI 10.1016/j.tibs.2005.01.005.
- Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Lakunina V.A., Kirpiy A.A., Kudryavtseva A.V. Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2013a;17(10):1221-1233. DOI 10.1517/14728222.2013.833607.
- Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Sadritdinova A.F., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Poteryakhina A.V., Nyushko K.M., Belyakov M.M., Kaprin A.D., Zaretsky A.R., Kudryavtseva A.V. Evaluation of gene expression of hexokinases in colorectal cancer with the use of bioinformatics methods. *Biofizika.* 2015;60(6):1050-1056. DOI 10.1134/S0006350915060172.
- Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V. Deregulation of glycolysis in cancer: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2013b;17(6):681-693. DOI 10.1517/14728222.2013.775253.
- Kudryavtseva A.V., Fedorova M.S., Zhavoronkov A., Moskalev A.A., Zasedatelev A.S., Dmitriev A.A., Sadritdinova A.F., Karpova I.Y., Nyushko K.M., Kalinin D.V., Volchenko N.N., Melnikova N.V., Klimina K.M., Sidorov D.V., Popov A.Y., Nasedkina T.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Krasnov G.S., Snezhkina A.V. Effect of lentivirus-mediated shRNA inactivation of HK1, HK2, and HK3 genes in colorectal cancer and melanoma cells. *BMC Genet.* 2016a;17(Suppl. 3):156. DOI 10.1186/s12863-016-0459-1.
- Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Alekseev B.Y., Kardymon O.L., Sadritdinova A.F., Fedorova M.S., Pokrovsky A.V., Melnikova N.V., Kaprin A.D., Moskalev A.A., Snezhkina A.V. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 2016b;7(29):44879-44905. DOI 10.18632/oncotarget.9821.
- Kudryavtseva A.V., Lipatova A.V., Zaretsky A.R., Moskalev A.A., Fedorova M.S., Rasskazova A.S., Shibukhova G.A., Snezhkina A.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Dmitriev A.A., Krasnov G.S. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016c;7(33):53959-53983. DOI 10.18632/oncotarget.9796.
- Mathupala S.P., Rempel A., Pedersen P.L. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 2001;276(46):43407-43412. DOI 10.1074/jbc.M108181200.
- Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Belenikin M.S., Koroban N.V., Speranskaya A.S., Krinitsina A.A., Krasnov G.S., Lakunina V.A., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Kishlyan N.V., Rozhmina T.A., Klimina K.M., Amosova A.V., Zelenin A.V., Muravenko O.V., Bolshева N.L., Kudryavtseva A.V. Identification, expression analysis, and target prediction of flax genotroph microRNAs under normal and nutrient stress conditions. *Front. Plant Sci.* 2016;7:399. DOI 10.3389/fpls.2016.00399.
- Oparina N.Y., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Veselovskii V.A., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Melnikova N.V., Speranskaya A.S., Darii M.V., Stepanov O.A., Barkhatov I.M., Kudryavtseva A.V. Differential expression of genes that encode glycolysis enzymes in kidney and lung cancer in humans. *Russ. J. Genet.* 2013;49(7):707-716. DOI 10.1134/S1022795413050104.
- Pastorino J.G., Shulga N., Hoek J.B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002;277(9):7610-7618. DOI 10.1074/jbc.M109950200.
- Siegel R.L., Miller K.D., Fedewa S.A., Ahnen D.J., Meester R.G.S., Barzi A., Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: Cancer J. Clin.* 2017;67(3):177-193. DOI 10.3322/caac.21220.
- Snezhkina A.V., Krasnov G.S., Zaretsky A.R., Zhavoronkov A., Nyushko K.M., Moskalev A.A., Karpova I.Y., Afremova A.I., Lipatova A.V., Kochetkov D.V., Fedorova M.S., Volchenko N.N., Sadritdinova A.F., Melnikova N.V., Sidorov D.V., Popov A.Y., Kalinin D.V., Kaprin A.D., Alekseev B.Y., Dmitriev A.A., Kudryavtseva A.V. Differential expression of alternatively spliced transcripts related to energy metabolism in colorectal cancer. *BMC Genomics.* 2016;17(Suppl. 14):1011. DOI 10.1186/s12864-016-3351-5.
- Wang W., Liu Z., Zhao L., Sun J., He Q., Yan W., Lu Z., Wang A. Hexokinase 2 enhances the metastatic potential of tongue squamous cell carcinoma via the SOD2-H2O2 pathway. *Oncotarget.* 2017;8(2):3344-3354. DOI 10.18632/oncotarget.13763.
- Wang J., Zhang P., Zhong J., Tan M., Ge J., Tao L., Li Y., Zhu Y., Wu L., Qiu J., Tong X. The platelet isoform of phosphofructokinase contributes to metabolic reprogramming and maintains cell proliferation in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(19):27142-27157. DOI 10.18632/oncotarget.8382.
- Warburg O. Origin of cancer cells. *Oncologia.* 1956;9(2):75-83. DOI 10.1126/science.123.3191.309.
- Wilson J.E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J. Exp. Biol.* 2003;206(12):2049-2057. DOI 10.1242/jeb.00241.
- Yeh C.S., Wang J.Y., Chung F.Y., Lee S.C., Huang M.Y., Kuo C.W., Yang M.J., Lin S.R. Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol. Rep.* 2008;19(1):81-91. DOI 10.3892/or.19.1.81.