https://doi.org/10.15388/vu.thesis.314 https://orcid.org/0000-0001-7997-6783

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Laurynas Vilys

Pre-iRNR splaisingo ir jį reguliuojančių veiksnių hipoksinėje ląstelių mikroaplinkoje tyrimai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai, biochemija (N 004)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2013–2021 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba, ES struktūrinis fondas. Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – **dr. Arvydas Kanopka** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Rolandas Meškys** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

Dr. Darius Balčiūnas (Temple universitetas, JAV, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Dr. Jurgita Matulienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Prof. dr. Dalė Vieželienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. birželio mėn. 17 d. 14:00 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

https://doi.org/10.15388/vu.thesis.314 https://orcid.org/0000-0001-7997-6783

VILNIUS UNIVERSITY

Laurynas Vilys

Investigating pre-mRNA splicing and its regulatory factors in a hypoxic cell microenvironment

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences, Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2022

This dissertation was written between 2013 and 2021 at Vilnius university, Life sciences center, Institute of Biotechnology. The research was supported by Research Council of Lithuania.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – Dr. Arvydas Kanopka (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

Members:

Dr. Darius Balčiūnas (Temple University, USA, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);

Dr. Jurgita Matulienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);

Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (National Cancer Institute, Natural Sciences, Biochemistry, N 004);

Prof. Dr. Dalė Vieželienė (Lithuanian University Of Health Sciences, Natural Sciences, Biology, N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 14:00 on 17 June 2022 in Room R401 of the Vilnius University Life Sciences Centre.

Address: Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

	TURIN	5	
	SANT	9	
	ĮVAD	12	
	1.	LITERATŪROS APŽVALGA	15
	1.1.	Hipoksija	15
	1.1.1.	Hipoksija organizmo ir organų lygmeniu	15
	1.1.2.	Ląstelės atsakas į hipoksiją	16
	1.2.	Eukariotinės RNR susidarymas	
	1.3.	pre-iRNR splaisingas	30
	1.3.1.	Savaiminis pre-iRNR splaisingas	
	1.3.2.	Reguliuojamas splaisingas	
	1.3.3.	U2 splaisosomos kompleksas	
	1.3.4.	U12 splaisosomos kompleksas	
	1.3.5.	Alternatyvusis splaisingas	
	1.3.6.	FAS alternatyvaus splaisingo reguliacija	39
ne	1.3.7. urodege	<i>TAU</i> alternatyvaus splaisingo reguliacija ir eneracinės ligos	
	1.3.8.	U2AF	
	1.3.9.	Alternatyvusis splaisingas ir hipoksija	
	2.	MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	46
	2.1.	Medžiagos	46
	2.1.1.	Reagentai	
	2.1.2.	Tirpalai	
	2.1.3.	Rinkiniai	
	2.1.4.	Oligonukleotidai	
	2.1.5.	siRNR	

2.1.6.	Antikūnai	51
2.1.7.	Ląstelių linijos, mikroorganizmų kamienai	51
2.1.8.	Plazmidinės DNR	52
2.2. Ty	rimo metodai	53
2.2.1.	Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	53
2.2.2.	RNR gryninimas iš eukariotinių ląstelių	53
2.2.3.	kDNR sintezė	53
2.2.4.	DNR elektroforezė agaroziniame gelyje	53
2.2.5.	DNR ar RNR koncentracijos nustatymas	54
2.2.6.	Plazmidinės DNR gryninimas iš E. coli	54
2.2.7.	Plazmidinės DNR įterpimas į E. coli (transformacija)	55
2.2.8. (transfekcija)	Plazmidinės DNR įterpimas į eukariotines ląsteles	55
2.2.9. naudojant siRN	Baltymų raiškos sumažinimas eukariotinėse ląstelėse R	55
2.2.10.	In vitro RNR transkripcija	. 56
2.2.11.	Baltymų lizatų paruošimas	56
2.2.12. denatūruojančio	Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje omis sąlygomis	56
2.2.13.	Dvikryptė baltymų elektroforezė	57
2.2.14. metodu	Baltymų analizė "Western blot" imunohibridizacijos	58
2.2.15.	Branduolių ekstraktų paruošimas	59
2.2.16.	Stabilus RNR prijungimas prie baltymo naudojant UV.	59
2.2.17.	Eukariotinių ląstelių linijų kultivavimas	60
2.2.18.	DNR iterpimas į plazmidinę DNR (ligavimas)	60
2.2.19.	Kompetentinių E. coli paruošimas	60
2.2.20.	E. coli kolonijų tikrinimas PGR metodu	61
2.2.21.	Plazmidinių DNR paruošimas genomui redaguoti	61

2.2.22.	Genomo redagavimas naudojant CRISPR/Cas9 metodą 62					
2.2.23. redagavimo	Eukariotinių ląstelių klonų tikrinimas po genomo 62					
2 2 24	Baltymu koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu 62					
2.2.2 + .	Eukoriotinių lostolių žoldumos ir otžildumos					
2.2.25.						
2.2.26.	Ląstelių skaičiavimas63					
2.2.27.	Statistinė analizė					
3. REZU	LTATAI					
3.1. Hip	oksinės mikroaplinkos įtaka iRNR izoformų susidarymui. 64					
3.1.1. splaisingui	Hipoksinės mikroaplinkos įtaka <i>TAU</i> ir <i>APP</i> pre-iRNR 64					
3.1.2. Padidintos splaisingo veiksnių SRSF1 arba SRSF5 raiškos įtaka <i>TAU</i> 10 egzono įtraukimui ar praleidimui į iRNR normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis						
3.1.3. Sumažintos SRSF1 ir SRSF5 veiksnių raiškos poveikis <i>TAU</i> 10 egzono įtraukimui ar praleidimui į iRNR normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis						
3.1.4.	Hipoksijos įtaka CLK šeimos kinazių raiškai69					
3.2. U2A reguliatorius	AF – nuo hipoksijos priklausomas alternatyvaus splaisingo 					
3.2.1. splaisingui	U2AF65 subvieneto raiškos įtaka FAS pre-iRNR 					
3.2.2. splaisingui	U2AF35 subvieneto raiškos įtaka <i>FAS</i> pre-iRNR					
3.2.3. yra silpnesnė	Hipoksinėse ląstelėse U2AF subvienetų sąveika su RNR 					
3.2.4. modifikacijos ly	Hipoksinėse ląstelėse pasikeičia abiejų U2AF subvienetų gis74					
4. DISKUSIJA						
IŠVADOS	IŠVADOS					
LITERATŪF	ROS SARAŠAS					

SUMMARY OF DOCTORAL DISERTATION	
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	
PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	122
CURRICULUM VITAE	123
PADĖKA	126
UŽRAŠAMS	127

SANTRUMPOS

4E-BP1 – su eukariotiniu iniciacijos faktoriumi 4E sąveikaujantis baltymas 1.

4E-BP2 – su eukariotiniu iniciacijos faktoriumi 4E sąveikaujantis baltymas 2.

AGC – baltymų kinazių A, G ir C šeimos (angl. protein kinase A, G, and C families).

AMPK – adenozino monofosfato aktyvuojama baltymų kinazė (angl. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase).

ATF4 – aktyvuojantis transkripcijos veiksnys 4 (angl. *activating transcription factor 4*).

ATF6 – aktyvuojantis transkripcijos veiksnys 6 (angl. activating transcription factor 6).

Atg5 – autofagijos baltymas 5 (angl. autophagy protein 5).

AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija.

bHLH – bazinis spiralės-kilpos-spiralės domenas (angl. *basic helix-loop-helix domain*).

BNIP3 – su BCL2 sąveikaujantis baltymas (angl. BCL2 / adenovirus E1B 19-kD protein-interactin protein 3).

CaM – Nuo kalcio jonų (kalmodulino) priklausoma baltymų kinazė (angl. $Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinas$).

CBP – su CREB sąveikaujantis baltymas (angl. *CREB-binding protein*). CHOP – angl. C/EBP-homologous protein.

DEPTOR – su mTOR sąveikaujantis baltymas, turintis DEP, (angl. *DEP domain containing mTOR-interacting protein*).

EIF2a – eukariotinis transliacijos iniciacijos veiksnys 2A (angl. *eukaryotic translation initiation factor 2A*).

 $eIF2\alpha$ – eukariotinio transliacijos iniciacijos 2 veiksnio 1 subvienetas (angl. *eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1*).

eIF4E – eukariotinis transliacijos iniciacijos veiksnys 4E (angl. eukaryotic translation initiation factor 4E).

ERAD – su endoplazminiu tinklu susijusių baltymų degradacija (angl. endoplasmic-reticulum-associated protein degradation).

FIH-1 – veiksnys, inhibuojantis HIF-1 (angl. factor inhibiting HIF-1).

GADD34 – augimo stabdymo ir DNR pažaidų indukuojamas baltymas (angl. *growth arrest and DNA damage-inducible protein*).

HIF – hipoksijos indukuojamas veiksnys (angl. hypoxia inducable factor).

HRE – atsako į hipoksiją sritis (angl. hypoxia response element).

IRE1 – nuo inozitolo priklausomas fermentas 1α (angl. *inositol-requiring enzyme 1* α).

kDNR – kopijinė DNR.

LC3 – su mikrovamzdeliais susijusio baltymo 1A/1B lengvoji grandinė (angl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*).

MAX – su MYC susijęs veiksnys X (angl. MYC Associated Factor X).

MYC – MYC proto-onkogenas (angl. MYC Proto-Oncogene).

mLST8 – angl. mammalian lethal with SEC13 protein 8.

mSin1 – su žinduolių streso aktyvuojama baltymų kinaze sąveikaujantis baltymas (angl. *mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1*).

mTOR – kinazė; rapamicino taikinys žinduolių organizmuose (angl. *mamallian target of Rapamycin*).

mTORC1 – mTOR 1 kompleksas.

mTORC2 – mTOR 2 kompleksas.

MXI1 – su MAX sąveikaujantis baltymas 1 (angl. MAX Interactor 1).

NADPH - nikotinamido dinukleotidfosfatas.

ODD – nuo deguonies priklausomas domenas (angl. *oxygen dependant domain*).

p300 – su E1A sąveikaujantis baltymas p300 (angl. *E1A binding protein* p300).

PAS - Per-Arnt-Sim domenas.

PERK – endoplazminio tinklo transmembraninė kinazė (angl. protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase).

PHD – prolil-hidroksilazė (angl. prolyl hydroxylase domain proteins).

PML – angl. promyekicytic leukaemia tumor suppressor.

PRAS40 – angl. proline-rich Akt substrate of 40 kad.

Protors-1 – angl. protein observed with Rictors-1.

Protors-2 – angl. protein observed with Rictors-2.

pVHL – von Hippel-Lindau ubikvitino ligazė.

Raptor – mTOR susijęs reguliacinis baltymas (angl. *regulatory-associated protein of mTOR*).

REDD1 – angl. regulated in development and DNA damage responses 1.

RHEB – angl. Ras homolog enriched in brain.

Rictor – angl. rapamycin-insensitive companion of mTOR.

ROS - aktyvios deguonies formos (angl. reactive oxygen species).

S6K1 – ribosomos S6 1 kinazė.

S6K2 – ribosomos S6 2 kinazė.

siRNR – maža interferuojanti RNR (angl. small interfering RNA).

snRNP – maži branduoliuo ribonukleobaltymai (angl. *small nuclear ribonucleoproteins*).

snRNR – mažos branduolio RNR (angl. small nuclear RNA).

TAD-C – C-galinis transkripcijos aktyvacijos domenas (angl. *transcription activation domain*).

TAD-N – N-galinis transkripcijos aktyvacijos domenas (angl. *transcription activation domain*).

TSC – angl. tuberous sclerosis complex.

ULK1 – į Unc-51 panaši autofagiją aktyvuojanti kinazė 1 (angl. *Unc-51 like autophagy activating kinase 1*).

UPR – nesulankstytų baltymų atsakas (angl. unfolded protein response).

XBP1 – su X dėžute sąveikaujantis baltymas 1 (angl. X-box binding protein 1).

ĮVADAS

Hipoksija – terminas, apibūdinantis sumažėjusį deguonies kiekį ląstelės mikroaplinkoje, kuomet jo nebepakanka normalioms ląstelės funkcijoms palaikyti. Hipoksija gali būti susijusi su fiziologinėmis sąlygomis (pvz., intensyviai sportuojant, kalnuose ir pan.), bet dažniausiai yra patologinė būsena, pasireiškianti sergant išeminėmis ligomis (infarktas, insultas) bei vėžiu. Augant navikui, jį sudarančios ląstelės atitolsta nuo kraujagyslių ir susidaro hipoksinės sritys, jose esančios ląstelės tampa atsparios gydymui chemoterapija ar radioterapija, kurios remiasi reaktyvių deguonies formų sukeliamų pažaidų skatinimu. Hipoksija turi įtakos neurodegeneracinių ligų, tokių kaip Alzheimerio liga, Parkinsono liga ir kt., progresavimui. Vienas iš atsako į hipoksiją kelių yra pakitusi baltymų izoformų, susidarančių alternatyvaus pre-iRNR splaisingo būdu, raiška.

iRNR brendimas – vienas esminių ląstelės procesų, kai nuo geną koduojančios DNR susintetinama iRNR, nuo kurios gali vykti baltymo sintezė. iRNR brendimą sudaro keli etapai: transkripcija, splaisingas, poliadenilinimas, 5'-kepurės (angl. *cap*) prijungimas ir iRNR pernaša iš branduolio. Pre-iRNR splaisingas yra vienas iš iRNR brendimo etapų, kuriame iš pre-iRNR pašalinamos baltymo nekoduojančios sekos (intronai) ir sujungiamos baltymą koduojančios sekos (egzonai). Šį procesą aukštesniuosiuose eukariotuose katalizuoja daugiabaltyminis kompleksas splaisosoma, sudarytas iš daugiau nei 100 įvairių baltymų bei reguliacinių elementų. Alternatyvusis splaisingas – tai procesas, kuomet iš vienos pre-iRNR gali susidaryti skirtingas ar net priešingas funkcijas atliekantys baltymai. Alternatyvusis splaisingas sukuria baltymų įvairovę, tačiau pokyčiai splaisinge taip pat gali nulemti ir tokių ligų kaip pigmentinis retinitas ir kt. atsiradimą. Žinoma, kad alternatyvaus splaisingo pokyčiai gali lemti ir neurodegeneracinių ligų atsiradimą bei vystymąsi.

Esant hipoksijai kinta kai kurių pre-iRNR splaisingo profilis ir susidaro baltymų izoformos, padedančios ląstelei išgyventi nepalankiomis sąlygomis. Nors šių pokyčių pasekmės plačiai tyrinėjamos, tikslus reguliacijos mechanizmas vis dar lieka neaiškus.

Šio darbo **tikslas** – nustatyti splaisingo veiksnius, reguliuojančius nuo hipoksinės ląstelės mikroaplinkos priklausomą alternatyvųjį pre-iRNR splaisingą.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti hipoksinės ląstelių mikroaplinkos įtaką su neurodegeneracinėmis ligomis siejamų *TAU* ir *APP* iRNR izoformų susidarymui;

2. nustatyti splaisingo veiksnių SRSF1 ir SRSF5 įtaką *TAU* 3R/4R iRNR izoformų susidarymui;

3. nustatyti splaisingo veiksnio U2AF individualių subvienetų įtaką nuo hipoksijos priklausomam *FAS/sFAS* iRNR izoformų susidarymui ląstelėse;

4. nustatyti splaisingo veiksnio U2AF atskirų subvienetų aktyvumo pokyčius bei šiuos pakitimus sukeliančias priežastis, lemiančias pre-iRNR splaisingo pakitimus hipoksinėse ląstelėse.

Darbo mokslinis naujumas ir praktinė vertė

Pre-iRNR splaisingo reguliacija yra itin kompleksiškas ir sudėtingas procesas. Nustatyta daugybė veiksnių, darančių įtaką įvairių iRNR alternatyvių izoformų susidarymui, esant normalioms deguonies sąlygoms, tačiau nėra žinoma, kaip splaisingas reguliuojamas esant hipoksinėms sąlygoms. Hipoksija – svarbus veiksnys vystantis neurodegeneracinėms, onkologinėms bei kitoms ligoms, tačiau hipoksinės mikroaplinkos įtaka ląstelių procesams mažai ištirta.

Šiame darbe ištirtas su neurodegeneracinėmis ligomis siejamų genų *APP* ir *TAU* alternatyvusis pre-iRNR splaisingas bei jo priklausomybė nuo hipoksinės ląstelės mikroaplinkos. Pirmą kartą nustatyta, kad hipoksija skatina *TAU* 4R iRNR izoformos susidarymą (10 egzono įtraukimą), kas pakeičia 3R/4R izoformų santykį ląstelėje, o tai yra svarbus veiksnys vystantis neurodegeneracinėms ligoms. *APP* geno pre-iRNR splaisingas nepriklauso nuo hipoksinės mikroaplinkos.

Taip pat šiame darbe parodoma, kad splaisingo veiksnys SRSF1 yra svarbus reguliuojant *TAU* 3R/4R izoformų susidarymą. Šio veiksnio raiškos pokytis daro įtaką *TAU* 3R/4R izoformų santykiui ląstelėse, kultivuotose tiek normaliomis deguonies, tiek ir hipoksinėmis sąlygomis. Splaisingo veiksnio SRSF5 padidinta ir sumažinta raiška įtakos *TAU* alternatyviam splaisingui neturi.

Antrame šio darbo etape pirmą kartą parodoma, kad ne tik splaisingo veiksnių raiškos pokyčiai reguliuoja nuo hipoksijos priklausomą *FAS* geno 6 egzono įtraukimą ar praleidimą į bręstančią iRNR. Gauti rezultatai parodė, kad labai svarbų vaidmenį alternatyvaus splaisingo reguliacijoje turi ir

splaisingo veiksnių modifikacijos lygis. U2AF subvienetų modifikacijos pokyčiai svarbūs reguliuojant nuo hipoksijos priklausomą pre-iRNR splaisingą, nors šio veiksnio subvienetų raiška nesikeičia lyginant normalias deguonies ir hipoksines sąlygas. Rezultatai rodo, kad pakitęs modifikacijos lygis keičia U2AF sąveikos su RNR efektyvumą, o tai daro įtaką nuo hipoksijos priklausomų iRNR izoformų susidarymui. Šiame darbe aptariamas atrastas nuo hipoksijos priklausomo pre-iRNR splaisingo reguliavimo mechanizmas, kuris gali būti vienas iš pagrindinių, reguliuojančių šį procesą.

Tokie nuo hipoksijos priklausomų iRNR izoformų susidarymo tyrimai padeda suprasti neurodegeneracinių, onkologinių ir kitų su hipoksine ląstelės mikroaplinka susijusių ligų patogenezės mechanizmus. Nustačius tikslų mechanizmą, reguliuojantį alternatyvų splaisingą hipoksinėmis sąlygomis, bus galima atrasti specifinius taikinius ligoms gydyti ir prevencijai.

Ginamieji teiginiai:

1. hipoksinė ląstelių mikroaplinka keičia *TAU* 4R/3R iRNR izoformų susidarymo santykį, tačiau APP iRNR izoformų raiška nuo hipoksijos nepriklauso;

2. SRSF1 raiškos pokyčiai ląstelėse lemia *TAU* 4R/3R iRNR izoformų susidarymą;

3. SRSF5 nedalyvauja alternatyviojo *TAU* 4R/3R pre-iRNR splaisingo reguliacijoje;

4. heterodimerinis splaisingo veiksnys U2AF reguliuoja alternatyvųjį FAS/sFAS splaisingą hipoksinėse ląstelėse;

5. pakitęs abiejų U2AF veiksnio subvienetų modifikacijos lygis hipoksinėse ląstelėse lemia FAS/sFAS iRNR izoformų susidarymo pokyčius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Hipoksija

Aerobinių organizmų gyvybinei veiklai deguonis yra būtinas elementas, nes jis yra galutinis elektronų akceptorius mitochondrijų kvėpavimo grandinėje. Tai leidžia vykti oksidaciniam fosforilinimui, t. y. ATP sintezei. Normaliomis deguonies salygomis (21 % O₂) lastelės palaiko pastovų aukšta ATP/ADP santyki, būtiną joms išgyventi. Deguonies sumažėjimas, net trumpalaikis ir lokalizuotas, sukelia negrįžtamus ląstelių pažeidimus (López-Barneo, Pardal ir Ortega-Sáenz, 2001). Hipoksija atsiranda ne tik esant skirtingiems patofiziologiniams sutrikimams, tokiems kaip aterosklerozė, miego apnėja, išeminės ir neurodegeneracinės ligos bei vėžys, bet taip pat ir vykstant fiziologiniams procesams, tokiems kaip embriono vystymasis (Brahimi-Horn ir Pouvsségur, 2007). Daugumoje navikų yra hipoksinės sritys, kurios susidaro dėl stiprių struktūrinių pakitimų auglio audiniuose bei silpnai išsivysčiusio kapiliarų tinklo (Koh ir Powis, 2012). Pastaruoju metu nustatyta, kad neurodegeneracinių ligų vystymasis taip pat siejamas su hipoksine ląstelės mikroaplinka. Keletas tyrimų parodė svarbų hipoksijos vaidmenį neuronų degeneracijos procesuose, kur hipoksija skatina amiloido β peptido sinteze skirtingu tipu lastelėse (Salminen, Kauppinen ir Kaarniranta, 2017).

Hipoksija literatūroje apibūdinama kaip deguonies tiekimo sumažėjimas iki lygio, kurio nebepakanka palaikyti ląstelių funkcijoms. Aprūpinimo deguonimi matavimai įvairiuose organuose rodo, kad normalus deguonies kiekis audiniuose svyruoja nuo 7,5 % iki 4 % (nuo 100 mmHg iki 30 mmHg), todėl hipoksinės ląstelės mikroaplinkos susidarymo riba skirtinguose audiniuose yra skirtinga (Carreau ir kt., 2011). Siūloma hipoksiją skirstyti į du tipus: fiziologinė hipoksija – kuomet vyksta atsakas audiniuose, kad būtų palaikomas reikalingas deguonies kiekis (2–6 % deguonies), ir patologinę hipoksiją – kai deguonies kiekis yra mažesnis nei 2 % (dažniausiai augliuose, išeminių ligų ir insulto, infarkto atveju) (Höckel ir Vaupel, 2001; McKeown, 2014).

1.1.1.Hipoksija organizmo ir organų lygmeniu

Žinduolių organizme pirmas fiziologinis atsakas į sumažėjusį atmosferoje deguonies kiekį (pvz., kalnuose) yra padažnėjęs kvėpavimas. Į žemą deguonies kiekį arteriniame kraujyje reaguoja miego arterijos kūnelis (angl. *carotid body*) (žmogaus miego arterijos kūnelis užima maždaug 20 mm²

plotą ir yra netoli miego arterijos išsišakojimo (1.1 pav.)). Kūnelio ląstelės perduoda signalą smegenų neuronams ir taip stimuliuoja kvėpavimą.



Be to, hipoksija padidina katecholaminų (pvz., epinefrino, norepinefrino, dopamino ir kt.), kurie irgi skatina kvėpavimą, sekreciją. Esant deguonies trūkumui atpalaiduojami kai kurie lygieji raumenys ir taip sumažinamas pasipriešinimas oro tėkmei į alveoles (Lutz ir Storey, 2011; Michiels, 2004; Lumb, 2017a; Easton, Slykerman ir Anthonisen, 1986). Deguonies kiekio sumažėjimas aplinkoje tiesiogiai stimuliuoja cirkuliacinę sistemą padidindamas simpatetinių vasomotorinių, širdies ir kraujagyslių nervų aktyvumą, kartu padidindamas pulsą bei spaudimą.

Anaerobinio metabolizmo metu susidaro tik viena devynioliktoji ATP dalis iš vieno molio gliukozės lyginant su aerobiniu metabolizmu. Žinduolių organuose, turinčiuose didelius metabolinius poreikius, kaip, pvz., smegenys, neįmanoma tiek padidinti gliukozės pernašą, kad jos pakaktų ATP gamybai. Dėl šios priežasties ATP/ADP santykis hipoksiją patiriančių organų ląstelėse smarkiai sumažėja ir taip pat mažėja visų daug energijos turinčių molekulių (Lumb, 2017b; Martin, Lloyd ir Cowan, 1994).

1.1.2. Ląstelės atsakas į hipoksiją

Be fiziologinių pasekmių, hipoksijos įtaka jaučiama ir audinių ląstelių lygmeniu. Pirmiausia dėl ATP stokos į ląstelės mikroaplinkos pasikeitimą sureaguoja ląstelių membranos, pasikeičiant jų poliarizacijai aktyvuojami jonų kanalai (Lumb, 2017b). Vėliau įsijungia hipoksijos indukuojamų veiksnių (HIF, angl. *hipoxia inducable factor*) α subvienetų stabilizavimas, mTOR kinazės slopinimas, nesulankstytų baltymų atsakas (UPR, angl. *unfolded protein response*) bei aktyvių deguonies formų (ROS, angl. *reactive oxygen species*) susidarymas (Koh ir Powis, 2012; Bartoszewska ir Collawn, 2020; Wouters ir Koritzinsky, 2008; Blasiak ir kt., 2014).

1.1.2.1. Kalio ir natrio jonų judėjimas

Ląstelėms patekus į hipoksines ar anoksines sąlygas jų membrana tampa hiperpoliaziruota arba depoliarizuota (priklausomai nuo ląstelių tipo). Toliau vyksta pastovus membranos potencialo mažėjimas, kol pasiekiama slenkstinė vertė ir įvyksta savaiminė depoliarizacija. Šioje stadijoje sutrinka jonų kanalų funkcija ir normalūs viduląsteliniai ir išoriniai jonų gradientai išnyksta, ląstelės žūva (Lumb, 2017b).

Hipoksija tiesiogiai veikia kalio kanalus – padidina transmembraninį pralaidumą kalio jonams, taip sukeldama hiperpoliarizaciją. Vėliau kalis pradeda judėti iš ląstelės, padidindamas kalio koncentraciją ląstelės išorėje ir taip sukeldamas depoliarizaciją. Kalio nuotėkis ir natrio patekimas į ląstelę pagreitinami, kai dėl ATP trūkumo sutrinka Na/K nuo ATP priklausomi siurbliai. Esant staigiai depoliarizacijai, manoma, kad natrio ir kalio kanalai lieka atviri, taip leidžiama jonams judėti nekontroliuojamai ir sukeliama ląstelės žūtis (Lumb, 2017b).

1.1.2.2. Kalcis

Viduląstelinė kalcio koncentracija hipoksijos metu padidėja. Nuo transmembraninio potencialo įtampos priklausomi kalcio kanalai, kaip atsakas į membranos depoliarizaciją, atidaromi ir didėjantis viduląstelinis natrio kiekis skatina membraninę Na⁺/Ca²⁺ priešnašą pradėti veikti priešinga kryptimi. Į pakitusį ląstelės membranos potencialą reaguoja ląstelės viduje esantys ryanodino receptoriai, aktyvinantys kalcio jonų paleidimą iš endoplazminio tinklo ir mitochondrijų į citoplazmą. Visas šis viduląstelinio kalcio jonų padidėjimas yra žalingas ląstelei, nes aktyvina ATP, kaip energijos šaltinį naudojančius fermentus (kai ir šiaip ATP kiekis yra mažas), aktyvina proteazes, kurios suardo sarkolemą ir citoskeletą (Lumb, 2017b; Seta ir kt., 2004; Yamaji ir kt., 2003). Manoma, kad jungtis tarp staigios ir chroniškos hipoksijos yra būtent Ca²⁺ jonų koncentracijos padidėjimas. Ca²⁺ jungiasi prie kalmodulino, šis aktyvina CaM kinazę II, fosforilinančią HIF-1 transkripcijos komplekso ko-aktyvatorių p300 (Semenza, Shimoda ir

Prabhakar, 2006). p300 kartu su CBP (angl. *CREB-binding protein*) turi histonų acetiltransferazinį aktyvumą ir taip pat veikia kaip jungtis kitiems transkripcijos koaktyvatoriams (Lendahl ir kt., 2009).

1.1.2.3. Hipoksijos indukuojami faktoriai (HIF)

Vieni iš pagrindinių ląstelės atsako į hipoksiją veiksnių yra hipoksijos indukuojami transkripcijos veiksniai (HIF), aktyvinantys daugybės genų, susijusių su angiogenezės skatinimu, anaerobiniu metabolizmu, atsparumu apoptozei ir kitų, transkripciją. HIF'ai – heterodimeriniai baltymai, kurių sudėtyje yra vienas iš trijų nuo deguonies priklausomų alfa subvienetų (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) ir pastoviai ląstelėje sintetinamas HIF-1 β subvienetas (dar žinomas kaip ARNT (angl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)).

HIF-α subvienetai N-galinėje dalyje turi PAS ir bHLH domenus, kurie atitinkamai reikalingi dimerizacijai su HIF-β bei sąveikai su trumpa DNR seka, vadinama atsako į hipoksiją seka arba HRE (angl. *hypoxia response element*) sritimi (5'-RCGTG-3'), esančia genų promotorinėse sekose. Cgalinėje baltymo dalyje yra ODD (angl. *oxygen dependant domain*) domenas, kuris dalyvauja nuo deguonies priklausomoje HIF-α degradacijoje (1.2 pav.). HIF-1α ir HIF-2α subvienetai C-galinėje dalyje taip pat turi du transkripcijos aktyvinimo domenus - TAD-N ir TAD-C transkripcijos aktyvinimo domenai (angl. *transcription activation domain*). HIF-3α turi tik vieną transkripcijos aktyvinimo domeną (TAD-N), todėl su juo sudaromas HIF-3 kompleksas pasižymi tik silpnu transkripcijos aktyvinimu (Koh ir Powis, 2012; Lee ir kt., 2004).

Iš visų trijų hipoksijos indukuojamų veiksnių geriausiai ištyrinėtas HIF-1. Organizmo ląstelėse nuolat vyksta šio komplekso subvienetų sintezė. Aerobinėmis sąlygomis HIF-1 α yra hidroksilinamas specifinių prolilhidroksilazių (PHD) dviejose konservatyviose amino rūgšties prolino liekanose, esančiose ODD domene. Hidroksilintą HIF-1 α baltymą atpažįsta von Hippel-Lindau (pVHL) baltymas, kuris yra E3 ubikvitino ligazė. pVHL baltymas ubikvitilina HIF-1 α ir šis nukreipiamas degradacijai proteosomose (Koh ir Powis, 2012; Jaakkola ir kt., 2001). Ląstelei patekus į hipoksinę mikroaplinką, prolino liekanos, esančios HIF-1 α ODD, nehidroksilinamos, todėl šis baltymas stabilizuojasi ir keliauja į ląstelės branduolį, kur dimerizuojasi su HIF- β subvienetu. Susidaręs heterodimerinis HIF-1 kompleksas jungiasi prie HRE sekų ir aktyvina genų, reikalingų ląstelėms išgyventi nepalankiomis sąlygomis, transkripciją (Semenza, 2014; Koh ir Powis, 2012). Esant normalioms deguonies sąlygoms, HIF-1 baltymo gebėjimas aktyvinti transkripciją reguliuojamas dar ir kito nuo deguonies priklausomo fermento – veiksnio, inhibuojančio HIF-1 (FIH-1) (angl. *factor inhibiting HIF-1*). FIH-1 hidroksilina asparagino liekaną, esančią HIF-1 α baltymo TAD-C, blokuoja HIF sąveiką su transkripcijos ko-aktyvatoriais p300/CBP (angl. *E1A binding protein p300 / CREB binding protein*) ir taip slopinamas HIF transkripcinis aktyvumas (Mahon, Hirota ir Semenza, 2001).



1.2 pav. Hipoksijos indukuojamų veiksnių struktūra ir reguliacijos elementai (Martin ir kt., 2011)

HIF-1 ir HIF-2 veiksnių struktūros ir reguliacijos mechanizmai panašūs, tačiau HIF-1 yra aktyviausias trumpalaikės (2–24 h) hipoksijos metu – atsako į ūminę hipoksiją, o HIF-2 yra vėlyvojo atsako (48–72 h), t. y. atsako į lėtinę hipoksiją (Keith, Johnson ir Simon, 2012; Chen ir kt., 2018). HIF-3 veiksnys kol kas nėra gerai ištyrinėtas, todėl jo funkcija nėra visiškai apibrėžta. Vieni tyrimai rodo, kad HIF-3 α veikia reguliuodamas kitų HIF aktyvumą: gali jungtis prie HIF-1 α ir HIF-2 α bei juos slopinti, taip pat prisijungdamas prie HIF- β neleidžia prie jo prisijungti HIF-1 α ir HIF-2 α (Hara ir kt., 2001; Heikkilä ir kt., 2011). Tačiau kituose šaltiniuose nurodoma, jog HIF-3 pasižymi transkripcijos aktyvinimu. Literatūros duomenys apie šio veiksnio funkcijas yra prieštaringi.

HIF-1 α raiška nustatyta visų audinių ir ląstelių tipuose, HIF-2 α raiška yra specifinė endotelio, inkstų, kasos, kepenų, širdies, plaučių, žarnyno ir smegenų ląstelėms (Lee ir kt., 2004; Leu ir kt., 2019). HIF-3 α raiška aptinkama inkstų, plaučių epitelio, skydliaukės ir širdies ląstelėse (Ostrowski ir Zhang, 2020).

1.1.2.4. HIF ir MYC sąveika

Hipoksinėmis sąlygomis dėl deguonies trūkumo prolil-hidroksilazių aktyvumas mažėja, HIFα subvienetas stabilizuojamas. Taip pat hidroksilazių aktyvumą slopina ir ROS, susidarantys mažėjant mitochondrijų kvėpavimo efektyvumui (Brunelle ir kt., 2005). ROS oksiduoja geležies joną, esantį PHD aktyviajame centre ir taip inaktyvina šį fermentą (Lu ir kt., 2005).



1.3 pav. HIF-1, HIF-2 ir MYC baltymo-baltymo sąveikos įtaka transkripcijai (Dang ir kt., 2008)

Padidėjusi MYC onkogeno, kuris yra transkripcijos veiksnys, raiška aptinkama ~70 % žmogaus vėžio atvejų. Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis HIF-1 veiksnio atsakas į pasikeitusias ląstelės mikroaplinkos sąlygas (pvz., hipoksiją) slopina MYC aktyvumą. Tačiau padidėjus MYC baltymo sintezei, HIF gali bendradarbiauti su MYC ir taip skatinti auglio anaerobinės glikolizės fenotipą net ir normaliomis deguonies sąlygomis (Warburgo efektą) (Gordan, Thompson ir Simon, 2007).

Kaip ir MYC, HIF-1 veiksnys aktyvina visų genų, reikalingų glikolizei, raišką, tačiau skirtumas tas, jog HIF-1 aktyviai slopina mitochondrinį kvėpavimą. Manoma, kad tokio inaktyvinimo privalumas tas, kad nevykstant mitochondriniam kvėpavimui sumažėja ROS (Zhang ir kt., 2007; Shchors ir Evan, 2007).

Fiziologinėmis sąlygomis HIF-1 indukuoja MXI1 (angl. *MAX Interactor 1*) geno, kuris konkuruoja su MYC ir prisijungia MAX (angl. *MYC Associated Factor X*) baltymą, sudarydamas transkripcijos neaktyvinantį kompleksą, transkripciją. Taip pat nustatyta, kad HIF-1 α tiesiogiai jungiasi su MAX, taip išstumdamas MYC (1.3 pav.) (Dang ir kt., 2008).

Priešingai nei HIF-1 α , HIF-2 α jungiasi prie MYC-MAX komplekso ir jį stabilizuoja taip įgalindamas ląsteles dalytis hipoksinėmis sąlygomis (1.3 pav.) (Dang ir kt., 2008).

Dauguma auglių turi padidėjusią MYC raišką. Nedidelis MYC raiškos padidėjimas siejamas su apoptoze, ypač esant stresinėms sąlygoms, tokioms kaip hipoksija (nebent yra papildomų mutacijų auglį slopinančiuose genuose). Tačiau kai MYC raiška yra stipriai padidėjusi, jis nukonkuruoja HIF-1α MAX prisijungimui ir aktyvina genų transkripciją ir taip kartu su HIF-1 keičia ląstelės metabolizmą anaerobinės glikolizės linkme ir padidina laktato susidarymą (Dang ir kt., 2008).

1.1.2.5. mTOR kinazės slopinimas

Kitas svarbus atsako į deguonies pokyčius kelias yra per mTOR kinazės kompleksą.

mTOR buvo pavadintas rapamicino taikiniu žinduolių organizmuose (angl. *mamallian target of Rapamycin*). Žmogaus ląstelėse randami mTOR 1 kompleksas (mTORC1) ir 2 kompleksas (mTORC2). Nors abu mTOR kompleksai turi tris bendrus subvienetus (mTOR, mLST8 ir DEPTOR, taip pat turi ir kompleksams specifiškus komponentus. mTORC1 sudaro Raptor ir PRAS40, o mTORC2 – Rictor ir mSin1 bei Protors-1 ir Protors-2 (1.4 pav.) (Luo ir kt., 2018).

Kadangi visoms ląstelėms ir organizmams reikia koordinuoti savo metabolinį aktyvumą su pasikeitimais jų mitybos aplinkoje, ląstelėje yra signaliniai tinklai, kurie susieja maisto medžiagų ir energijos jutimą su metabolizmo reguliatoriais, kontroliuojančiais anabolinius ir katabolinius procesus. Vienas iš pagrindinių šio tinklo reguliatorių ir yra mTORC1 kompleksas, kurio aktyvumas ar jį sudarančių baltymų raiška dažnai būna pakitusi vėžio atveju (Yang ir kt., 2013). Neseniai nustatyta, jog mTORC2 taip pat dalyvauja ląstelės gliukozės ir lipidų metabolizmo reguliacijoje (Gaubitz ir kt., 2016).



1.4 pav. mTORC1 ir 2 kompleksų schema, rodanti pagrindinius jų sandaros elementus ir jų reguliuojamus procesus (Luo ir kt., 2018)

mTORC1 komplekso viena iš pagrindinių funkcijų yra lastelės baltymų sintezės skatinimas. Jis pasižymi serino ar treonino kinaziniu aktyvumu (Guertin ir Sabatini, 2007; Dibble ir Manning, 2013). Šis kompleksas reguliuoja nuo 5'-kepurės priklausoma iRNR transliacija per du tiesioginius pasrovinius (angl. downstream) taikinius: su eukariotiniu iniciacijos faktoriumi 4E (eIF4E) saveikaujančius 1 ir 2 baltymus (4E-BP1 ir 2) ir ribosomos S6 1 ir 2 kinazes (S6K1 ir 2). Didžiausia įtaka iRNR transliacijai stebima, kai E4-BP baltymai, prisijungdami prie iniciacijos veiksnio eIF4E ir neleidžia 5[•]-kepurės komplekso. susidarvti transliacijos iniciacijos kompleksui. Veiksnio E4-BP fosforilinimas atpalaiduoja juos nuo eIF4E, taip leisdamas vykti transliacijos iniciacijai (Dibble ir Manning, 2013). Šis mechanizmas ypač svarbus inicijuojant transliacija iRNR molekulių, turinčių 5'-terminalinę oligopirimidino (5'-TOP), arba į 5'-TOP panašią seką. iRNR molekulės, turinčios 5'-TOP sekas, lastelėse koduoja ribosominius baltymus ir transliacijos veiksnius. Taigi staigus šios klasės iRNR transliacijos aktyvinimas padidina lastelės baltymu sintezės paiėgumus (Iadevaia ir kt., 2012; Jefferies ir kt., 1994).



1.5 pav. mTORC1 signalinio kelio sąsajos (Dibble ir Manning, 2013)

mTORC1 signalinis kelias taip pat skatina lipidų bei nukleorūgščių sintezę, stimuliuoja gliukozės pasisavinimą ir NADPH susidarymą. mTORC1 kompleksas taip pat didina ir HIF1α iRNR transliaciją, o HIF1 veiksnys indukuoja gliukozės nešiklių ir glikolizinių fermentų raišką ir taip skatina ląstelės perėjimą nuo mitochondrijų aerobinės apykaitos prie anaerobinės glikolizės. Taip pat nustatyta, kad aminorūgščių trūkumas aktyvina mTORC1 kompleksą per Rag (angl. *recombination-activating genes*) šeimos GTPazes (Düvel ir kt., 2010; Dibble ir Manning, 2013).

mTORC1 taip galimai slopina autofagija. Autofagija pat tai daugiapakopis procesas, kurio metu membraninės struktūros, vadinamos autofagosomomis, apgaubia citozolio organeles ar makromolekules ir susiliedamos su lizosomomis jas suskaido iki pirminių mitybinių medžiagų (aminorūgščiu, nukleotidu ir pan.). Manoma, kad mTORC1 slopina autofagija tiesiogiai slopindamas ULK1 (angl. Unc-51 like autophagy activating kinase 1) – baltymų kinaze, reguliuojančia autofagosomos susidarymo pradžią. Maisto medžiagų sumažėjimas ląstelėse slopina mTORC1 aktyvuma ir šis aktyvina autofagijos slopinima (Ganley ir kt., 2009; Dibble ir Manning, 2013).

mTORC2 komplekso reikšmė mažiau ištyrinėta nei mTORC1. Nustatyta, kad mTORC2 turi pleotropinį poveikį aktyvindamas savo fosforilinimo taikinius: AGC šeimos kinazės (Saxton ir Sabatini, 2017). Šios kinazės

reguliuoja savo taikinius ir taip prasideda reguliacinė kaskada, svarbi ląstelės elgesiui ir funkcijoms (Luo ir kt., 2018).



1.6 pav. Hipoksijos sukeltas mTOR signalinio kelio slopinimas (Wouters ir Koritzinsky, 2008)

mTOR aktyvumą veikia daug teigiamų (paveikslėlyje žali) ir neigiamų (paveikslėlyje oranžiniai) veiksnių (1.6 pav.). Jo aktyvumas priklauso nuo susijungusio su GTP suleisto RHEB (angl. *Ras homolog enriched in brain*) baltymo. Duomenys rodo, kad ši sąveika gali būti slopinama BNIP3 baltymo (angl. *BCL2 / adenovirus E1B 19-kD protein-interactin protein 3*), kuris sąveikauja su Bcl-2 ir taip apsaugo nuo apoptozės ir (ar) PML auglių slopiklio (angl. *promyekicytic leukaemia tumor suppressor*) (Wouters ir Koritzinsky, 2008). PML baltymas yra lokalizuotas branduolio kūneliuose (angl. *nuclear bodies*), kur veikia kaip transkripcijos veiksnys. Šio baltymo netekimas skatina auglio progresavimą ir neoangiogenezę. PML raiška priklauso nuo ląstelės ciklo ir jis reguliuoja p53 atsaką į onkogeninius signalus (Bernardi ir kt., 2006).

Hipoksija taip pat slopina mTOR per 5' AMP aktyvinamą baltymų kinazę AMPK (angl. 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) ir REDD1-priklausomą (angl. regulated in development and DNA damage responses 1) TSC1-TSC2 komplekso reguliaciją (TSC1 ir TSC2 yra naviko slopiklių genai, kurie būna mutavę esant naviko TSC (angl. tuberous sclerosis complex) sindromui). REDD1 yra streso atsako komponentas (Katiyar ir kt., 2009). TSC1-TSC2 kompleksas pasižymi GTPazesaktyvinančio baltymo veikimu prieš RHEB, dėl to mTOR slopinamas (Wouters ir Koritzinsky, 2008).

Galiausiai hipoksija taip pat gali tiesiogiai daryti įtaką baltymų transliacijos iniciacijos procesui atskirdama EIF4E ir jo branduolio importo veiksnį 4E-T į branduolį ir citoplazminio apdorojimo kūnelius (angl. *P-bodies*) (1.6 pav.) (Wouters ir Koritzinsky, 2008).

1.1.2.6. Nesulankstytų baltymų atsakas (UPR)

UPR (angl. *unfolded protein response*), arba nesulankstytų baltymų, atsakas – ląstelinio streso atsakas, susietas su endoplazminiu tinklu (ET), kuris yra konservatyvus visų žinduolių organizmuose, taip pat mielėse ir kirmėlėse. UPR aktyvinamas, kai endoplazminio tinklo liumene susikaupia nesulankstyti arba neteisingai sulankstyti baltymai.



1.7 pav. IRE1 nesulankstytų baltymų atsako kelias (Walter ir Ron, 2011)

Šis atsakas turi du tikslus – arba atstatyti normalią funkciją stabdant baltymų sintezę ir inicijuojant signalinius kelius, kurie padidina molekulinių šaperonų sintezę, arba sukeliant apoptozę (Wouters ir Koritzinsky, 2008).

Žinomi trys pagrindiniai UPR atsako keliai, reaguojantys į baltymų sulankstymo būklę endoplazminiame tinkle – ATF6, PERK ir IRE1.



1.8 pav. ATF6 nesulankstytų baltymų atsako kelias (Walter ir Ron, 2011)

IRE1 (angl. *inositol-requiring enzyme 1* α) kelias yra konservatyviausias, ir vienintelis UPR atsako reguliatorius žemesniuosiuose eukariotuose (Mori, 2009). IRE1 yra dvifunkcė transmembraninė kinazė ar endoribonukleazė, naudojanti unikalų mechanizmą nekonvenciniam iRNR splaisingui, kad perduotų UPR signalą. Šio baltymo aktyvinimas sukelia endoribonukleazinį aktyvumą prieš XBP1 (angl. *X-box binding protein 1*) pre-iRNR, koduojančią specifinį UPR transkripcijos veiksnį. Iškerpamas sekoje esantis intronas, o likusi iRNR sujungiama. Nuo gautos iRNR transliuojamas baltymas XBP1^s, aktyvinantis specifinių ERAD (angl. *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) genų, koduojančių neteisingai sulankstytus baltymus degraduojančius fermentus, transkripciją, molekulinių šaperonų ir lipidų sintezę. Taip pat IRE1 degraduoja prie endoplazminio tinklo prisijungusią iRNR ir taip irgi sumažina ET apkrovą (1.7 pav.) (Reimold ir kt., 2001; Walter ir Ron, 2011).

ATF6 yra transkripcijos veiksnys, kuris sintetinamas kaip endoplazminio tinklo membraninis baltymas, turintis didelį ET-liuminarinį domeną. Endoplazminiame tinkle susikaupus nesulankstytiems baltymams, jie kartu su membraniniu ATF6 patenka į Goldžio aparatą, kuriame yra nukerpamas liuminarinis ir transmembraninis domenai (Schindler ir Schekman, 2009; Haze ir kt., 1999). Laisvas citozolinis N-galinis domenas (ATF6 (N)) keliauja į branduolį, kur aktyvina UPR genų transkripciją (1.8 pav.) (Walter ir Ron, 2011).



1.9 pav. PERK nesulankstytų baltymų atsako kelias (Walter ir Ron, 2011)

PERK yra endoplazminio tinklo transmembraninė kinazė. Esant ET stresui, ji aktyvinasi, oligomerizuojasi ir autofosforilina save bei transliacijos iniciacijos veiksnį eIF2α, taip netiesiogiai slopindama eIF2 veikimą, kas sukelia visos iRNR transliacijos sustabdymą. Tokiu būdu PERK sumažina baltymų, patenkančių į ET, kiekį ir mažina ET stresą. Tačiau kai kurios iRNR, turinčios trumpus atviro skaitymo rėmelius 5' netransliuojamose srityse, transliuojamos pirmiau, būtent, kai eIF2 yra ribojamas. Viena iš tokių iRNR koduoja transkripcijos faktorių ATF4, kuris padidina GADD34

(angl. growth arrest and DNA damage-inducible protein) baltymo, reguliuojančio fosfatazinį aktyvumą prieš EIF2a (angl. eukaryotic translation initiation factor 2A) ir CHOP (angl. C/EBP-homologous protein) (transkripcijos veiksnys, aktyvinantis su apoptoze siejamus genus), transliaciją.

Taigi PERK reguliacijos kelias apsaugo ET nuo apkrovos esant vidutiniam stresui, bet gali prisidėti ir prie ląstelės apoptozės aktyvinimo (1.9 pav.) (Tsaytler ir kt., 2011; Walter ir Ron, 2011).

1.1.2.7. Aktyvios deguonies formos (ROS)

ROS (angl. *reactive oxygen species*) – tai chemiškai aktyvūs deguonies junginiai, turintys nesuporuotą elektroną išorinėje orbitalėje. ROS gali egzistuoti dviem formomis: arba kaip laisvas deguonis (superoksidas, nitrooksidas, hidroksilo radikalas ir t. t.), arba kaip neradikalinis elementas (singuletinis deguonis, ozonas, vandenilio peroksidas ir t. t.) (Chatterjee ir Chatterjee, 2020). Pagrindinis jų šaltinis ląstelėje yra mitochondrijos. ROS ląstelėje pažeidžia visas pagrindines makromolekules – lipidus, baltymus, nukleorūgštis.

ROS taip pat veikia ir kaip signalinės molekulės, tačiau jų atpažinimas vyksta ne makromolekuliniu, bet atominiu lygmeniu. ROS signaliniai keliai ląstelėse naudoja ROS sensorius, nustatančius viduląstelinę ROS koncentraciją redukcija-oksidacija (angl. *redox*) paremtu mechanizmu ir proporcingai reguliuojančius ROS specifinių molekulinių gaudyklių (angl. *scavengers*) raišką taip palaikydami ROS koncentraciją žemiau toksiškumo ribos.

ROS, kurie susidaro esant maisto medžiagų trūkumui arba hipoksijai, stimuliuoja autofagiją (1.10 pav.). Autofagijai stimuliuoti naudojami keli signaliniai keliai. Dėl ROS sukeltos oksidacijos ir Atg4A (angl. *Cysteine protease ATG4A*) cisteino proteazės inaktyvinimo susikaupia su fosfatidiletanolaminu konjuguoto LC3 (angl. *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) baltymo, skatinančio autofagiją (Scherz-Shouval ir kt., 2007).

Autofagijos skatinimas hipoksijos metu taip pat sukeliamas per mTOR slopinimą. ROS slopina mTOR aktyvindamos TSC2 (angl. *tuberous sclerosis complex-2*) per ATM (angl. *ataxia telangiectasia mutated*) bei REDD1 per HIF-1α, turintį svarbų vaidmenį slopinant mTORC1 signalinį kelią hipoksinio streso metu (Eng ir Abraham, 2011).

HIF-1α stabilizavimas skatina mitochondrijų autofagiją – indukuojama BNIP3/BNIP3L (angl. *BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting*

protein 3) transkripcija ir baltymo sintezė, kurios produktas sąveikauja su Bcl-2 (angl. *apoptosis regulator Bcl-2*), nebegalinčiu susijungti ir slopinti Benclin-1, o šis baltymas dalyvauja formuojantis autofagosomoms (Eng ir Abraham, 2011).



Galiausiai hipoksija skatina autofagiją ir per HIF-1 nepriklausomą kelią, kuomet nuo PERK priklausomi transkripcijos faktoriai ATF4 ir CHOP, kurie svarbūs autofagosomų formavimuisi (Eng ir Abraham, 2011), indukuoja Atg5 (angl. *autophagy protein 5*) ir LC3 transkripciją.

Autofagijos aktyvinimas, sukeltas hipoksijos ir ROS, gauna kontrolinį atgalinį ryšį, kuomet pašalinamos pažeistos mitochondrijos ir taip sumažinamas ROS kiekis (Eng ir Abraham, 2011).

1.2. Eukariotinės RNR susidarymas

Eukariotinių ląstelių genų raiška labiausiai reguliuojama transkripcinės ir potranskripcinės kontrolės metu. Daugumos genų raiška reguliuojama transkripcijos iniciacijos metu, tačiau transkribuota RNR molekulė dar turi pereiti tris brendimo stadijas, kad būtų gauta funkcionali, subrendusi informacinės RNR (iRNR) molekulė.

Pirma brendimo stadija prasideda, kai RNR polimerazė II nuo genominės DNR nuskaito apie 30 nukleotidų. Tuomet prie pre-iRNR (nesubrendusi

iRNR molekulė) 5' galo prijungiamas 7-metilguanozino trifosfatas (kepurė, angl. *cap*). Kepures prijungimas syarbus apsaugant sintetinama pre-iRNR molekule nuo degradacijos ribonukleazėmis (RNazėmis) ir efektyviai baltymo sintezės iniciacijai. Antra brendimo stadija laikoma poliadenilinės uodegos prijungimas. Tai seka, susidedanti iš 20-250 adenino liekanų. Ji jungiama prie daugumos eukariotu genu transkriptu, išskvrus kai kuriu histonų ir U7 snRNP sudarančių iRNR. Poliadenilinė uodega prijungiama pabaigus pre-iRNR transkripcija 3' gale, palaiko pre-iRNR stabiluma, vra reikalinga iRNR pernašai iš branduolio į citoplazmą bei iRNR transliacijai. Trečia eukariotu iRNR molekuliu brendimo stadija vra pre-iRNR splaisingas. Dauguma eukariotu genu vra sudarvti iš koduojančiu seku egzonų ir tarp jų įsiterpusių nekoduojančių sekų – intronų. Splaisingo metu intronai yra pašalinami, o egzonai sujungiami. Splaisingas yra labai tikslus procesas. ivvkus net menkiausiam pokvčiui gali susidarvti nes nefunkcionalūs baltymai (Lodish, 2000; Matlin, Clark ir Smith, 2005).

Toks sudėtingo genų raiškos mechanizmo susiformavimas suteikia eukariotams privalumų: splaisingo metu, kombinuojant įvairią to paties geno koduojamą informaciją, sukuriamos skirtingos baltymo izoformos. Tai leidžia eukariotams sėkmingai evoliucionuoti net turint žymiai mažesnį dauginimosi greitį nei prokariotai. Taip pat intronų buvimas geno viduryje sumažina galimybę pašaliniams elementams įsiterpti į koduojančią geno dalį, padidina atstumą tarp egzonų, o tai sumažina tikimybę, jog tarpegzoninė rekombinacija pakeis skaitymo rėmelį.

1.3. pre-iRNR splaisingas

RNR splaisingas yra sudėtingas reguliuojamas procesas, kuris yra svarbus reguliuojant genų raišką ir baltymų įvairovei. Splaisingas vyksta kotranskripciškai, t. y. kol pre-iRNR yra prisijungusi prie chromatino per RNR polimerazę II (Brody ir Shav-Tal ir kt.; Khan, Jahan ir Davie, 2012). Žmogaus ląstelėse apytiksliai 95 % multiegzoninių genų turi alternatyviai splaisinguojamus variantus (Hnilicova ir kt., 2011). Pasiūlyti du pagrindiniai modeliai, kaip transkripcija veikia splaisingą: kinetinis modelis ir pritraukimo (angl. *recruitment*) modelis (Muñoz, de la Mata ir Kornblihtt, 2010). Pagal kinetinį modelį, RNR polimerazės elongacijos greičio kitimas moduliuoja splaisingo taikinių atpažinimo efektyvumą ir taip nulemia alternatyvių egzonų įjungimą ar praleidimą (de la Mata ir kt., 2003). Pritraukimo modelis teigia, kad splaisingas ir transkripcija yra susiję fizine bei funkcine sąveika tarp RNR polimerazės II CTD ir pre-iRNR splaisingo veiksnių (Kornblihtt ir kt., 2004; Khan, Jahan, ir Davie, 2012).

Nekoduojančių introninių seku pašalinimas iš pre-iRNR eukariotuose yra dvipakopis procesas. Jis vyksta dviem, viena po kitos vykstančiomis, transesterifikacijos reakcijomis. Yra išskiriami du splaisingo būdai: savaiminis ir reguliuojamas (Lodish, 2000). Savaiminio splaisingo metu intronų iškirpimą katalizuoja pačios RNR molekulės, o reguliuojamos abi reakcijos vra katalizuojamos splaisosomos _ didelio (~ 60S) ribonukleobaltyminio (RNP, angl. *ribonucleoprotein*) komplekso. Splaisosomos susirinkimas ant pre-iRNR vyksta susidarant keliems kompleksams ir vra reguliuojamas labai konservatyviu seku - 5' ir 3' splaisingo taikinių bei kitų sekų, esančių pre-iRNR (Black, 2000; Maniatis ir Tasic, 2002; Kent ir kt., 2003). Savaiminis splaisingas vra būdingas eubakterijoms, archėjoms, žemesniuju eukariotu branduoliui ir organelėms bei aukštesniuju eukariotu organelėms, o reguliuojamas splaisingas vyksta eukariotinių ląstelių branduolyje.

1.3.1.Savaiminis pre-iRNR splaisingas

Savaiminiame splaisinge dalyvaujančios introninės sekos skirstomos į keturias grupes: I, II ir III grupės intronus ir tRNR splaisingą (Sharp, 1985; Lodish, 2000). I grupės intronai randami eubakterijų, archėjų, žemesniųjų eukariotų branduolio ir organelių bei aukštesniųjų eukariotų organelių preiRNR molekulėse (Sharp, 1985). I grupės intronams iškirpti reikalingas egzogeninis guanozino nukleotidas ir metalų jonai. Savaiminio splaisingo reakciją inicijuoja nukleotido ribozės 3°-OH grupė, kuri nutraukia ryšį tarp pirmojo egzono ir introno fosfatinės grupės.

Guanozinas sujungiamas su intronu, o pirmojo egzono gale lieka laisva ribozės 3'-OH grupė, kuri suardo ryšį tarp introno ir antrojo egzono. Intronas atpalaiduojamas, o egzonai susijungia 3'-5' fosfodiesteriniu ryšiu (1.11 pav. A) (Lodish, 2000).

III grupės intronai atrasti eugleninių protistų chloroplastuose. Jų splaisingas taip pat vyksta dviem transesterifikacijos reakcijomis, tačiau mažai žinoma apie jų veikimo mechanizmą (Hong ir Hallick, 1994).

II grupės intronai randami prokariotų, grybų ir augalų mitochondrijose bei chloroplastuose ir turi konservatyvią struktūrą Jų splaisingą inicijuoja adenozino nukleotido, esančio šakojimosi taške, ribozės 2'-OH grupė, kuri suardo tarp pirmojo egzono ir introno esantį 3'-5' fosfodiesterinį ryšį. Susidaro kilpinė tarpinė introno – egzono struktūra. Likusi laisva pirmojo egzono 3'-OH galinė seka suardo 3'-5' fosfodiesterinį ryšį tarp introno ir antro egzono. Abu egzonai susijungia, ir atpalaiduojama kilpinės formos introno struktūra (1.11 pav B) (Lodish, 2000).



1.11 pav. I (A) ir II (B) grupės intronų iškirpimo schema (Biosciences Virtual Libruary)

tRNR splaisingas vyksta bakterijose, archėjose ir eukariotuose. Bakterijose tRNR intronai pašalinami savaiminio splaisingo būdu. Archėjose ir eukariotuose jis yra katalizuojamas trijų fermentų ir jam vykti reikalinga ATP hidrolizė. Mielėse *S. Cerevisiae* tRNR splaisingas vyksta trimis etapais: pirmiausia endonukleazė perkerpa pre-tRNR per dvi splaisingo taikinio vietas. Šios reakcijos produktai yra dvi pusinės RNR molekulės ir linijinis intronas. Dvi pusinės RNR molekulės sujungiamos katalizuojant 90-kDa ligazei ir sunaudojama viena ATP molekulė. Splaisingo vietoje lieka prijungtas 2'-PO₄, kurį pašalina trečiasis fermentas – (NAD) priklausoma fosfotransferazė (Abelson, Trotta ir Li, 1998).

1.3.2.Reguliuojamas splaisingas

Reguliuojamas pre-iRNR splaisingas katalizuojamas ribonukleobaltyminio komplekso – splaisosomos. Šiuo metu aprašytos dvi splaisosomos: U2 ir U12.

1.3.3.U2 splaisosomos kompleksas

U2 splaisosoma randama visose eukariotų ląstelėse ir laikoma pagrindine pašalinant intronų sekas. Ši splaisosoma susideda iš daug uridino turinčių mažų branduolio ribonukleobaltyminių dalelių (snRNP) (angl. *small nuclear ribonucleoprotein*) (U1, U2, U4, U5 ir U6) ir daugiau nei 100 pagalbinių baltymų (Wahl, Will ir Lührmann, 2009). Kiekvieną iš snRNP dalelių sudaro unikalios, apie 150 nukleotidų ilgio mažosios branduolio RNR (snRNR) (angl. *small nuclear RNA*), septyni bendri snRNP formuojantys baltymai ir keletas papildomų kiekvienai dalelei būdingų baltymų (Azubel ir kt., 2004).

Vieni iš papildomų baltymų yra SR (angl. *serine / arginine rich proteins*), $U2AF^{65}$ ir $U2AF^{35}$ (angl. *U2 auxiliary factor*), SF1 (angl. *splicing factor 1*) ir kiti (Maniatis ir Tasic, 2002).

Splaisosomos komponentai atpažįsta trumpas konservatyvias 5' ir 3' taikinių sekas egzonuose ir intronuose bei šakojimosi taško sekas ir polipirimidinines sekas intronuose. Nustatyta, kad konsensinė 5' splaisingo taikinio seka žinduolių organizmuose yra AG/GURAGU (R – purino nukleotidas, / – taikinio vieta (egzono – introno riba)). Šakojimosi taško konsensinė seka yra YNYURAC (Y – pirimidino nukleotidas, R – purino nukleotidas, N – bet koks nukleotidas, A – šakojimosi taške esantis adeninas) (1.12 pav.). Tačiau kartais šios sekos labai skiriasi nuo konsensuso. Nors nukleotidai, esantys prie splaisingo taikinių, pasiskirsto didesniu nei atsitiktiniu dažniu, beveik nekintami yra tik intronų 5' GU ir 3' AG nukleotidai. Aukštesniųjų eukariotų intronuose, tarp splaisingo šakojimosi taško ir 3', taip pat būdingas svarbus elementas – polipirimidininė seka, sudaryta iš pasikartojančių pirimidino nukleotidų, kurios neturi žemesnieji eukariotai (pvz., mielės) (1.12 pav.).



1.12 pav. U2 intronų signalinės splaisingo sekos gyvūnų ir mielių pre-iRNR molekulėse (Wahl, Will ir Lührmann, 2009)

Be šių elementų (šakojimosi taško, polipirimidininės sekos), taip pat reikalingi *cis*- (esantys RNR sekoje) ir *trans*- (ląsteliniai veiksniai, baltymai ir RNR) reguliaciniai elementai (Wahl, Will ir Lührmann, 2009). *Cis*- veikiantys elementai, dar žinomi kaip splaisingo stiprikliai (angl. *enhancers*) ir slopikliai (angl. *silencers*), vaidina svarbų vaidmenį susirenkant splaisosomos kompleksą ir pasirenkant splaisingo taikinį. Jie dalyvauja tiek pastovaus, tiek alternatyvaus splaisingo mechanizmuose. *Trans*- veikiantys veiksniai, tokie kaip daug serino ar arginino turintys (SR) baltymai arba hnRNP (angl. *heterogenous nuclear ribonucleoproteins*), U2 pagalbinis veiksnys (angl. *U2 auxiliary factor, U2AF*) gali sąveikauti su splaisosomos kompleksu, *cis*- veikiančiais elementais arba baltymais, prisijungusiais prie *cis*- veikiančių elementų, ir taip kontroliuoti splaisingo rezultatą (Black, 2003; Ule ir Blencowe, 2019; Biamonti ir kt., 2019).



1.13 pav. Pre-iRNR splaisingo mechanizmo schema (Lodish, 2000)

Intronai iš pre-iRNR pašalinami vykstant dviem nuoseklioms transesterifikacijos reakcijoms (1.13 pav.). Pirmos splaisingo stadijos metu šakojimosi sekoje esančio adenozino ribozės 2°-OH grupė atakuoja tarp pirmo egzono ir introno esančią 3°,5°-fosfodiesterinio ryšio fosfatinę grupę. Ryšys nutrūksta ir susidaro 5° egzonas su laisva 3°-gale esančio guanozino ribozės 3°-OH grupe ir tarpinė struktūra – 3° egzonas su prijungta kilpos formos intronine seka, kurios 5°-galas sujungtas su šakojimosi sekoje esančiu adenozinu. Antros splaisingo stadijos metu pirmojo 5° egzono 3°-gale esančio guanozino nukleotido ribozės 3°-OH grupė atakuoja

fosfodiesterinio ryšio tarp introno ir antrojo egzono fosfatinę grupę. Ryšys tarp introno ir antrojo egzono nutrūksta, ir egzonai sujungiami 3'5'-fosfodiesteriniu ryšiu, o kilpos formos intronas atpalaiduojamas (Lodish, 2000; Gesteland, Cech ir Atkins, 2006; Izquierdo ir Valcárcel, 2006; Rymond, 2007).

1.3.3.1. U2 splaisosomos komplekso susirinkimas

Splaisosoma atlieka dvi pagrindines funkcijas – atpažįsta 5[°] ir 3[°] taikinių sritis bei katalizuoja reakcijas, kurių metu intronai pašalinami, o egzonai sujungiami. Splaisosomą sudaro penkios snRNP (U1, U2, U4, U5, U6) ir papildomi baltymai. Splaisosomos susirinkimo pradžioje prie 5[°] egzono sekos jungiasi SR baltymai, kurie pritraukia U1 snRNP prie 5[°] taikinio sekos (1.14 pav.). Su šakojimosi taško seka sąveikauja splaisingo faktorius SF1/BBP (angl. *splicing factor 1/branching point binding protein*). Prie polipirimidininės sekos ir 3[°] taikinio sekos prisijungus heterodimeriniam baltymui U2AF, susiformuoja ankstyvasis splaisosomos kompleksas, dar vadinamas E (angl. *early*) kompleksu. E kompleksui susidaryti nereikalinga energija – tai nuo ATP hidrolizės nepriklausomas procesas.



U2 snRNP stabiliai prisijungus prie šakojimosi vietos. E kompleksas virsta A kompleksu. Šis procesas daug greitesnis ir jam jau reikalinga energija, gaunama ATP hidrolizės metu. Komplementari bazių saveika tarp U2 snRNR ir šakojimosi taško lemia RNR/RNR duplekso susidaryma, kuriame šakojimosi sekoje esantis adenozinas neturi jam komplementaraus nukleotido ir vra išstumiamas. Po išstūmimo susidariusi saveika daro itaka adenozinui tapti nukleofilu 5' kerpant taikinio seka. Toliau į splaisosomos kompleksa isijungia dalelė, sudaryta iš trijų snRNP (U4/U6 ir U5). Dėl stipraus komplementarumo U4 ir U6 dalelės sąveikauja tarpusavyje. Splaisosomos komplekse įvyksta struktūriniai persitvarkymai, kurių metu atpalaiduojami U1 snRNP ir U2AF baltymas, ir kompleksas A virsta kompleksu B. Tai taip pat nuo ATP hidrolizes priklausomi procesai. Toliau RNR/RNR dupleksas tarp U4 ir U6 snRNP disocijuoja, U4 snRNP atpalaiduojama, U6 snRNP per U6 snRNR saveikauja su U2 snRNP. U5 snRNP saveikauja su 5' ir 3' splaisingo taikinių sekomis. Ivyksta konformaciniai pokyčiai, susiformuoja C kompleksas – aktyvi splaisosoma. Po to, kai intronas iškerpamas, splaisosoma disocijuoja ir snRNP dalelės isijungia i kitus splaisosomos kompleksus (Lodish, 2000; Maniatis ir Tasic, 2002; Gesteland, Cech ir Atkins, 2006).

1.3.4.U12 splaisosomos kompleksas

Be splaisosomos, priklausomos nuo U2 snRNP, atrasta ir kita, nuo U12 snRNP priklausoma (arba minorinė) splaisosoma (1.15 pav.). U12 tipo intronai nėra randami *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisae*, *Schizosaccharomyces pombe* ir protistuose.

Žmogaus ląstelėse U12 tipo intronų yra mažiau nei 1 % iš visų egzistuojančių intronų, tačiau jie randami genuose, kurie atsakingi už gyvybiškai svarbias ląstelės funkcijas: DNR replikaciją ir reparaciją, transkripciją, RNR apdorojimą ir transliaciją (Will ir Lührmann, 2005). Vienas iš pavyzdžių yra natrio kanalo α subvieneto genas, randamas žmogaus organizme ir medūzose, organizmuose, kurie evoliuciškai išsiskyrė daugiau nei prieš 600 milijonų metų (Patel, McCarthy ir Steitz, 2002).

Daugumą U12 tipo intronų charakterizuoja mažiau kintančios intronų atpažinimo sekos 5' gale ir šakojimosi taške bei polipirimidininės introno sekos nebuvimas. Kadangi pirmiau buvo atrasti AT-AC introną galinėse sekose ribojantys nukleotidai, ši splaisosoma anksčiau buvo vadinama *atac* splaisosoma. Vėlesni tyrimai vis dėlto parodė, jog tokie nukleotidai (nors ir labai retai) būna ir U2 tipo intronuose. Būtent todėl pasirinktas U12 nomenklatūrinis pavadinimas (Patel ir Steitz, 2003).
U12 splaisosoma susideda iš U11, U12, U5 ir U4atac/U6atac snRNP bei iš nežinomo skaičiaus ne snRNP baltymų (Hall ir Padgett, 1996). Taigi iš visų splaisosominių subvienetų tik U5 yra bendras abiem splaisosomoms. U2 ir U12 splaisosomų susirinkimo keliai yra mechaniškai labai panašūs, o pagrindiniai skirtumai matomi per ankstyvąjį splaisosomos susidarymo etapą – U12 splaisosoma nesudaro E komplekso (1.15 pav.).



1.15 pav. U2 ir U12 splaisosomų susirinkimo ir katalizės keliai (Patel ir Steitz, 2003). Dvi transesterifikacijos reakcijas žymi mėlynos rodyklės; polipirimidininė sritis pažymėta geltonai.

1.3.5. Alternatyvusis splaisingas

Žmogaus organizme daugiau nei 95 % pre-iRNR vyksta alternatyvusis splaisingas. Alternatyviojo splaisingo metu kai kurie egzonai būna arba

praleidžiami, arba įjungiami į RNR seką, taip susidarant skirtingoms subrendusioms iRNR. Nustatyta keletas skirtingų alternatyviojo splaisingo būdų: egzonų praleidimas arba įtraukimas, alternatyvūs promotoriai, alternatyvios 5' arba 3' splaisingo taikinių vietos, priklausomai praleidžiami egzonai, introno palikimas ir alternatyvios poliadenilinimo sekos (1.16 pav.) (Nakayama ir Kataoka, 2019; Wang ir kt., 2015).



1.16 pav. Alternatyvaus splaisingo rūšys (Wang ir kt., 2015). Įvairios egzonų kombinacijos gali sudaryti įvairias iRNR ir baltymus. Kvadratais žymimos egzoninės sekos, brūkšniais introninės. Baltos spalvos kvadratai žymi pastovius egzonus, pilkos – alternatyvius.

Alternatyvaus splaisingo reguliacija – kompleksiškas procesas, kuriame dalyvauja *cis* ir *trans* veiksniai. Įvairūs veiksniai, tokie kaip SR baltymai ar hnRNP, reguliuoja intronų pašalinimą ar palikimą, sąveikaudami su introninėmis ar egzoninėmis splaisingo slopiklių ar stipriklių sekomis (Kim ir kt., 2018). Smegenų ląstelės turi neįprastai didelę dalį alternatyviame splaisinge dalyvaujančių genų, todėl smegenų ląstelėse susidaro didesnė

baltymų įvairovė lyginant su kitais audiniais (Porter, Jaamour ir Iwase, 2018).

1.3.6.FAS alternatyvaus splaisingo reguliacija

FAS (angl. tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, CD95) baltymas vra lastelės paviršiaus receptorius, gebantis jungtis su FASL ligandu ir inicijuoti apoptoze lastelėse (Bouillet ir O'Reilly, 2009). Šis baltymas vra koduojamas FAS geno, sudaryto iš 9 egzonu. Iš FAS per-iRNR alternatyviojo splaisingo būdu susidaro 4 i baltymus transliuojamos iRNR, iš kurių pagrindinės vra pilno ilgio (FAS) izoforma ir trumpesnė, neturinti 6 egzono, koduojančio transmembranini domena, sFAS izoforma. sFAS baltymas yra sekretuojamas už lastelės ribu, kur taip pat prisijungia FASL liganda, tačiau negali aktyvinti apoptozės kelio ir taip prisideda prie lastelės išgyvenamumo nepalankiomis mikroaplinkos salvgomis (Cascino ir kt., 1995; Cheng ir kt., 1994; Sheen-Chen ir kt., 2003). Kadangi navikuose padidėjus sFAS raiška, FAS alternatyvusis splaisingas aptinkama potencialiai vaidina svarbų vaidmenį vėžinių ląstelių išgyvenamumui. Todėl jo reguliacija išsamiai tyrinėjama. Nustatyta keletas veiksnių, galinčių turėti itakos FAS alternatyvaus splaisingo reguliacijai normaliomis deguonies salygomis kultivuotose lastelėse: HuR, TIA-1, PTB, RBM 10 ir RBM 5.

HuR (angl. *hu-antigen R, ELAVL1*) – skatina *FAS* 6 egzono išmetimą jungdamas prie egzoninio splaisingo slopiklio (Izquierdo, 2008).

TIA-1 (angl. *nucleolysin TIA-1 isoform p40*) yra su RNR besijungiantis baltymas, turintis tris RNR atpažinimo motyvus (angl. *RNA recognition motif, RRM*). Branduolyje TIA-1 veikia kaip splaisingo reguliatorius. Jis skatina U1 snRNP prisijungimą prie silpnų 5' splaisingo taikinio seku, taip pat skatina U2AF prisijungimą prie 3' splaisingo taikinio sekos (Izquierdo ir kt., 2005).

PTB (angl. *polypyrimidine tract binding protein*) sąveikauja su polipirimidinine seka, todėl dėl sąveikos su RNR konkuruoja su U2AF65.

RBM10 (angl. *RNA-binding protein 10*) ir jo artimas homologas RBM5 (angl. *RNA-binding protein 5*) – branduoliniai prie RNR besijungiantys baltymai. Tiek RBM5, tiek RBM10 padidinta raiška skatina 6 egzono praleidimą *FAS* pre-iRNR (Inoue ir kt., 2014).

1.3.7.*TAU* alternatyvaus splaisingo reguliacija ir neurodegeneracinės ligos

Pre-iRNR splaisingas daugelyje neurodegenaratyvinių ligų, tokių kaip Alzheimerio ir Parkinsono, yra pakitęs. Sveikų ir sergančių žmonių transkriptomo palyginimas leido nustatyti šioms ligoms specifinius splaisingo pakitimus (Ray ir kt., 2018; Tollervey ir kt., 2011).



1.17 pav. *TAU* alternatyvaus splaisingo schema ir sąveika su mikrovamzdeliais (Vingtdeux, Sergeant ir Buee, 2012)

Žmogaus *TAU* baltymas (arba τ baltymas (pagal graikiškos raidės "tau" pavadinimą); angl. *neurofibrillary tangle protein*), koduojamas *MAPT* (angl. *microtubule-associated protein TAU*) geno, esančio 17-toje chromosomoje. *MAPT* geną sudaro 16 egzonų. 2, 3 ir 10 egzonų alternatyvus splaisingas lemia šešių skirtingų *TAU* iRNR izoformų susidarymą, kurių raiška vyksta suaugusio žmogaus smegenyse (Park, Ahn ir Gallo, 2016). *TAU* baltymas jungiasi prie mikrovamzdelių per mikrovamzdelių jungimosi domeną, susidedantį iš mikrovamzdelių prijungimo domeno pasikartojimų. 10 egzonas koduoja antrą mikrovamzdelių prisijungimo pasikartojantį domeną, ir taip alternatyviojo splaisingo būdu susidaro *TAU* izoformos, turinčios tris (3R) arba keturis (4R) domenus, prijungiančius mikrovamzdelius (1.17 pav.). *TAU* 4R izoforma turi didesnį giminingumą mikrovamzdelių sąrankai nei *TAU* 3R izoforma (Goode ir kt., 2000).

Nustatyta, kad normaliomis fiziologinėmis sąlygomis suaugusio žmogaus smegenyse sintetinami vidutiniškai vienodi *TAU* 4R ir 3R izoformų kiekiai, ir tokia pusiausvyra labai svarbi neuronų funkcijoms palaikyti. Šios pusiausvyros sutrikdymas yra pakankamas sukelti neurodegeneraciją (Andreadis, 2005; D'Souza ir Schellenberg, 2005; Liu ir Gong, 2008; Niblock ir Gallo, 2012).

Literatūroje rašoma, kad SR šeimos baltymai dalyvauja alternatyviojo *TAU* 10 egzono splaisingo reguliacijoje. Kiekvienas SR baltymas veikia *TAU* alternatyvųjį splaisingą skirtingai: SRSF1, SRSF2, STSF6 ir SRSF9 skatina 10 egzono įtraukimą, o SRSF3, SRSF4, SRSF7 ir SRSF11 – slopina (Qian ir Liu, 2014).

1.3.8.U2AF

U2AF yra vienas iš splaisingo veiksnių, dalyvaujančių ankstyvajame splaisosomos susirinkimo etape. U2 pagalbinis veiksnys (angl. *U2 auxiliary factor*) atpažįsta pre-iRNR 3' splaisingo taikinio seką ir koordinuoja pradinius splaisosomos susirinkimo etapus (Sickmier ir kt., 2006). Tikslus 3' splaisingo taikinio atpažinimas kritiškai svarbus iRNR splaisingui. Nustatyta, kad pusė žmogaus genetinių ligų yra klaidingai atpažįstamų splaisingo taikinių pasekmė (Garcia-Blanco, Baraniak ir Lasda, 2004).

U2AF – heterodimerinis baltymas, sudarytas iš dviejų subvienetų, didžiojo 65 kDa ir mažojo 35 kDa. Didysis subvienetas (U2AF65) atpažįsta svarbią polipirimidininę sritį, esančią pre-iRNR grandinėje.

Mažasis subvienetas (U2AF35) per savo RS domeną jungiasi prie regiono, esančio prie U2AF65 N-galinio RS domeno, ir per savo RRM domeną prie AG dinukleotido, esančio introno – egzono 3' taikinio sekoje (Merendino ir kt., 1999; Zorio ir Blumenthal, 1999; Garcia-Blanco, Baraniak ir Lasda, 2004). U2AF65 sąveikauja su prie šakojimosi taško prisijungiančiu baltymu SF1 per RRM3 domeną bei su introne esančia polipirimidinine seka per RRM1 ir RRM 2 domenus ir išlenkia RNR taip, kad šakojimosi taško nukleotidas atsiduria priešais 3' splaisingo taikinio seką. Taip introno 3' splaisingo taikinio sritis įgauna struktūrą, panašią į pre-splaisosomos E komplekso (1.18 pav.) (Kent ir kt., 2003).

Tuo pat metu, kai prie RNR prisijungia U2AF-SF1 kompleksas, U1 snRNP prisijungia prie 5' splaisingo taikinio. Šio ankstyvojo komplekso

susiformavimas išdėsto šakojimosi taško seką, 5° ir 3° splaisingo taikinius į struktūrinę konformaciją, leidžiančią vykti kitiems splaisingo etapams (Kent ir kt., 2003; Sickmier ir kt., 2006).

Toliau U2 snRNP su šakojimosi taško seka ir U2AF suformuoja nuo ATP priklausomą kompleksą, o SF1 atsijungia. Stabiliam U2 prisijungimui reikalingas U2AF65 N-galinis RS domenas ir RNP-išsukikliai tokie kaip su U2AF susietas 56kDa baltymas (UAP56, angl. *U2AF associated protein 56 kDa*). Galiausiai U2AF atpalaiduojamas nuo pre-iRNR prieš aktyvios splaisosomos katalizuojamą splaisingo reakciją (Fleckner ir kt., 1997; Shen, Kan ir Green, 2004; Sickmier ir kt., 2006).



1.18 pav. 3' splaisingo taikinio struktūrinė schema (Kent ir kt., 2003). RRM – RNR atpažinimo motyvai, RS – serino-arginino dipeptidų turintys domenai, PPT – polipirimidininė seka.

U2AF65 po transliacijos yra modifikuojamas. Viena iš modifikacijų – lizino hidroksilinimas, kurį vykdo Jmjd6 baltymas (angl. Fe(II) and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase Jumonji domain-6 protein). Literatūroje teigiama, kad Jmjd6 daro įtaką alternatyviam α -tropomiozino ir endogeninio auglio antigeno MGEA6 (angl. melanoma inhibitory activity protein 2) RNR splaisingui (Webby ir kt., 2009).

Abu U2AF subvienetai priklauso RS domeną turinčių baltymų šeimai. Literatūroje teigiama, kad RS domenas būtinas U2AF sąveikai su polipirimidinine seka (Rudner ir kt., 1998). Taip pat nustatyta, kad SR baltymų kinazės SRPK1 ir Clk/Sty gali fosforilinti U2AF RS domeną *in* *vitro* ir taip reguliuoti jo sąveiką su RNR bei kitais splaisingo veiksniais (Colwill ir kt., 1996; Vilys, 2021).

1.3.9. Alternatyvusis splaisingas ir hipoksija

Alternatyvusis splaisingas ląstelėje turi reguliacinę funkciją, leidžiančią palaikyti audiniams specifinę genų raišką, ir labai padidina genominį kompleksiškumą. Hipoksinėse ląstelėse pre-iRNR splaisingas yra svarbus audiniams prisitaikant prie hipoksinės ląstelės mikroaplinkos (David ir Manley, 2010).

Pirmasis nuo hipoksijos priklausomo splaisingo atvejis atrastas pelės akies ragenos epitelio ląstelėse, kur iš HIF-3 α pre-iRNR alternatyvaus splaisingo būdu susidaro inhibitorinį PAS domeną turinčio baltymo (IPAS) iRNR. IPAS baltymas nesąveikauja su HIF- β subvienetu, tačiau jungiasi prie HIF-1 α subvieneto ir taip slopina komplekso aktyvinamą transkripciją (Makino ir kt., 2002; 2001). Vėliau rastas dar vienas hipoksijos indukuojamas pelės HIF-3 α geno splaisingo variantas – NEPAS (angl. *neonatal and embryonic PAS*), kurio raiška iš esmės vyksta embrioninėse stadijose. Šio splaisingo varianto pirmasis HIF-3 α pre-iRNR egzonas pakeičiamas IPAS pirmuoju egzonu (Yamashita ir kt., 2008).

Pastaruoju metu žmogaus ląstelėse taip pat nustatomi hipoksijos indukuojamo alternatyvaus splaisingo atvejai. Hipoksiją mimikuojančiomis sąlygomis (naudojant CoCl₂) žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelėse (HUVEC) naudojant egzonų mikrogardelę nustatyti 342 egzonai, dalyvaujantys alternatyviame splaisinge (Hang ir kt., 2009). Kita mokslininkų grupė, naudodama panašią sistemą žmogaus kepenų ląstelių linijoje, nustatė, jog hipoksinė ląstelės mikroaplinka sukelia 3 059 alternatyvaus splaisingo įvykius 2 005 genuose (Sena ir kt., 2014).

Be to, kad HIF-1 yra svarbus ląstelės atsake į hipoksiją, nustatyta, jog HIF-1 α ir HIF-3 α pre-iRNR vyksta ir alternatyvus splaisingas, kurio metu kai kurie susidarę transkriptai koduoja priešingą funkciją atliekančius baltymus (Dales ir kt., 2010; Heikkilä ir kt., 2011).

Karboanhidrazė IX (CA-IX, angl. *carbonic anhydrase IX*) yra viena iš 12 aktyvių karboanhidrazės formų, sintetinamų žmogaus organizme. Dauguma jų randamos diferencijuotose normalių audinių ląstelėse, o vieninteliai audiniai, kurie pasižymi CA-IX raiška, priklauso virškinimo traktui ir sudaro skrandžio liaukų epitelį. Vėžio biologijoje CA-IX siejama su hipoksiniais augliais, kilusiais iš ląstelių, kurios normaliai neturi CA-IX raiškos (Barathova ir kt., 2008; Pastorekova ir kt., 1997). Su augliais susieta CA-IX raiška iš esmės nulemiama stipraus CA9 geno aktyvinimo veikiant HIF-1 kompleksui. CA-IX palaiko auglio ląstelių viduląstelinį pH ir taip pat turi įtakos ląstelių adhezijai. Aptiktos dvi žmogaus CA-IX baltymo izoformos: mažesniais kiekiais sintetinama AS (angl. *alternatively spliced*) ir FL (angl. *full length*). FL izoforma aptinkama tik hipoksiniuose augliuose, o AS, nors ir sintetinama žymiai mažesniais kiekiais, aptinkama ir normaliuose audiniuose normaliomis deguonies sąlygomis. AS izoforma neturi 8–9 egzonų ir todėl neturi transmembraninio domeno. Dėl šios priežasties ji neįsitvirtina membranoje, o yra išskiriama į tarpląstelinę erdvę, kur, nors ir pasižymėdama mažesniu katalitiniu efektyvumu, mažina hipoksijos sukeliamą aplinkos rūgštėjimą (Barathova ir kt., 2008).

Atrasta ir keletas genų, kurių koduojami baltymai gali sukelti arba slopinti apoptozę, priklausomai nuo susidarančių alternatyvių izoformų. Vienas iš tokių baltymų yra BCL-X, protoonkogenų BCL-2 šeimos narys. Nuo šio geno alternatyviojo splaisingo būdu susidaro dvi priešingą poveikį turinčios izoformos – BCL-XL, pasižyminti antiapoptotiniu poveikiu, ir BCL-XS, kuri skatina apoptozę (Xiao ir kt., 2012).

Kitas šios šeimos baltymas, BNIP3, kurio raiška padidėjusi hipoksinėmis salvgomis, vra atsakingas už mitochondriju pažeidima ir lastelės žūties sukėlimą reaguojant į biologinį stresą (Vande Velde ir kt., 2000; Gang ir kt., 2011). Hipoksijos indukuoto alternatyviojo splaisingo būdu susidaro trumpesnė BNIP3 izoforma, neturinti 3 egzono, koduojančio transmembranini domena, reikalinga prisijungti prie mitochondriju. Ši izoforma skatina lastelių išgyvenima apsaugodama mitochondrijas nuo pažaidas sukeliančio pilno ilgio baltymo. Tai vra dar vienas pavyzdys, kai to paties geno koduojamo baltymo izoformos turi antagonistines funkcijas (Dorn ir Kirshenbaum, 2008).

Baltymas CYR61 dalyvauja svarbiuose fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose: organizmui vystantis, žaizdoms gyjant, esant angiogenezei, uždegiminiams procesams, ląstelėms išgyvenant, esant kraujagyslių ligoms ir endometriozei (Leask ir Abraham, 2006). Leiomyomos ir prostatos vėžio atveju nustatyta sumažėjusi šio baltymo raiška (Pilarsky ir kt., 1998; Sampath ir kt., 2001). Toks faktas parodo, kad kai kuriose situacijose CYR61 gali veikti kaip naviko slopiklis. Atrasta, kad krūties vėžio ląstelėse alternatyviojo splaisingo būdu nuo šio geno susidaro dvi skirtingos izoformos: visus 4 teisingai sujungtus egzonus turinti IS (angl. *intron skipping*) ir hipoksijos indukuojama IR (angl. *intron retaining*) izoforma, kurioje nepašalinamas intronas tarp 3 ir 4 egzono. Šio introno palikimas

sukuria 2 STOP kodonus (Hirschfeld ir kt., 2009). Kol kas nežinoma, ar nuo šios trumpesnės izoformos yra sintetinamas baltymas ir ar jis turi funkciją vėžio biologijoje (Perbal, 2009).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1.Reagentai

2-merkaptoetanolis Acto rūgštis (Ledinė) Agarozė Akrilamidas Amonio peroksisulfatas (APS) Ampicilinas Bisakrilamidas Boro rūgštis Bradfordo reagentas Bromfenolio mėlis CA-630 di-Natrio hidrofosfato dihidratas Ditiotreitolis (DTT) Druskos rūgštis Etanolis Etidžio bromidas Etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA) Fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF) Glicinas Izopropanolis Jaučio serumo albuminas (BSA, angl. bovine serum albumine) Kalcio chloridas Kalio chloridas Kalio di-hidrofosfatas Kalio fluoridas Magnio chloridas Metanolis Mieliu ekstraktas N,N,N,N-tetrametiletilendiamidas (TEMED) Natrio azidas Natrio chloridas Natrio deoksicholiatas Natrio dodecilsulfatas (SDS) Natrio hidroksidas

Penicilinas ir streptomicinas Pieno milteliai Ponceau S Proteazių inhibitoriaus mišinys Puromicinas Skystas azotas Tripsinas Triptono ir peptono mišinys Tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris) Tween-20 Veršiuko vaisiaus serumas (FBS)

2.1.2.Tirpalai

0,5 M EDTA tirpalas, pH = 8,0.

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 26 mM Tris, 108 mM glicino, 20 % metanolio, pH = 8,4.

 $4 \times$ Tris-Cl/SDS buferinis tirpalas, pH = 6,8 (0,5 M Tris, 0,4 % SDS)

 $4 \times$ Tris-Cl/SDS buferinis tirpalas, pH = 8,8 (1,5 M Tris, 0,4 % SDS)

Etidžio bromido tirpalas: 0,5 µg/ml etidžio bromidas.

PBS buferinis tirpalas: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ \times 2H2O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4.

RIPA tirpalas: 100 mM TRIS-HCl (pH = 7,4), 300 mM NaCl, 1 % CA-630, 0,25 % Na-deoksicholiatas, 1 tabl. proteazių inhibitoriaus ("Roche"), 1 mM PMSF.

TAE buferinis tirpalas: 40 mM Tris, 20 mM ledinės acto rūgšties, 1 mM EDTA (pH = 8,0).

TBE buferinis tirpalas: 45 mM Tris, 45 mM Boro rūgšties, 1 mM EDTA (pH = 8,0).

TBST buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20.

LB terpė: 1 % triptono, 0,5 % mielių ekstrakto, 0,5 % NaCl.

Agarizuota LB terpė: LB terpė, 2 % Bacto-agaro.

NaOH-SDS: 1 % SDS, 0,1 M NaOH.

TE buferinis tirpalas: 50 mM Tris-HCL (pH = 8,0), 10 mM EDTA.

Buferis A: 10 mM HEPES (pH = 7,9 esant 4°C), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT.

Buferis C: 20 mM HEPES (pH = 7,9 esant 4°C), 25 % (v/v) glicerolio, 0,6 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT.

Buferis D: 20 mM HEPES (pH = 7,9 esant 4°C), 20 % (v/v) glicerolio, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT.

 $2 \times$ baltymų suleidimo buferinis tirpalas: 125 mM Tris-HCL (pH = 6,8), 20 % glicerolio, 4,1 % SDS, 0,2 % 2-merkapto etanolio, 0,001 % Bromfenolio mėlio.

 $0.5 \times$ lizės buferis: 5 mM Tris-Cl (pH = 6,8), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl ir 1 % SDS.

2.1.3.Rinkiniai

GeneJet Gel extraction kit ("Thermo Fisher Scientific") QuickRNA purification kit ("Zymo Research") RevertAid Reverse transcription Kit ("Thermo Fisher Scientific") Zyppy Plasmid Miniprep Kir ("Zymo Research") ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit ("Zymo Research")

Pavadinimas	Seka	Apibūdinimas
S1e1R1 Dir	5'-CACCGAAAAGCGCGGACTCGAGAAC-	Tiesioginis
	3'	pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF1 genui
S1e1R1 Rev	5'-AAACGTTCTCGAGTCCGCGCTTTTC-3'	Atvirkštinis
		pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF1 genui
S1e1R2 Dir	5'-CACCGAACGATTGCCGCATCTACGT-3'	Tiesioginis
		pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF1 genui
S1e1R2 Rev	5'-AAACACGTAGATGCGGCAATCGTTC-	Atvirkštinis
	3'	pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF1 genui

	2.1.4.	Oligonu	kleotidai
--	--------	---------	-----------

S5e2R1 Dir	5'-CACCGTACTAGCCGGACATCATGAG-	Tiesioginis
	3'	pradmuo.
		koduoiantis
		sgRNR
		atpažinimo seka
		SRSE5 genui
S5e2R1 Rev	5'-AAACCTCATGATGTCCGGCTAGTAC-3'	Atvirkštinis
SSEZRI KEV	S-AAAeerearoaroreeooeraorae-s	pradmuo
		koduoiantis
		sgrinr
		alpazinino seką
05 0D0 D:		SKSF5 genui
S5e2R2 Dir	5'-CACCGGTGGCTGTCGGGTATTCATC-3'	Tiesioginis
		pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF5 genui
S5e2R2 Rev	5'-AAACGATGAATACCCGACAGCCACC-	Atvirkštinis
	3'	pradmuo,
		koduojantis
		sgRNR
		atpažinimo seką
		SRSF5 genui
SRSF1 Dir	AAGCTTATGTCGGGAGGTGGTGTGATT	Klonavimui
(HindIII)		
SRSF1 Rev	GGATCCTTATGTACGAGAGCGAGA	Klonavimui
(BamHI)		
SRSF5	AAGCTTTACTAGCCGGACATCATGAGTG	Klonavimui
HindIII Dir	G	
SRSF5 EcoRI	GAATTCGGCAAGTTATTTACAGTTTAATT	Klonavimui
Rev	GC	
U2AF35 Dir	AAGCTTATGGCGGAGTATCTGGCCT	Klonavimui
(HindIII)		
U2AF35 Rev	GGATCCTCAGAATCGCCCAGATCTTTC	Klonavimui
(BamHI)		
U2AF65	AAGCTTATGTCGGACTTCGACGAGTTCG	Klonavimui
HindIII Dir	AG	
U2AF65	GGATCCTACCAGAAGTCCCGGCGGTGAT	Klonavimui
BamHI Rev	A	1 stonu v initui
FAS Dir	GTGAACACTGTGACCCTTGC	Splaisingo izof
FASRey	CCTTGGTTTTCCTTTCTGTGC	Splaisingo izof
PAS NEV		spiaisingo izor.

FAS (Total)	TGAGGGAAGCGGTTTACGAG	Raiškos
Dir		
FAS (Total)	TGAAAGAGCTTCCCCAACTCC	Raiškos
Rev		
18S Dir	AACTCACTGAAGATGAGGTG	Raiškos
18S Rev	CAGACAAGGCCTACAGACTT	Raiškos
SRSF1 Dir	ATGTCGGGAGGTGGTGTGATT	Raiškos
SRSF1 Rev	TTATGTACGAGAGCGAGA	Raiškos
U2AF35 Dir	ATGGCGGAGTATCTGGCCT	Raiškos
U2AF35 Rev	TCAGAATCGCCCAGATCTTTC	Raiškos
SRSF5 Dir	TACTAGCCGGACATCATGAGTGG	Raiškos
SRSF5 Rev	GGCAAGTTATTTACAGTTTAATTGC	Raiškos
U2AF65 Dir	AGCCAGATGACCAGACAAGC	Raiškos
U2AF65 Rev	CATACTCCTCGTCGTCCAGC	Raiškos
<i>TAU</i> Dir	CAAGATCGGCTCCACTGAGAA	Splaisingo izof.
TAU Rev	GGCGAGTCTACCATGTCGAT	Splaisingo izof.
APP Dir	CGAGGACGATGAGGATGGTG	Splaisingo izof.
APP Rev	TGGCCTCAAGCCTCTCTTTG	Splaisingo izof.
CLK1 Dir	ATTTTGTTGTTGGTGCGCGA	Raiškos
CLK1 Rev	TCCTTCGGTGACTCTTCCCA	Raiškos
CLK2 Dir	CCATGTCCGTTCTCGAAGCA	Raiškos
CLK2 Rev	TGGACACAGAGGTTCTTGTTGT	Raiškos
CLK3 Dir	CTCCTGGGCAAGAACACCTT	Raiškos
CLK3 Rev	TCTCGGTTTTCGTGGGTCTG	Raiškos
CLK4 Dir	AGCACACAAGAGAACAGGCA	Raiškos
CLK4 Rev	TCTGGACACATCGGAAGACAC	Raiškos
SRSF1-ex1	TACCAAACGGCTGGTCACTC	PGR nuo
Dir		gDNR
SRSF1-ex1	TCGAACTCAACGAAGGCGAA	PGR nuo
Rev		gDNR
SRSF5-ex2	GCACTTCTCGGCCTTTCCTA	PGR nuo
Dir		gDNR
SRSF5-ex2	CACCCGGACTCAAGATCGAAA	PGR nuo
Rev		gDNR
FAS-ex6 T7	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCAATG	Konstruktai
Dir	TTCCAACCTACAGGATCCAGAT	
FAS-ex6 T7	ATCTGGATCCTGTAGGTTGGAACATTGG	Konstruktai
Rev	ACCCCTATAGTGAGTCGTATTA	
FAS-ex7 T7	TAATACGACTCACTATAGGGGACCTGAG	Konstruktai
Dir	TTGATAAAATTTCTTTGTTCTTTCAGTGA	
	AGAGAA	

FAS-ex7 T7	TTCTCTTCACTGAAAGAACAAAGAAATT	Konstruktai
Rev	TTATCAACTCAGGTCCCCTATAGTGAGT	
	CGTATTA	
LKO.1 5'	GACTATCATATGCTTACCGT	Plazmidėms
		sekvenuoti
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	Plazmidėms
		sekvenuoti
BGH Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Plazmidėms
		sekvenuoti
pJet1.2 Dir	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Plazmidėms
		sekvenuoti
pJet1.2 Rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Plazmidėms
		sekvenuoti

2.1.5.siRNR

Pavadinimas	Seka	
U2AF1	GAAUAACCGUUGGUUUAAUTT	s14553
U2AF2	CCAACUACCUGAACGAUGATT	s22364

2.1.6.Antikūnai

Antikūnai	Katalogo nr.	Kilmė	Gamintojas
Anti-U2AF65	ab37530	rabbit polyclonal	Abcam
		IgG	
Anti-U2AF35	ab172614	rabbit polyclonal	Abcam
		IgG	
Actin	ab3280	mouse monoclonal	Abcam
		IgG	
Anti-Rabbit IgG	ab6721	goat polyclonal	Abcam
(HRP)		IgG	
Anti-mouse IgG	R-05071-500	Goat polyclonal	Advansta
(HRP)		IgG (H+L),	

2.1.7. Ląstelių linijos, mikroorganizmų kamienai

Organas	Pavadinimas	Apibūdinimas
Smegenys	U-87	Žmogaus glioblastomos
		ląstelių linija
Smegenys	SK-N-BE(2)	Žmogaus neuroblastomos
		ląstelių linija

Storoji žarna	HCT116	Žmogaus storosios žarnos
		ląstelių linija

Pavadinimas	Gamintojas	Apibūdinimas
pcDNA3	"Thermo Fisher	Plazmidinė DNR, skirta
	Scientific"	baltymų raiškai
		eukariotinėse ląstelėse
pcDNA3-SRSF1	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SRSF1 baltymą
pcDNA3-SRSF5	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SRSF5 baltymą
pcDNA3-U2AF65	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	U2AF65 baltymą
pcDNA3-U2AF35	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	U2AF35 baltymą
px459	Addgene	Plazmidinė DNR, skirta
		SpCas9 baltymo ir sgRNR
		raiškai eukariotinėse
		ląstelėse
px459-S1e1R1	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SpCas9 baltymą ir sgRNR,
		atpažįstančią SRSF1 pirmo
		egzono seką genome
px459-S1e1R2	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SpCas9 baltymą ir sgRNR,
		atpažįstančią SRSF1 pirmo
		egzono seką genome
px459-S5e2R1	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SpCas9 baltymą ir sgRNR,
		atpažįstančią SRSF5 pirmo
		egzono seką genome
px459-S5e2R2	Sukonstruota	Plazmidinė DNR, koduojanti
	laboratorijoje	SpCas9 baltymą ir sgRNR,
		atpažįstančią SRSF5 pirmo
		egzono seka genome

2.1.8.Plazmidinės DNR

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1.Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR reakcijoms naudojama "DreamTaq" DNR polimerazė ("Thermo Fisher Scientific"). Reakcijos mišinys sumaišomas pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinio sudėtis vienai reakcijai: $1 \times$ "DreamTaq" buferinis tirpalas, 0,2 mM dNTP mišinys, po 0,4 μ M tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 1,25 vnt. "DreamTaq" DNR polimerazės, 1 μ L kDNR (kDNR sintezės reakcijoje naudojamas 1 μ g RNR).

Reakcijos vykdomos termocikleryje: 1 ciklas 95°C 5 min; 25–35 ciklai: 95°C 30 s, Tm°C 30 s, 72°C 1 min; 1 ciklas 72°C 5 min.

Mėginiai laikomi -20°C iki tolesnio panaudojimo.

2.2.2.RNR gryninimas iš eukariotinių ląstelių

RNR išskirti naudotas rinkinys "Quick-RNA MiniprepKit" ("Zymo Research"). Ląstelės surenkamos nugramdant, centrifuguojamos $500 \times g$ 10 min +4°C, ant jų užpilamas lizės buferinis tirpalas ("Zymo Research") ląstelėms suardyti. RNR skiriama pagal gamintojo pateikiamą protokolą. Išskirtos RNR koncentracija ir grynumas nustatomas su spektrofotometru "NanoDrop 2000" ("Thermo Fisher Scientific") pamatuojant šviesos sugertį bei A260 ir A280 santykį. Mėgintuvėliai su RNR laikomi -70°C temperatūroje.

2.2.3.kDNR sintezė

kDNR sintezei naudotas "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" ("Thermo Fisher Scientific") rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcijos mišinio sudėtis vienai reakcijai: 1 µg RNR, 1 × reakcijos buferis, 20 vnt. "RiboLock" RNazių slopiklio, 1 mM dNTP mišinio, 0,2 µg atsitiktinių heksamerinių pradmenų, 200 vnt. "RevertAid H Minus M-MuLV" atvirkštinės transkriptazės. Reakcija vykdoma termocikleryje: 25°C 5 min, 42°C 60 min, stabdoma 70°C 10 min. Mėginiai su gauta kDNR laikomi -20°C iki tolesnio panaudojimo.

2.2.4.DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

Elektroforezei agaroziniame gelyje reikiamas kiekis agarozės (1 %, 1,5 %) ištirpinamas kaitinant $1 \times TBE$ arba $1 \times TAE$ buferiniame tirpale. Dar šiltas gelio tirpalas pilamas į lovelį su įstatytomis šukutėmis, palaukiama, kol gelis sustings. Gelis perkeliamas į horizontalios elektroforezės vonelę su atitinkamu buferiniu tirpalu.

Į DNR mėginį pridedama $\frac{1}{6}$ mėginio tūrio 6 × DNR dažo ("Thermo Fisher Scientific") ir mišinys suleidžiamas į agarozinio gelio šulinėlį.

Elektroforezė vykdoma buferiniame tirpale, esant 130 V įtampai. Po elektroforezės gelis dažomas 10 min 0,5 µg/ml etidžio bromido tirpale. AT-PGR susidarę DNR produktai stebimi UV šviesoje. Gelio juostelių kiekybinis įvertinimas atliktas su "Multi Gauge" programa ("Fujifilm").

2.2.5.DNR ar RNR koncentracijos nustatymas

DNR ar RNR koncentracija nustatoma matuojant tirpalo šviesos sugertį esant 260 nm bangos ilgiui naudojant "Nanodrop 2000" ("Thermo Fisher Scientific") spektrofotometrą.

2.2.6. Plazmidinės DNR gryninimas iš E. coli

E. coli kolonija sėjama į 50–1 000 ml skystos LB terpės ir auginama 16– 20 h intensyviai maišant optimalioje temperatūroje.

Ląstelės surenkamos centrifuguojant ir suspenduojamos $5 \times$ mažesniame nei pradinis tūris kiekyje TE buferio.

Į ląstelių suspensiją pridedami 2 tūriai NaOH-SDS tirpalo ir mišinys švelniai sumaišomas, palaikomas 5 min kambario temperatūroje ir į jį pridedama 0,5 tūrio 3M natrio acetato (pH = 4,8) tirpalo.

Atsargiai suplakama ir centrifuguojama 15 min 5 500 \times g +4°C.

DNR iš supernatanto nusodinama pridedant izopropanolio (0,8–0,7 supernatanto tūrio) ir surenkama centrifuguojant 15 min 5 500 \times g kambario temperatūroje.

Visa procedūra pakartojama. Ląstelės suspenduojamos $2 \times$ mažesniame (lyginant su pradiniu) TE tūryje.

Į ląstelių suspensiją pridedama 2 tūriai NaOH-SDS tirpalo ir mišinys švelniai sumaišomas, palaikomas 5 min kambario temperatūroje ir į jį pridedama 0,5 tūrio 3M natrio acetato (pH = 4,8) tirpalo.

Atsargiai suplakama ir centrifuguojama 15 min 5 500 \times g +4°C.

DNR iš supernatanto išsodinama pridedant izopropanolio (0,7) supernatanto tūrio) ir surenkama centrifuguojant 15 min 5 500 × g kambario temperatūroje.

Nuosėdos ištirpinamos 5 kartus mažesniame TE tūryje.

Pašalinama didelio molekulinio svorio RNR pridedant lygų tūrį 10 M LiCl tirpalo. Mišinys suplakamas ir palaikomas 5 min kambario temperatūroje, paskui nucentrifuguojamas 15 min 48 000 \times g +4°C.

Plazmidinė DNR iš supernatanto nusodinama izopropanoliu (0,7 supernatanto tūrio). DNR precipitatas ištirpinamas 0,5 ml TE buferinio tirpalo.

2.2.7. Plazmidinės DNR įterpimas į E. coli (transformacija)

Užšaldytos kompetentinės ląstelės atšildomos ledo vonioje. Ligavimo mišinys (5 μ l) ar norima padauginti plazmidinė DNR (0,1–0,2 ng) maišoma su 50–100 μ l kompetentinių ląstelių. Inkubuojama leduose 15 min.

Po inkubacijos plazmidinės DNR įterpimo į ląsteles efektyvumui padidinti vykdomas termošokas – mišinys 2 min perkeliamas į 42°C temperatūrą. Paskui mišinys vėl trumpam atšaldomas leduose.

Į ląstelių suspensiją pridedama 1 ml LB terpės. Gauta suspensija inkubuojama 1 h 37°C temperatūroje.

Ląstelių suspensija centrifuguojama $3-5 \min 5500 \times g$.

Sterilioje aplinkoje dalis terpės nupilama, paliekant jos apie 100–150 µl, kurioje ląstelės suspenduojamos. Suspenduotos ląstelės suleidžiamos į Petri lėkštelę su kieta agarizuota LB terpe, turinčia reikiamą kiekį tinkamo antibiotiko, ir tolygiai paskirstomos.

2.2.8.Plazmidinės DNR įterpimas į eukariotines ląsteles (transfekcija)

Plazmidinės DNR transfekcija atlikta naudojant "Lipofectamine LTX" ir "Plus" (...Thermo Fisher Scientific") reagentus pagal gamintoio rekomendacijas ir parinktas optimalias salvgas. Lastelių auginimo terpėje be priedų terpėje 3 µg plazmidės sumaišoma su "Plus" reagentu santykiu 1:1 pagal kieki. Atskirame megintuvelyje atitinkamas kiekis "Lipofectamine LTX" reagento (0,52 µl/cm² lėkštelės plotui) praskiedžiamas ląstelių auginimo terpėje be priedų. Tirpalas su plazmide sumaišomas su reagento tirpalu (1:1), inkubuojama kambario temperatūroje ($\sim +22^{\circ}$ C) 5 min. Transfekcijos mišinys užlašinamas ant lasteliu, auginamu kultivavimo terpėje 60 mm skersmens lėkštelėje. Po ląstelių kultivavimo 24 h pakeičiama terpė.

2.2.9.Baltymų raiškos sumažinimas eukariotinėse ląstelėse naudojant siRNR

Ląstelių transfekcija siRNR atlikta naudojant reagentą "Lipofectamine RNAiMAX" ("Thermo Fisher Scientific"), pagal gamintojo rekomendacijas ir parinktas optimalias sąlygas. Atitinkamas kiekis transfekcijos reagento (0,71 µl/cm² lėkštelės plotui) ir siRNR (25 nM galutiniame kultivavimo

terpės tūryje) praskiedžiami ląstelių auginimo terpėje be priedų atskiruose mėgintuvėliuose. Tirpalas su siRNR sumaišomas su reagento tirpalu (1:1), inkubuojama kambario temperatūroje (~ +22°C) 5 min. Transfekcijos mišinys užlašinamas ant ląstelių, auginamų kultivavimo terpėje 60 mm skersmens lėkštelėje. Po ląstelių kultivavimo 24 h pakeičiama terpė.

2.2.10. In vitro RNR transkripcija

Transkripcijos reakcijos mišinys:

 $1 \times$ transkripcijos buferinis tirpalas (pH = 7,9) ("Thermo Fisher Scientific"), 0,5 mM ATP, 0,5 mM GTP, 0,012 mM CTP, 0,012 mM UTP, 0,488 mM [α 32]-CTP, 0,488 mM [α 32]-UTP, 24 pmol DNR matricos, "RiboLock" ("Thermo Fisher Scientific"), T7 RNR polimerazės ("Thermo Fisher Scientific"). 20 µL tūris pasiekiamas įpilant vandens.

Reakcija vykdoma +37°C 3 h.

Reakcijos mišinys veikiamas 1U DNase I, kad būtų pašalinta DNR matrica.

Reakcijos mišinys išvalomas nuo baltymų ir nukleotidų priemaišų naudojant "RNA Clean & Concentrator-5" ("Zymo Research") rinkinį.

2.2.11. Baltymų lizatų paruošimas

Ląstelės surenkamos naudojant tripsino-EDTA tirpalą arba gramdant, plaunamos PBS tirpalu, centrifuguojamos 10 min 500 × g. Nupilamas supernatantas ir pagal ląstelių kiekį užpilama 25–100 μ L RIPA tirpalo. Ląstelės vorteksuojamos 10 min, tada 10 min palaikomos leduose. Kartojama 3 kartus. Paskui mėginiai centrifuguojami 16 000 × g, supernatantas surenkamas, nuosėdos išmetamos.

2.2.12. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Ląstelės surenkamos nugramdant, perkeliamos į mėgintuvėlį, centrifuguojamos 500 × g 10 min +4°C temperatūroje, plaunamos PBS buferiniu tirpalu. Centrifuguojamos 500 × g 10 min +4°C temperatūroje. Ant ląstelių užpilama RIPA buferinio tirpalo (20 μ l ant ¹/₃ ląstelių tūrio, surinkto iš 60 mm lėkštelės), trumpai sumaišoma ir inkubuojama ledo vonioje 15 min. Po inkubacijos mėginiai sumaišomi ir centrifuguojami 10 min. 16 000 × g +4°C temperatūroje.

Baltymų koncentracija nustatoma Bradfordo metodu (2.2.24). Mėginių kiekiai sulyginami juos atitinkamai skiedžiant RIPA buferiniu tirpalu ir

sumaišomi su lygiu tūriu $2 \times$ baltymų suleidimo buferinio tirpalo. Baltymai denatūruojami 10 min esant 100°C temperatūrai.

SDS-PAGE elektroforezė: baltymų elektroforezės mėginiai leidžiami 4 % koncentruojamame ir 12 % skirstomajame akrilamido gelyje. Į tam skirtą rėmelį pilamas paruoštas skirstomasis gelis (12 % akrilamidobisakrilamido tirpalo, 0,375 M Tris (pH = 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,01 % TEMED). Ant viršaus užpilama 0,5–1 ml izopropanolio. Sustingus skiriamajam geliui, nupilamas izopropanolis, gelio paviršius nuplaunamas distiliuotu vandeniu ir nusausinamas filtriniu popieriumi. Ant viršaus pilamas koncentruojamasis gelis (4 % akrilamido-bisakrilamido tirpalo, 0,125 M Tris (pH = 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,01 % TEMED). Įdedamos šukos šulinėliams susiformuoti. Sustingus geliui, jis įstatomas į elektroforezės aparatą, ištraukiamos šukos, šulinėliai plaunami SDS elektroforezė vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis SDS elektroforezės buferyje esant 120 V įtampai apie 1,5 h.

2.2.13. Dvikryptė baltymų elektroforezė

Pirmoji NEPHAGE kryptis buvo vykdoma pagal gamintojo protokolą, naudojant standartizuotas medžiagas ("WITA Gmbh"). NEPHAGE leidžiamas pH 3–10 nelinijiniame gradiente, suformuotame amfolitų nešiklių. Amfolitų nešiklių tirpalas ir IEF gelio tirpalas pagaminti pagal Klose ir Kobalz, 1995.

Du geliai buvo užpilti vertikaliame prietaise ruošiant dviejų sluoksnių gelių stulpelius pirmajai krypčiai. Kad įvyktų pilna polimerizacija, pirmos krypties geliai buvo inkubuojami 30 min kambario temperatūroje ir paskui laikomi drėgnoje talpykloje 72 h. Pirmos krypties baltymų atskyrimas atliekamas naudojant vertikalios elektroforezės prietaisą pagal gamintojo instrukcijas ("Vitavision").

Apatinė prietaiso talpa buvo užpildyta katodo buferiniu tirpalu (0,54M glicerinas, 9M urėja, 075M etilendiaminas). Po gelių stulpelių fiksacijos mėginio tirpalai, turintys 70–80 µg baltymų, iš branduolių ekstraktų amfolitiniame fosfato buferiniame tirpale su agaroze suleisti gelio anodinėje pusėje ir likęs gelio kapiliaro talpos tūris užpildytas stabilizuojančiu tirpalu ("Vitavision"). Tada viršutinė gelių aparato talpa užpildyta anodiniu buferiniu tirpalu (3M urea, 0,75M fosforo rūgštis). Elektroforetinis pirmos krypties atskyrimas vykdomas tokia seka: 100 V 1 h; 200 V 1 h; 400 V 17,5 h; 600 V 1 h; 1 000 V 30 min; 1 500 V 10 min; 2 000 V 5 min. Atlikus elektroforezę geliai atsargiai išimti iš kapiliarų. Pusiausvyrinimas antrajai

krypčiai buvo vykdomas palaipsniui 3 kartus naudojant atitinkamą pusiausvyrinimo buferinį tirpalą, turintį 75 mM DTT, po to naudojant tą patį pusiausvyrinimo buferinį tirpalą su 125 mM 2-iodoacetamido. Pusiausvyrinti gelio stulpeliai buvo laikomi esant -80°C temperatūrai prieš leidžiant antrąją kryptį.

Antrosios krypties atskyrimas buvo vykdomas naudojant standartinį SDS-PAGE 12 % poliakrilamidinį gelį, naudojant "Minigel-Twin" ("Biometra") elektroforezės sistemą. Pirmosios krypties gelių stulpeliai buvo perkelti ant akrilamidinių gelių ir prifiksuoti 0,5 % agarozės tirpalu. Elektroforezė buvo vykdoma tokiomis sąlygomis: 15 mA geliui (~100 V) 15 min (kol bromfenolio dažas pasiekia skiriamąjį gelį), paskui 30 mA geliui (200 V riba) 1 H (kol bromfenolio dažas pasiekia gelio apačią).

Po antrosios krypties atskyrimo baltymai buvo perkeliami ant nitroceliuliozinės membranos pagal metodą, aprašytą 2.2.14 poskyryje.

2.2.14. Baltymų analizė "Western blot" imunohibridizacijos metodu

Baltymai iš poliakrilamidinio gelio perkeliami ant nitroceliuliozės membranos. Vonelėje su perkėlimo buferiu surenkami perkėlimo sluoksniai: ant porolono kempinės dedami du sluoksniai chromatografinio popieriaus, poliakrilamidinis gelis, nitroceliuliozinė membrana, vėl du sluoksniai chromatografinio popieriaus ir porolono kempinė. Visa tai istatoma i aparata su perkėlimo buferiu. Perkėlimas vykdomas šaldant esant 100 V itampai apie 1 h. Perkėlus membrana plaunama TBST buferiniu tirpalu ir dažoma Ponceau dažu, nes reikia patikrinti, kaip persikėlė baltymai. Po to membrana nuo dažo plaunama du kartus po 10 min TBST buferiniu tirpalu ir blokuojama 1 h blokavimo buferiniu tirpalu (5 % pieno milteliu TBST buferiniame tirpale). Membrana plaunama du kartus po 10 min TBST buferiniu tirpalu ir inkubuojama su pirminiais antikūnais prieš tiriamajį baltyma apie 16 h esant +4°C temperatūrai. Kita diena membrana plaunama du kartus po 10 min TBST buferiniu tirpalu ir inkubuojama 2 h su atitinkamais antriniais antikūnais esant kambario temperatūrai. Membrana vėl plaunama ir baltymai vizualizuojami chemiliuminescenciniu metodu. ECL (angl. enhanced chemiluminescent) reagentai sumaišomi santykiu 1:1, mišinvs užpilamas ant membranos ir inkubuojama 2 min. Signalas fiksuojamas "Azure 280" aparatu ("Azure Biosystems"). Membranos juosteliu kiekybinis ivertinimas atliktas "Multi Gauge" programa ("Fujifilm").

2.2.15. Branduolių ekstraktų paruošimas

Ląstelės surenkamos iš terpės centrifuguojant 10 min 1 000 \times g.

Nupilamas supernatantas, ląstelės suspenduojamos 5 tūriuose 4°C PBS, centrifuguojamos 10 min 1 000 \times g.

Kiti žingsniai atliekami esant 4°C.

Ląstelės suspenduojamos 5 nusėdusių ląstelių tūriuose buferio A ir palaikomos 10 min.

Centrifuguojamos 10 min 1 000 \times g. Nuosėdos suspenduojamos 2 prieš tai buvusių ląstelių tūriuose buferio A ir lizuojamos 10 kartų "Dounce" stikliniu homogenizatoriumi.

Branduoliai nusodinami centrifuguojat 10 min 1 000 \times g. Pašalinamas supernatantas.

Branduolių nuosėdos dar kartą centrifuguojamos 20 min 1 000 \times g pašalinti likusiai citoplazminei medžiagai.

Nuosėdos resuspenduojamos 3 ml/ 10^9 ($^2/_3-1$ pcv) (angl. *packed cell volume*) ląstelių buferio C "Dounce" stikliniu homogenizatoriumi (10 kartų).

Suspensija švelniai maišoma ant magnetinės maišyklės 30 min ir tada centrifuguojama 30 min 25 000 \times g.

Supernatantas dializuojamas prieš 50 tūrių buferio D 5 h.

Dializatas centrifuguojamas 20 min 25 000 \times g. Supernatantas surenkamas ir matuojama baltymų koncentracija.

2.2.16. Stabilus RNR prijungimas prie baltymo naudojant UV

Nusodinamas 200,000 cpm atitinkantis kiekis P[32] žymėtos RNR (vienai reakcijai).

Nuosėdos nusausinamos, pridedamas 30 ug branduolių ekstraktų.

Tūris išlyginamas iki 10 uL su buferiu D.

Inkubuojama leduose 10 min.

Atkimšus dangtelį apšviečiama UV (254 nm), lempą laikant 1–2 cm nuo dangtelio 1 h.

Pridedama 5 U RNase A/T1. Inkubuojame 37°C 30 min.

Pridedamas lygus tūris 2 \times baltymų perkėlimo buferinio tirpalo. Pakaitinama 100°C 5 min.

Leidžiamas 10 % akrilamidinis gelis (2.2.12). Perkeliama ant nitroceliuliozinės membranos (2.2.14).

Membrana dedama į kasetę su rentgeno juosta ir laikome -70°C 24 h.

Juosta išryškinama ir membrana naudojama "Western blot" (2.2.14) analizei.

2.2.17. Eukariotinių ląstelių linijų kultivavimas

Ląstelės kultivuojamos 75 cm² auginimo induose inkubatoriuje, esant 37°C temperatūrai ir 21 % O₂, 5 % CO₂ atmosferoje. U-87 MG ląstelės auginamos MEM terpėje su 10 % FBS ir 1 % penicilino ar streptomicino (PS). SK-N-BE(2) auginamos MEM:F-12 terpių mišinyje (santykiu 1:1), su 10 % FBS ir 1% PS, HCT116 auginamos McCoy's 5A terpėje, su 10 % FBS ir 1% PS. Terpė keičiama kas tris dienas. Ląstelėms pasiekus 70–100 % konfluentiškumą, jos pakeliamos pridėjus 0,5 % Tripsino-EDTA tirpalo. Atkibusios ląstelės padalijamos: U-87 MG po 5,6 × 10⁴ ląstelių/cm², SK-N-BE(2) po 3,9 × 10⁴ ląstelių/cm² HCT116 po 14,15 × 10⁴ ląstelių/cm². Ląstelės pasėjamos į 60 mm skersmens lėkšteles transfekcijai, kita dalis ląstelių paliekama augti tolesniems eksperimentams.

Ląstelių auginimas hipoksinėmis sąlygomis: ląstelės kultivuojamos inkubatoriuje, esant 37°C, 5 % CO₂, kuriame palaikomos hipoksinės sąlygos – 1 % O₂. Ląstelės inkubuojamos hipoksinėmis sąlygomis 24 h, paskui surenkamos tolesniems eksperimentams.

2.2.18. DNR iterpimas į plazmidinę DNR (ligavimas)

Ligavimo reakcija (10 µl):

0,05 pmol galų restrikcijos endonukleazėmis paveiktos plazmidinės DNR (vektoriaus);

0,15 pmol restrikcijos endonukleazėmis paveikto PGR produkto arba DNR fragmento, iškirpto iš kitos plazmidinės DNR;

T4 ligazės veikimo buferinis tirpalas;

5 U T4 DNR ligazės;

Ligavimo mišinys inkubuojamas 1 h esant kambario temperatūrai.

2.2.19. Kompetentinių E. coli paruošimas

E. coli bakterijos auginamos LB terpėje, kol pasiekiamas optinis tankis $OD_{600} = 0.5$. Pasiekus reikiamą tankį, bakterijos atšaldomos lede ir centrifuguojamos 5 500× g 10 min. Nuosėdos resuspenduojamos atšaldytame 0,1 M MgCl₂ tirpale. Centrifuguojama 5 500 × g 10 min. Nuosėdos resuspenduojamos atšaldytame 0,1 M CaCl₂ tirpale. Laikoma leduose 20 min.

Centrifuguojama 5 500 \times g 10 min. Nuosėdos resuspenduojamos 0,1 M CaCl₂ ir 14 % glicerolio atšaldytame tirpale.

Ląstelės išskirstomos į atšaldytus mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai įdedami į termosą su skystu azotu. Po 5 min mėgintuvėliai perkeliami į -70°C šaldiklį.

2.2.20. E. coli kolonijų tikrinimas PGR metodu

Paruošiamas PGR reakcijos mišinys (2.2.1) su tiesioginiu genui specifiniu ir atvirkštiniu plazmidinei DNR specifiniu pradmenimis.

Sterilioje aplinkoje inokuliacine kilpele paimama viena kolonija ir išmaišoma PGR mėgintuvėlyje su reakcijos mišiniu, paskui ta pačia kilpele perbraukiama naujoje lėkštelėje su LB agaru iš anksto pažymėtame langelyje. Vykdoma PGR reakcija (2.2.1). Po reakcijos mėginiai analizuojami agaroziniame gelyje (2.2.4). Pagal gautų DNR fragmentų ilgį sprendžiama, ar tinkamai įvyko ligavimo ir transformacijos reakcijos.

2.2.21. Plazmidinių DNR paruošimas genomui redaguoti

sgRNR ir Cas9 raiškai buvo naudojama pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 plazmidinė DNR. sgRNR taikinio sekai parinkti buvo naudojama programa "RGEN Tools" (http://www.rgenome.net/). Pagal parinktas sekas susintetinti oligonukleotidai, turintys BbsI restrikcijos endonukleazės atpažinimo sekas (2.1 pav.).

5' - CACCGNNNNNNNNNNNNN - 3' 3' - CNNNNNNNNNNNNNAAA - 5' **2.1 pav.** Oligonukleotidų struktūra klonavimui (N – sgRNR atpažinimo sekos)

Plazmidinė DNR buvo veikiama BbsI restrikcijos nukleaze ("Thermo Fisher Scientific") bei FastAP fosfataze ("Thermo Fisher Scientific") pagal gamintojo rekomendacijas. Linearizuota plazmidinė DNR nuo priemaišų išvalyta naudojant "Zymoclean Gel DNA recovery kit" ("Zymo Research") pagal gamintojo protokolą.

Norint sulydyti pradmenis į dvigrandės DNR fragmentą, oligonikleotidų (po 0,1 nmol kiekvieno), 5 U T4 PNK ("Thermo Fisher Scientific") ir T4 ligazės buferinio tirpalo ("Thermo Fisher Scientific") mišinys buvo inkubuojamas termocikleryje: 37°C 30 min, 95°C 5 min ir vėsinama iki 25°C 5°C/min greičiu. Toliau buvo vykdoma ligavimo reakcija naudojant 5U T4 DNR ligazės ("Thermo Fisher Scientific"), po 1 μ L 1:200 santykiu skiesto oligonukleotidų duplekso reakcijos mišinio ir 50 ng linearizuotos plazmidinės DNR. Toliau buvo atliekama transformacija pagal metodą, aprašytą 2.2.7 poskyryje, kolonijų tikrinimas pagal 2.2.20 metodą bei vykdoma sekoskaita.

2.2.22. Genomo redagavimas naudojant CRISPR/Cas9 metodą

Į pasėtas ląsteles transfekuojama plazmidinė DNR, koduojanti Cas9 baltymą, gRNR ir atsparumo puromicinui geną pagal 2.2.8 metodą. Ląstelių selekcijai naudojamas puromicinas. Paruošiama ląstelių augimo terpė, kurioje būtų 0,5–10 µg/ml puromicino. Daugumos ląstelių linijų selekcija optimaliai vyksta esant 1,5–2,0 µg/ml puromicino koncentracijai. Selekcija vykdoma 72 h.

2.2.23. Eukariotinių ląstelių klonų tikrinimas po genomo redagavimo

Po transfekcijos ir atrankos antibiotiku, paimama 5 μ L ląstelių suspensijos ir sumaišoma su dviem tūriais 0,5 × lizės buferinio tirpalo. Termocikleryje vykdoma reakcija: 65 °C 30 s; 8 °C 30 s; 65 °C 1,5 min; 97 °C 3 min; 8 °C 1 min; 65 °C 3 min; 97 °C 1 min; 65 °C 1 min; 80 °C 10 min.

Paruošiamas PGR reakcijos mišinys: po 0,5 mM pradmenų; po 0,2 mM dNTP; "SuperFi" buferinis tirpalas ("Thermo Fisher Scientific"); 0,5 U "Platinum SuperFi" DNR polimerazė ("Thermo Fisher Scientific"), 1 μ L (0,1–250 ng) ląstelių lizato; H₂O iki 50 μ L. Vykdoma PGR reakcija: 98 °C 30 s; 98 °C 5–10 s; Tm °C 30 s; 75 °C 30–60 s/kb; 72 °C 5 min. Ciklų skaičius 25–30.

Paruošiamas 15 % nedenatūruojantis poliakrilamido gelis (akrilamidobisakriamidas 29:1), Tris-boro-EDTA (TBE), amonio persulfatas ir TEMED.

PGR produktai pakaitinami 10 min esant 100 °C temperatūrai ir suleidžiami į poliakrilamidinį gelį. Elektroforezė atliekama vertikalios elektroforezės aparate ("BioRad"), esant 40 mA srovei.

Hibridizacijos tyrimas parodo apie genominėje DNR esančias pažaidas. Esant trūkiui, įterpiami arba pašalinami papildomi nukleotidai, dėl to dvigrandėje DNR grandinėje atsiranda nekomplementarumas, dėl kurių hibridizacijos gelyje matomas ne vienas DNR fragmentas, o du ir daugiau.

2.2.24. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Baltymų koncentracija tirpaluose nustatomos naudojantis Bradfordo metodu. Kalibracinei kreivei sudaryti paruošiami žinomos BSA (angl. *bovine serum albumine*) koncentracijos (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml ir 1 mg/ml BSA) tirpalai. 10 µl kiekvieno tirpalo (kontrolinis tirpalas – 10 µl vandens) sumaišoma su 200 µl Bradfordo reagento, gerai išmaišoma, laikoma 5 min tamsoje ir matuojama kiekvieno mėginio šviesos sugertis 595

nm bangoje. Iš gautų duomenų sudaroma kalibracinė kreivė – sugerties priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. Išmatavus atitinkamai paruošto tiriamojo tirpalo sugertį, pagal sudarytą kalibracinę kreivę nustatoma baltymų koncentracija.

2.2.25. Eukariotinių ląstelių šaldymas ir atšildymas

Iš skysto azoto diuaro išimama ampulė su šaldytomis ląstelėmis. Ląstelių mišinys atitirpinamas jas suspenduojant ampulėje su pašildyta (apie 37°C) atitinkama mitybine terpe. Ląstelių suspensija paskleidžiama 75 cm² flakone. Ląstelės inkubuojamos esant 37°C temperatūrai ir 21 % O₂, 5 % CO₂ atmosferoje. Po 24 h pakeičiama mitybinė terpė.

2.2.26. Ląstelių skaičiavimas

Eukariotinės ląstelės skaičiuojamos naudojant "Cedex" ("Roche") prietaisą. Vertinama ląstelių koncentracja bei jų gyvybingumas (procentais).

2.2.27. Statistinė analizė

Statistinis eksperimentų patikimumas skaičiuotas pagal Mann-Whitney U neparametrinį testą naudojant R statistinę programinę įrangą. Naudoti duomenys gauti iš ne mažiau nei trijų nepriklausomų eksperimentų. Statistiškai patikima laikoma, kai p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001.

3. REZULTATAI

3.1. Hipoksinės mikroaplinkos įtaka iRNR izoformų susidarymui

3.1.1.Hipoksinės mikroaplinkos įtaka *TAU* ir *APP* pre-iRNR splaisingui

Endogeninių *TAU* ir *APP* genų pre-iRNR splaisingo tyrimams buvo naudojamos žmogaus glioblastomos (U-87) ir neuroblastomos (SK-N-BE(2)) ląstelės, kultivuotos normaliomis deguonies (21 % O₂) (toliau tekste vadinama normaliomis sąlygomis) ir hipoksinėmis sąlygomis (1 % O₂) (3.1 pav. A ir 3.2 pav. A).



3.1 pav. *TAU* pre-iRNR alternatyvusis splaisingas. (A) Splaisingo schema ir susidarančios izoformos. AT-PGR gauti, iRNR izoformų 4R ir 3R izoformų iRNR profiliai U-87 (B) ir SK-N-BE(2) (D) ląstelėse, kultivuotose normaliomis (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. 4R ir 3R izoformų kiekybinis santykis U-87 (C) ir SK-N-BE(2) (E) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *TAU* (4R + 3R) iRNR kiekis yra 100 %. Kontrolė (angl. *loading control*) – 18S RNR. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš penkių nepriklausomų eksperimentų (n = 5), **p < 0,01; *p < 0,05.

Ląstelės buvo kultivuojamos normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Pirmiausia, ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, analizuotas 10 egzono įjungimas (4R izoforma) arba prašokimas (3R izoforma) į bręstančią *TAU* iRNR. AT-PGR analizė parodo 4R iRNR izoformos susidarymo padidėjimą abiejose tirtose ląstelių linijose, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, lyginant su *TAU* 4R izoformos susidarymu ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies sąlygomis (3.1 pav. B ir D). 10 egzono įtraukimas į besiformuojančią pre-iRNR padidėja apie 2 kartus hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose ląstelėse lyginant su normaliomis deguonies sąlygomis kultivuotomis ląstelėmis.



3.2 pav. *APP* pre-iRNR alternatyvusis splaisingas. (A) splaisingo schema ir susidarančios izoformos. Gauti AT-PGR, iRNR izoformų APP770, APP751 ir APP695 profiliai U-87 (B) ir SK-N-BE(2) (D) ląstelėse, kultivuotose normaliomis (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. APP770, APP751 ir APP695 izoformų kiekybinis santykis U-87 (C) ir SK-N-BE(2) (E) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *APP* (APP770 + APP751 + APP695) iRNR kiekis yra 100 %. Kontrolė (angl. *loading control*) – 18S RNR. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš penkių nepriklausomų eksperimentų (n = 5).

Palygintas trijų pagrindinių su neurodegeneracinėmis ligomis susijusių *APP* iRNR splaisingo variantų susidarymas U-87 ir SK-N-BE(2) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis. Rezultatai parodo, jog hipoksinė mikroaplinka neturi įtakos APP770, APP751 bei APP695 iRNR splaisingo variantų susidarymui analizuotose ląstelių linijose (3.2 pav. B–E).

Be to, U-87 ir SK-N-BE(2) ląstelėse *TAU* 4R izoformos susidarymas yra reguliuojamas hipoksinės mikroaplinkos, priešingai nei APP iRNR izoformų susidarymas. Taigi, tolesniems tyrimams, siekiant išsiaiškinti individualių splaisingo veiksnių vaidmenį, buvo analizuojamas hipoksijos reguliuojamas *TAU* alternatyvusis splaisingas.

3.1.2.Padidintos splaisingo veiksnių SRSF1 arba SRSF5 raiškos įtaka *TAU* 10 egzono įtraukimui ar praleidimui į iRNR normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis

Splaisingo veiksnys SRSF1 buvo nustatytas kaip *TAU* 10 egzono įtraukimo ar praleidimo reguliatorius, skatinantis 10 egzono įtraukimą, normaliomis sąlygomis nervinės ir ne nervinės kilmės ląstelėse (D'Souza ir Schellenberg, 2006). Duomenų apie SRSF5 vaidmenį *TAU* splaisingo reguliacijai smegenų ląstelėse nebuvo, todėl naudojant abi smegenų ląstelių linijas tirta, ar splaisingo veiksniai SRSF1 ir SRSF5 gali paveikti *TAU* 10 egzono įtraukimą ar praleidimą į besiformuojančią iRNR hipoksinėmis sąlygomis.

Padidinta SRSF1 raiška U-87 ir SK-N-BE(2) ląstelėse, kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis, paskatina *TAU* 4R iRNR splaisingo varianto susidarymą (3.3 pav. A–D, 2 takelis). Duomenys parodo, kad padidinta SRSF1 baltymo raiška apie 1,5 karto padidina 10 egzono įtraukimą į *TAU* 4R iRNR splaisingo variantą lyginant su kontrole (ląstelės transfekuotos baltymo nekoduojančia plazmidine DNR) (3.3 pav. A–D, 1, 2 takeliai) normaliomis sąlygomis kultivuotose ląstelėse.

Padidinta splaisingo veiksnio SRSF1 raiška abiejų linijų ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, taip pat apie 1,5 karto padidina 10 egzono įtraukimą į *TAU* 4R iRNR splaisingo variantą (3.3 pav. A–D, 4, 5 takeliai).

Padidinta splaisingo veiksnio SRSF5 raiška neparodo jokios ženklios įtakos alternatyviam *TAU* pre-iRNR splaisingui nei U-87, nei SK-N-BE (2) ląstelėse, kultivuotose tiek normaliomis, tiek ir hipoksinėmis sąlygomis (3.3 pav. A–D, 1, 3, 4, 6 takeliai).



3.3 pav. Padidintos splaisingo veiksnių SRSF1 ir SRSF5 raiškos įtaka *TAU* 4R ir 3R iRNR izoformų variantų susidarymo profiliui. (A) U-87 ir (C) SK-N-BE (2) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. 4R ir 3R iRNR izoformų kiekybinis santykis U-87 (B) ir SK-N-BE(2) (D) ląstelėse, kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *TAU* (4R + 3R) iRNR kiekis yra 100 %. 1, 4 takeliai – kontrolės, 2, 5 takeliai – padidinta SRSF1 raiška, 3, 6 takeliai – padidinta SRSF5 raiška. Kontrolė (angl. *loading control*) – 18S RNR. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n = 3), *p < 0,05.

SRSF1 ir SRSF5 baltymų raiškos palyginimas parodo panašius abiejų baltymų kiekius normalioje deguonies ir hipoksinėje mikroaplinkoje kultivuotose ląstelėse.

Šiame tyrime nustatyta, kad padidinta SRSF1, bet ne SRSF5 veiksnio raiška skatina *TAU* 4R iRNR varianto formavimąsi hipoksinėse U-87 ir SK-N-BE (2) ląstelėse. Hipoksinė mikroaplinka neturi įtakos nei SRSF1, nei SRSF5 baltymų kiekiui.

3.1.3.Sumažintos SRSF1 ir SRSF5 veiksnių raiškos poveikis TAU 10 egzono įtraukimui ar praleidimui į iRNR normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis

Toliau analizuota, ar sumažinta SRSF1 arba SRSF5 raiška turi poveikį *TAU* pre-iRNR alternatyviam 10 egzono splaisingui smegenų ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis. Endogeniniam SRSF1 ir SRSF5 kiekiui sumažinti U-87 ir SK-N-BE(2) ląstelėse buvo naudojama CRISPR/Cas9 sistema (2.2.22).

SRSF1 baltymo raiškos sumažinimas abiejose ląstelių linijose sukelia apie dvigubą *TAU* 4R iRNR splaisingo varianto sumažėjimą (3.4 pav. A–D, 1, 2 takeliai). Hipoksinėmis sąlygomis SRSF1 raiškos sumažinimas abiejose ląstelių linijose parodo tik nedidelį 4R *TAU* iRNR izoformos susidarymo sumažėjimą (3.4 pav. A–D, 4, 5 takeliai). Šis pokytis svarbus, nes hipoksija savaime padidina 4R iRNR splaisingo varianto formavimąsi.



3.4 pav. Sumažintos splaisingo veiksnių SRSF1 ir SRSF5 raiškos įtaka *TAU* iRNR variantų susidarymo profiliui. (A) U-87 ir (C) SK-N-BE (2) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. 4R ir 3R iRNR izoformų kiekybinis santykis U-87 (B) ir SK-N-BE(2) (D) ląstelėse, kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *TAU* (4R + 3R) iRNR kiekis yra 100 %. 1, 4 takeliai – kontrolės, 2, 5 takeliai – sumažinta SRSF1 raiška, 3, 6 takeliai – sumažinta SRSF5 raiška. Kontrolė (angl. *loading control*) – 18S RNR. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n = 3), *p < 0,05.

Splaisingo veiksnio SRSF5 raiškos sumažinimas neturi jokio ženklaus poveikio *TAU* 3R/4R santykiui abiejose ląstelių linijose tiek normaliomis, tiek hipoksinėmis sąlygomis (3.4 pav. A–D, 3, 6 takeliai). Galima teigti, kad veiksnys SRSF5 nedalyvauja *TAU* iRNR 10 egzono įtraukimo ar praleidimo reguliacijoje.

Nustatyta, kad hipoksinėmis sąlygomis SRSF1 raiškos sumažinimas turi tik nedidelį poveikį, koks *TAU* 4R/3R iRNR santykis susidarys tiek U-87, tiek SK-N-BE(2) ląstelių linijose. Taip pat nenustatyta jokia SRSF5 įtaka *TAU* 10 egzono įtraukimui ar praleidimui į besiformuojančią iRNR tirtose ląstelių linijose. Atsako į hipoksiją kompleksiškumas leidžia daryti prielaidą, kad *TAU* 10 egzono splaisingas gali būti reguliuojamas SRSF1 kartu su dar nenustatytais veiksniais.

3.1.4. Hipoksijos įtaka CLK šeimos kinazių raiškai

Ankstesniuose tyrimuose parodyta, kad SR baltymų kinazių (CLK1, SRPK1 ir SRPK2) raiška yra padidėjusi gimdos kaklelio ir prostatos vėžinėse ląstelių linijose, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis (Jakubauskienė ir kt., 2015; Bowler ir kt., 2018).



3.5 pav. Hipoksija sukelia CLK šeimos kinazių raiškos pokyčius. (A) U-87 ir (C) SK-N-BE (2) ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. Kontrolė (angl. *loading control*) – 18S RNR. (D) Kiekybiniai CLK šeimos kinazių iRNR pokyčiai hipoksinėmis sąlygomis. Visų kinazių RNR raiška normaliomis deguonies sąlygomis augintose ląstelėse laikoma 1 (kontrolė) ir diagramoje žymima vienu stulpeliu dėl paprastumo. 2, 3, 4 ir 5 stulpeliai atitinkamai vaizduoja *CLK1*, *CLK2*, *CLK3* ir *CLK4* iRNR raiškos pokyčius U-87 (B) ir SK-N-BE (2) (D) ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis (H) sąlygomis. Reikšmių vidurkis \pm SN apskaičiuotas iš penkių nepriklausomų eksperimentų (n = 5), *p < 0,05.

Taip pat patikrinta keturių CLK kinazių šeimos baltymų (CLK 1-4) raiška hipoksinėse SK-N-BE(2) ir U-87 ląstelėse. Nustatyta, jog visų šių kinazių iRNR raiška yra padidėjusi hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose ląstelėse.

3.2. U2AF – nuo hipoksijos priklausomas alternatyvaus splaisingo reguliatorius

Pastaruoju metu nustatyta, kad ląstelių linijose, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, *FAS* pre-iRNR splaisingas keičiasi iš proapoptotinės (*FAS*) į anti-apoptotinę (*sFAS*) iRNR izoformą, neturinčią 6-tojo egzono sekos, koduojančios transmembraninį domeną (Pečiulienė ir kt., 2019). Padidėjęs *sFAS* susidarymas nustatytas ir daugelio navikų atvejų. Šioje tyrimų dalyje kaip modelinė sistema buvo naudojama endogeninė *FAS* pre-iRNR žmogaus tiesiosios žarnos vėžio (HCT116) ląstelėse, kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis.

3.2.1.U2AF65 subvieneto raiškos įtaka FAS pre-iRNR splaisingui

U2AF yra heterodimerinis splaisingo veiksnys, sudarytas iš 65 kDa ir 35 kDa subvienetų. Pirmiausia patikrinta 65 kDa U2AF subvieneto kiekio įtaka nuo hipoksijos priklausomam alternatyviam *FAS* splaisingui. Rezultatai parodo, kad ląstelėse, kultivuotose 24 h hipoksinėmis sąlygomis, buvo skatinamas anti-apoptotinės *sFAS* iRNR izoformos susidarymas ir slopinamas pro-apoptotinės *FAS* iRNR izoformos susidarymas (3.6 pav. 1, 4 takeliai). U2AF65 raiškos padidinimas, lyginant su kontrole (ląstelės transfekuotos baltymo nekoduojančia plazmidine DNR), sukelia *FAS* iRNR izoformos susidarymo padidėjimą ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis (3.6 pav. 4, 5 takeliai).

Sumažinta U2AF65 raiška nežymiai padidina *sFAS* iRNR izoformos susidarymą normaliomis deguonies sąlygomis kultivuotose ląstelėse (3.6 pav. 1, 3 takeliai) ir padidina šios izoformos susidarymą hipoksinėmis sąlygomis (3.6 pav. 4, 6 takeliai), lyginant su kontrole. Sumažinta U2AF65 raiška sumažina *FAS* iRNR izoformos susidarymą tiek normaliomis deguonies, tiek hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose ląstelėse (3.6 pav. 3, 6 takeliai).

Gauti rezultatai rodo, kad padidinta arba sumažinta U2AF65 baltymo raiška hipoksinėse ląstelėse labiausiai veikia *FAS* iRNR susidarymą ir turi tik nedidelį poveikį *sFAS* iRNR susidarymui.



3.6 pav. Splaisingo veiksnio U2AF65 raiškos įtaka *FAS* ir *sFAS* iRNR izoformų profilio susidarymui. (A) HCT116 ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. 1, 4 takeliai – kontrolė, 2, 5 takeliai – padidinta U2AF65 raiška, 3, 6 takeliai – sumažinta U2AF65 raiška. WB – "Western blot" immunohibridizacija. Kontrolės (angl. *loading control*) – 18S RNR (AT-PGR), β-aktinas (WB). *FAS* ir *sFAS* izoformų kiekybinis santykis HCT116 ląstelėse (B), kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *FAS* (*FAS* + *sFAS*) iRNR kiekis yra 100 %. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš penkių nepriklausomų eksperimentų (n = 5), *p < 0,05.

3.2.2.U2AF35 subvieneto raiškos įtaka FAS pre-iRNR splaisingui

Taip pat tikrintas U2AF 35 kDa subvieneto vaidmuo nuo hipoksijos priklausomam splaisingui.

Padidinta U2AF35 ląstelinė raiška šiek tiek sumažina *sFAS* iRNR susidarymą normaliomis sąlygomis (3.7 pav. 1 ir 2 takeliai) ir padidina *FAS* izoformos susidarymą ląstelėse, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis (3.7 pav. 4 ir 5 takeliai).



3.7 pav. Splaisingo veiksnio U2AF35 raiškos įtaka *FAS* ir *sFAS* iRNR izoformų profilio susidarymui. (A) HCT116 ląstelėse, kultivuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis. 1, 4 takeliai – kontrolė, 2, 5 takeliai – padidinta U2AF35 raiška, 3, 6 takeliai – sumažinta U2AF35 raiška. *FAS* ir *sFAS* izoformų kiekybinis santykis HCT116 ląstelėse (B), kultivuotose normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis. Visas *FAS* (*FAS* + *sFAS*) iRNR kiekis yra 100 %. WB – "Western blot" immunohibridizacija. Kontrolės (angl. *loading control*) – 18S (AT-PGR), β-aktinas (WB). Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš penkių nepriklausomų eksperimentų (n = 5), *p < 0,05.

Sumažinta U2AF35 raiška, naudojant siRNR (2.2.9), normaliomis sąlygomis kultivuotose HCT116 ląstelėse parodo hipoksinėms ląstelėms būdingą iRNR susidarymo profilį (3.7 pav. 1, 3 ir 4 takeliai) ląstelėse. Hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose HCT116 ląstelėse U2AF35 raiškos sumažinimas dar labiau padidina *sFAS* izoformos susidarymą lyginant su
kontrole (3.7 pav. 4 ir 6 takeliai). Galima teigti, kad U2AF35 turi poveikį *FAS* iRNR susidarymui hipoksinėse HCT116 ląstelėse.

3.2.3.Hipoksinėse ląstelėse U2AF subvienetų sąveika su RNR yra silpnesnė

Tirta, kaip veiksnys U2AF dalyvauja *FAS* splaisingo reguliacijoje. Reikšmingų U2AF subvienetų raiškos pokyčių, lyginant normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotas ląsteles, nenustatyta (3.8 pav. A). Taip pat nenustatyta bendros *FAS* iRNR raiškos pokyčių tarp normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotų ląstelių; hipoksija neturi poveikio bendrai *FAS* iRNR raiškai (3.8 pav. B).



3.8 pav. U2AF subvienetų sąveikos su RNR pokyčiai hipoksinėmis sąlygomis. U2AF subvienetų raiška HCT116 ląstelėse, kultivuotose normaliomis (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis (A). *FAS* (*FAS* + *sFAS*) iRNR raiška HCT116 ląstelėse, kultyvuotose normaliomis deguonies (N) ir hipoksinėmis (H) sąlygomis (B). *FAS* 6 introno – 7 egzono RNR sekos, naudotos RNR – baltymų sąveikos eksperimentams (C). *FAS* 5 introno – 5 egzono RNR sekos, naudotos RNR – baltymų sąveikos eksperimentams (D). U2AF65 sąveika su [³²P] žymėta *FAS* 6 introno – 7 egzono RNR (E), U2AF35 sąveika su [³²P] žymėta *FAS* 5 introno – 6 egzono RNR. Raiška normaliomis deguonies sąlygomis yra 1. Reikšmių vidurkis ±SN apskaičiuotas iš trijų nepriklausomų eksperimentų (n = 3).

Taigi, tirtas atskirų U2AF subvienetų sąveikos su RNR efektyvumas normaliose ir hipoksinėse ląstelėse, naudojant stabilaus RNR prijungimo prie baltymo metodą (2.2.16).

Šiame tyrime naudoti du trumpi RNR konstruktai, apimantys 5 arba 6 introno 3' galinę seką ir 2 nt 6 arba 7 egzono (3.8 pav. C ir D).

Abiejų *FAS* iRNR izoformų susidarymas yra skirtingas hipoksinėse ląstelėse: *FAS* iRNR susidarymas sumažinamas ir *sFAS* iRNR padidinamas. U2AF65 subvieneto sąveikos tyrimams naudota 6 introno seka, nes prieš 3' splaisingo taikinio vietą yra ilga polipirimidininė seka. Tyrimo rezultatai daug aiškesni, lyginant su rezultatais, gautais naudojant 5 introno seką, kuri turi silpną polipirimidininę seką. U2AF35 sąveikos su RNR tyrimams naudota 5 introno seka, nes priešingai nei ankstesniame tyrime, rezultatas žymiai aiškesnis. Taigi, įmanoma, jog 5 introno splaisingas yra priklausomas nuo 3' splaisingo taikinio sekoje esančių AG nukleotidų, o 6 introno pašalinimas yra mažiau priklausomas nuo šių nukleotidų.

Pirmiausia analizuota RNR ir U2AF65 sąveika. U2AF65 stabilaus prijungimo prie RNR tyrimas parodo, kad U2AF65 baltymas hipoksinėse ląstelėse su RNR sąveikauja silpniau nei normaliomis sąlygomis kultivuotose ląstelėse (3.8 pav. E).

Analogiški eksperimentai taip pat parodo sumažėjusį U2AF35 subvieneto sąveikos su RNR efektyvumą hipoksinėse ląstelėse (3.8 pav. F).

Rezultatai parodo, kad hipoksinėse ląstelėse U2AF-RNR sąveikos efektyvumas abiem subvienetams yra mažesnis, lyginant su nomaliomis deguonies sąlygomis kultivuotomis ląstelėmis.

3.2.4.Hipoksinėse ląstelėse pasikeičia abiejų U2AF subvienetų modifikacijos lygis

Palyginus abiejų U2AF subvienetų raišką normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose ląstelėse pokyčių nenustatyta, tačiau aptikta, kad jų sąveikos su RNR efektyvumas sumažėjęs.

Žinoma, kad hipoksinėse ląstelėse SR baltymų kinazių SRPK ir CLK raiška yra padidėjusi (Jakubauskienė ir kt., 2015). Abu U2AF subvienetai turi trumpas RS sritis (Zamore, Patton ir Green, 1992). Šios U2AF subvienetų sritys gali būti fosforilinamos tiek SRPK, tiek CLK kinazių (Colwill ir kt., 1996). Todėl toliau tirta, ar U2AF subvienetai skirtingai modifikuojami hipoksinėse ląstelėse.

Branduolio ekstraktų, išskirtų iš normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis kultivuotų ląstelių, analizė dvikryptės elektroforezės (2.2.13) ir "Western blot" (2.2.14) metodais parodo, kad abiejų U2AF subvienetų mobilumas

hipoksiniuose ekstraktuose šiek tiek pasislinkęs į rūgštinę pusę (3.9 pav.). Tai parodo skirtingus šių baltymų modifikacijos lygius normaliose ir hipoksinėse ląstelėse. Panašu, kad šis pokytis turi įtakos jų sąveikos su RNR efektyvumui.



3.9 pav. Hipoksija indukuoja abiejų U2AF subvienetų modifikacijas. Ląstelių HCT116, augintų normaliomis ir hipoksinėmis sąlygomis, branduolių ekstraktai analizuoti dvikrypte elektroforeze. U2AF35 (A) ir U2AF65 (B) aptikti "Western blot" imunohibridizacija. Kontrolė (angl. *loading control*) – β -aktinas. Rezultatai vaizduoja duomenis iš 3 nepriklausomų eksperimentų.

Gauti rezultatai rodo, kad skirtinga U2AF subvienetų sąveika su RNR hipoksinėse ląstelėse gali būti nulemta padidėjusio 35 kDa ir 65 kDa subvienetų modifikacijos lygio.

4. DISKUSIJA

Neurodegeneracinės ligos siejamos su hipoksija ir dažnai yra susijusios su širdies ligomis (Firoz ir kt., 2015). Širdžiai ir smegenims funkcionuoti būtini dideli energiniai poreikiai. Kraujotakos sutrikimai lemia hipoksijos epizodus, o tai prisideda prie neurodegeneracinių pokyčių progresavimo (Firoz ir kt., 2015). Šiame darbe siekiama atrasti naujus genus, kurių preiRNR splaisingo pokyčiai priklauso nuo hipoksinės ląstelių mikroaplinkos. Taip pat naudojant naujai nustatytus ir jau anksčiau laboratorijoje atrastą *FAS* geno nuo hipoksijos priklausomą 6 egzono įjungimą ar praleidimą nustatyti šį procesą reguliuojančius veiksnius.

Su neurodegeneracinėmis ligomis siejami *APP* ir *MAPT* genai pasirinkti tyrimo objektais, nes nuo šių genų transkriptų alternatyvaus splaisingo būdu susidaro keletas iRNR izoformų. Dėl skirtingų morfologinių savybių skirtingų audinių ląstelės reaguoja į hipoksiją skirtingai (Chi ir kt., 2006), todėl šiame darbe naudotos dvi ląstelių linijos, kilusios iš skirtingų smegenų ląstelių tipų (glijos ir neuroninio audinio).

APP koduojantis genas siejamas su paveldimos neurodegeneracinės Alzheimerio ligos vystymusi, tačiau nebuvo nustatyta hipoksinės mikroaplinkos poveikio šio geno iRNR splaisingo metu susidarančių izoformų profiliui. Tai galėtų reikšti, kad šio geno alternatyviajam splaisingui daugiau įtakos turi mutacijos, o ne hipoksinė mikroaplinka.

Tiriant *TAU* baltymą koduojančio geno, taip pat siejamo su neurodegeneracinių ligų vystymusi, alternatyvųjį pre-iRNR splaisingą, pirmą kartą parodyta, kad hipoksinė mikroaplinka keičia *TAU* 3R/4R iRNR izoformų santykį. Šis pokytis gali turėti įtakos neurodegeneracinių ligų vystymuisi. Žmogaus smegenys sudarytos iš įvairių tipų ląstelių, todėl šiame darbe naudotos glijos ir neuronų kilmės ląstelių linijos. Tyrimo rezultatai parodo, kad hipoksinė mikroaplinka daro įtaką alternatyvaus pre-iRNR splaisingo pokyčiams įvairių tipų smegenų ląstelėse.

Alternatyvaus splaisingo reguliacija yra sudėtingas procesas, kuriame dalyvauja egzoninės ar introninės splaisingo slopiklių ir stipriklių sekos bei išoriniai (angl. *trans*) veiksniai (Wang ir kt., 2015). Vieni iš išorinių veiksnių yra SR baltymai, kurie turi platų veikimo spektrą reguliuojant splaisingą (Long ir Caceres, 2009; Jeong, 2017). Net nedideli SR baltymo SRSF1 pokyčiai gali paveikti silpnų 5° ir 3° splaisingo taikinių splaisingo efektyvumą. *TAU* baltymą koduojančio geno 10 egzonas turi silpnas 5° ir 3° splaisingo taikinio sekas, todėl SRSF1 raiškos ląstelėse pokyčiai lemia šio egzono įtraukimą ar praleidimą neneuroninėse HeLa ir neuroninėse PC12

lastelėse (D'Souza ir Schellenberg, 2006). Buvo labai mažai žinoma apie SR baltymo SRSF5 poveiki alternatyviam TAU 4R/3R iRNR izoformu susidarymui smegenu lastelėse (Qian ir Liu, 2014). Splaisingo veiksniai, kurie dalyvauja reguliuojant alternatyvujį splaisinga normaliomis deguonies sąlygomis, neveikia tų pačių pre-iRNR splaisingo hipoksinėmis salygomis (Pečiulienė ir kt., 2019). Veiksnys SRSF1, bet ne SRSF5 dalyvauja geno, koduojančio TAU 10 egzono alternatyviajame splaisinge normaliomis salvgomis: padidėjusi SRSF1 raiška skatina, o sumažėjusi slopina šio egzono įtraukimą į bręstančią iRNR. Nebuvo žinoma, ar SRSF1 ir SRSF5 vaidmuo susidarant alternatyviam TAU 4R/3R izoformu pusiausvyrai yra toks pat ir hipoksinėmis salvgomis. Atlikti tyrimai naudojant smegenų lasteles, kultivuotas hipoksinėmis salygomis, parodo, kad padidinta SRSF1 raiška skatino TAU 10 egzono itraukima, o sumažinta raiška slopino. Pakitusi SRSF1 raiška taip pat pakeičia 3R/4R izoformu raiškos pusiausvyra. Palyginus SRSF1 baltymo raiška normaliomis salygomis su hipoksinėmis sąlygomis kultivuotomis ląstelėmis, nenustatytas žymus šio baltymo raiškos pokytis.

Parodyta, kad hipoksinė mikroaplinka aktyvuoja SR baltymų kinazių raišką ir tai lemia padidėjusį SR baltymų fosforilinimo lygį (Jakubauskienė ir kt., 2015). Taigi, atlikti CLK1-4 kinazių raiškos tyrimai parodo, kad smegenų ląstelių linijose, kultivuotose hipoksinėmis sąlygomis, jų raiška yra padidėjusi, lyginant su normaliomis deguonies sąlygomis kultivuotomis ląstelėmis. Tikėtina, kad SRSF1 gebėjimo reguliuoti splaisingą pokyčiai yra dėl skirtingos baltymų modifikacijos arba dėl kito splaisingo veiksnio dalyvavimo kartu su SRSF1.

FAS pre-iRNR splaisingas yra reguliuojamas hipoksinės mikroaplinkos: įtraukiamas arba praleidžiamas *FAS* 6 egzonas, koduojantis transmembraninį domeną (Oh ir kt., 2013). Nepaisant to, kad ląstelių linijos yra kilusios iš navikų, jų *FAS* splaisingo profilis panašesnis į sveikų audinių nei navikų (Jakubauskienė ir kt., 2015). Hipoksija ląstelėse skatina *sFAS* izoformos susidarymą (Pečiulienė ir kt., 2019).

Darbe parodyta, kad 6 egzono įtraukimas į besiformuojančią iRNR priklauso nuo abiejų U2AF subvienetų raiškos pokyčių, tačiau nenustatyta, kad hipoksinės sąlygos turėtų įtakos jų raiškai. Šiame darbe pirmą kartą nustatyta, jog *FAS* alternatyvusis splaisingas priklauso nuo U2AF sąveikos su RNR efektyvumo, o 6 egzono praleidimas ypač priklauso nuo U2AF35 ir RNR sąveikos efektyvumo. Sumažinus U2AF35 subvieneto kiekį ląstelėje net normaliomis sąlygomis gaunamas panašus splaisingo profilis, kaip ir hipoksinėmis sąlygomis. Vadinasi, U2AF35 sąveikos efektyvumas su 3[°]-galine splaisingo taikinio seka, kuris susilpninamas hipoksinėje mikroaplinkoje, yra labai svarbus *FAS* 6 egzono įtraukimui į besiformuojančią iRNR.



NORMALIOS DEGUONIES SALYGOS

4.1 pav. Splaisingo reguliacijos hipoksijos metu modelio schema. Normaliomis deguonies sąlygomis (21 % O_2) U2AF-RNR sąveika skatina 6 egzono įtraukimą ir taip padidinamas *FAS* iRNR izoformos susidarymas. Hipoksinėse ląstelėse U2AF-RNR sąveika yra silpnesnė dėl abiejų subvienetų modifikacijos, todėl sumažėja *FAS* ir padaugėja *sFAS* iRNR izoformos susidarymas. Efektyvi abiejų U2AF subvienetų sąveika su RNR yra svarbi *FAS* 6 egzono įtraukimui į besiformuojančią iRNR ląstelėje normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis.

Abu U2AF subvienetai priklauso su SR baltymais susijusių baltymų klasei ir yra SRPK1 ir Clk/Sty kinazių substratai *in vitro* (Rudner ir kt., 1998; Colwill ir kt., 1996; Graveley, 2000). Skirtingai nuo SR baltymų, jie turi trumpą RS sritį N-galinėje baltymo sekoje. Nestebina, kad abiejų U2AF subvienetų modifikacijos lygis yra padidėjęs hipoksinėse ląstelėse, o tai tikriausiai sukelia sumažėjusį baltymo-RNR sąveikos efektyvumą. Atlikto tyrimo rezultatai taip pat rodo, kad ne tik baltymų raiškos pokytis, bet ir

splaisingo veiksnių modifikacijos pokyčiai, lemiantys jų aktyvumo pokyčius, yra svarbūs skirtingų iRNR izoformų susidarymui ląstelėje.

Siūlomas nuo hipoksijos priklausomo *FAS* alternatyviojo splaisingo modelis pavaizduotas 4.1 pav. Normaliomis sąlygomis efektyvi U2AF-RNR sąveika skatina 6 egzono įtraukimą ir taip padidina *FAS* iRNR kiekį. Hipoksinėse ląstelėse pakinta abiejų U2AF subvienetų modifikacijos lygis, dėl to sumažėja jų sąveikos su RNR efektyvumas ir pakeičiamas iRNR izoformų susidarymo profilis.

Apibendrinant galima teigti, jog šiame darbe parodyta, kad hipoksinė mikroaplinka keičia *MAPT* iRNR splaisingo būdu susidarančių izoformų profilį, tačiau neturi įtakos *APP* geno splaisingui. Nustatyta, kad splaisingo veiksnio SRSF1 raiškos pokyčiai veikia *TAU* 4R ir 3R izoformų susidarymo santykį, o splaisingo veiksnio SRSF5 raiškos pokyčiai neturi jokio poveikio 10 *TAU* egzono įtraukimui ar praleidimui. Taip pat nustatyta, kad CLK1-4 kinazių raiška yra padidėjusi smegenų ląstelių linijose hipoksinėmis sąlygomis.

Šiame darbe pirmą kartą nustatyta, jog pre-iRNR splaisingo pokyčius lemia ne tik splaisingo veiksnių raiškos, bet ir jų modifikacijų pokyčiai. Nustatyta, kad U2AF-RNR sąveika yra sumažėjusi hipoksinėse ląstelėse. Abiejų U2AF subvienetų modifikacijos lygis yra padidėjęs hipoksinėmis sąlygomis, o tai nulemia jų susilpnėjusią sąveiką su RNR. Efektyvi abiejų U2AF subvienetų sąveika su RNR yra svarbu 6 *FAS* egzono įtraukimui į besiformuojančią iRNR normaliomis deguonies ir hipoksinėmis sąlygomis. Taip pat pirmą kartą pademonstruotas hipoksijos ir hipoksijos indukuojamų molekulinių kelių indėlis į neurodegeneracijos procesus ir nustatyta, kad U2AF gali būti pagrindinis veiksnys reguliuojant hipoksinį splaisingą.

IŠVADOS

1. Hipoksinė mikroaplinka smegenų ląstelėse skatina *TAU* 4R iRNR izoformos susidarymą, bet neturi įtakos *APP* alternatyviajam pre-iRNR splaisingui.

2. SRSF1 splaisingo veiksnio raiškos pokyčiai smegenų ląstelėse keičia *MAPT* pre-iRNR alternatyvųjį splaisingą esant tiek normalioms, tiek hipoksinėms sąlygoms: padidinta SRSF1 raiška skatina, o sumažinta slopina *TAU* 4R izoformos susidarymą. SRSF5 veiksnio raiškos pokyčiai neturi įtakos *TAU* 3R/4R iRNR izoformų susidarymui.

3. U2AF65 raiškos pokyčiai turi įtakos pro-apoptotinės *FAS* iRNR izoformos susidarymui normaliomis deguonies bei hipoksinėmis sąlygomis kultivuotose HCT116 ląstelėse.

4. Anti-apoptotinės s*FAS* iRNR izoformos susidarymui įtakos turi U2AF35 raiškos pokyčiai HCT116 ląstelėse tiek normaliomis deguonies, tiek hipoksinėmis sąlygomis.

5. Hipoksinė mikroaplinka sumažina abiejų U2AF subvienetų sąveikos su *FAS* pre-iRNR efektyvumą.

6. Hipoksinės sąlygos ląstelių mikroaplinkoje keičia U2AF65 ir U2AF35 subvienetų modifikacijos lygį.

- Abelson, J., Trotta, Ch. R., ir Li, H. 1998. "TRNA Splicing". Journal of Biological Chemistry 273 (21): 12 685–88. https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12685.
- Andreadis, A. 2005. "Tau Gene Alternative Splicing: Expression Patterns, Regulation and Modulation of Function in Normal Brain and Neurodegenerative Diseases". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* - *Molecular Basis of Disease*, The Biology and Pathobiology of Tau, 1 739 (2): 91–103. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.010.
- Azubel, M., Sharon, G. W., Sperling, J., ir Sperling, R. 2004. "Three-Dimensional Structure of the Native Spliceosome by Cryo-Electron Microscopy". *Molecular Cell* 15 (5): 833–39. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.022.
- Barathova, M., Takacova, M., Holotnakova, T., Gibadulinova, A., Ohradanova, A., Zatovicova, M., Hulikova, A., ir kt. 2008. "Alternative Splicing Variant of the Hypoxia Marker Carbonic Anhydrase IX Expressed Independently of Hypoxia and Tumour Phenotype". *British Journal of Cancer* 98 (1): 129–36. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604111.
- Bartoszewska, S., ir Collawn, J. F. 2020. "Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia". *Cellular & Molecular Biology Letters* 25 (1): 18. https://doi.org/10.1186/s11658-020-00212-1.
- Bernardi, R., Guernah, I., Jin, D., Grisendi, S., Alimonti, A., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Simon, M. C., Rafii, S., ir Pandolfi, P. P. 2006. "PML Inhibits HIF-1α Translation and Neoangiogenesis through Repression of MTOR". *Nature* 442 (7 104): 779–85. https://doi.org/10.1038/nature05029.
- Biamonti, G., Amato, A., Belloni, E., Di Matteo, A., Infantino, L., Pradella, D., ir Ghigna, C. 2019. "Alternative Splicing in Alzheimer's Disease". Aging Clinical and Experimental Research, spalio. https://doi.org/10.1007/s40520-019-01360-x.
- Biosciences Virtual Libruary. "Virtuali biblioteka." Žiūrėta 2012-12-18, adresu http://biochem4.okstate.edu/~firefly/Bioch205/Bioch205clm folder/b205clm22/rnasynthesis/rnasynthesis.htm.
- Black, D., L. 2000. "Protein Diversity from Alternative Splicing". *Cell* 103 (3): 367–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00128-8.
- Black, D., L. 2003. "Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing". *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 291–336. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720.
- Blasiak, J., Petrovski, G., Veréb, Z., Facskó, A., ir Kaarniranta, K. 2014. "Oxidative Stress, Hypoxia, and Autophagy in the Neovascular

Processes of Age-Related Macular Degeneration". *BioMed Research International* 2014: 1–7. https://doi.org/10.1155/2014/768026.

- Bouillet, P., ir O'Reilly, L. A. 2009. "CD95, BIM and T Cell Homeostasis". *Nature Reviews Immunology* 9 (7): 514–19. https://doi.org/10.1038/nri2570.
- Bowler, E., Porazinski S., Uzor, S., Thibault, P., Durand, M., Lapointe, E., Rouschop, K. M. A., Hancock, J., Wilson, I., ir Ladomery, M. 2018. "Hypoxia leads to significant changes in alternative splicing and elevated expression of CLK splice factor kinases in PC3 prostate cancer cells". *BMC Cancer* 18 (1): 355. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4227-7.
- Brahimi-Horn, Ch., M., ir Pouysségur, J. 2007. "Oxygen, a Source of Life and Stress". *FEBS Letters* 581 (19): 3 582–91. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018.
- Brody, Y., ir Shav-Tal., Y., s. a. "Transcription and Splicing" 2 (5): 5.
- Brunelle, J., Bell, E. L., Quesada, N. M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R. C., ir Chandel, N. S. 2005. "Oxygen Mitochondrial Requires ROS but Not Oxidative Sensing Phosphorylation". Cell Metabolism 1 (6): 409-14. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.002.
- Candelise, L., Landi, G., Orazio, E. N., ir Boccardi, E. 1985. "Prognostic Significance of Hyperglycemia in Acute Stroke". Archives of Neurology 42 (7): 661–63. https://doi.org/10.1001/archneur.1985.04060070051014.
- Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., ir Kieda, C. 2011. "Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (6): 1 239–53. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., ir Ruberti, G. 1995. "Three Functional Soluble Forms of the Human Apoptosis-Inducing Fas Molecule Are Produced by Alternative Splicing." *The Journal of Immunology* 154 (6): 2 706–13.
- Chatterjee, R., ir Chatterjee, J. 2020. "ROS and Oncogenesis with Special Reference to EMT and Stemness". *European Journal of Cell Biology*, kovo, 151073. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151073.
- Chen, R., Hin Lai, U., Zhu, L., Singh, A., Ahmed, M., ir Forsyth, N. R. 2018. "Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00132.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., ir Mountz, J. D. 1994. "Protection from Fas-Mediated

Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule". *Science* 263 (5 154): 1 759–62. https://doi.org/10.1126/science.7510905.

- Chi, Jen-Tsan, Zhen Wang, Dimitry, Nuyten, S. A., Rodriguez, E. H., Schaner, M. E., Salim, A., Wang, Y., ir kt. 2006. "Gene Expression Programs in Response to Hypoxia: Cell Type Specificity and Prognostic Significance in Human Cancers". *PLOS Medicine* 3 (3): e47. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030047.
- Colwill, K., Feng, L. L., Yeakley, J. M., Gish, G. D., Cáceres, J. F., Pawson, T., ir Xiang-Dong Fu. 1996. "SRPK1 and Clk/Sty Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-Rich Splicing Factors*". *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24 569–75. https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24569.
- Dales, J. P., Beaufils, N., Silvy, M., Picard, Ch., Pauly, V., Pradel, V., Formisano-Tréziny, Ch., ir kt. 2010. "Hypoxia inducible factor 1α gene (HIF-1α) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer". *BMC Medicine* 8 (1): 44. https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-44.
- Dang, Ch. V., Kim, J. W., Gao, P., ir Yustein, J. 2008. "The Interplay between MYC and HIF in Cancer". *Nature Reviews Cancer* 8 (1): 51–56. https://doi.org/10.1038/nrc2274.
- David, Ch. J., ir Manley, J. L. 2010. "Alternative Pre-MRNA Splicing Regulation in Cancer: Pathways and Programs Unhinged". *Genes & Development* 24 (21): 2 343–64. https://doi.org/10.1101/gad.1973010.
- Dibble, Ch. C., ir Manning, B. D. 2013. "Signal Integration by MTORC1 Coordinates Nutrient Input with Biosynthetic Output". *Nature Cell Biology* 15 (6): 555–64. https://doi.org/10.1038/ncb2763.
- Dorn, G. W., ir Kirshenbaum, L. A. 2008. "Cardiac Reanimation: Targeting Cardiomyocyte Death by BNIP3 and NIX/BNIP3L". *Oncogene* 27 (1): S158–67. https://doi.org/10.1038/onc.2009.53.
- D'Souza, Ian ir Schellenberg, G. D. 2005. "Regulation of Tau Isoform Expression and Dementia". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* – *Molecular Basis of Disease*, The Biology and Pathobiology of Tau, 1 739 (2): 104–15. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.009.
- 2006. "Arginine/Serine-Rich Protein Interaction Domain-Dependent Modulation of a Tau Exon 10 Splicing Enhancer: Altered Interactions and Mechanisms for Functionally Antagonistic Ftdp-17 Mutations Δ280k and N279k". *Journal of Biological Chemistry* 281 (5): 2 460–69. https://doi.org/10.1074/jbc.M505809200.
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., ir kt. 2010. "Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of MTOR Complex 1". *Molecular Cell* 39 (2): 171–83. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022.

- Easton, P. A., Slykerman, L. J., ir Anthonisen, N. R. 1986. "Ventilatory Response to Sustained Hypoxia in Normal Adults". *Journal of Applied Physiology* 61 (3): 906–11. https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.3.906.
- Eng, C. H., ir Abraham, R. T. 2011. "The Autophagy Conundrum in Cancer: Influence of Tumorigenic Metabolic Reprogramming". *Oncogene* 30 (47): 4 687–96. https://doi.org/10.1038/onc.2011.220.
- Firoz, C. K., Jabir, N. R., Khan, M. Sh., Mahmoud, M., Shakil, Sh., Damanhouri, G. A., Zaidi, S. K., Tabrez, Sh., ir Kamal, M. A. 2015. "An Overview on the Correlation of Neurological Disorders with Cardiovascular Disease". *Saudi Journal of Biological Sciences*, Special issue: Biological Aspects of Global Health Issues, 22 (1): 19–23. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.003.
- Fleckner, J., Zhang, M., Valcárcel, J., ir Green, M. R. 1997. "U2AF65 Recruits a Novel Human DEAD Box Protein Required for the U2 SnRNP-Branchpoint Interaction." *Genes & Development* 11 (14): 1 864–72. https://doi.org/10.1101/gad.11.14.1864.
- Gang, H., Hai, Y., Dhingra, R., Gordon, J. W., Yurkova, N., Aviv, Y., Li, H., ir kt. 2011. "A Novel Hypoxia-Inducible Spliced Variant of Mitochondrial Death Gene Bnip3 Promotes Survival of Ventricular Myocytes". *Circulation Research* 108 (9): 1 084–92. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.238709.
- Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, Sh., ir Jiang, X. 2009. "ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates MTOR Signaling and Is Essential for Autophagy". *Journal of Biological Chemistry* 284 (18): 12 297–305. https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200.
- Garcia-Blanco, M. A., Baraniak, A. P., ir Lasda, E. L. 2004. "Alternative Splicing in Disease and Therapy". *Nature Biotechnology* 22 (5): 535–46. https://doi.org/10.1038/nbt964.
- Gaubitz, Ch., Prouteau, M., Kusmider, B., ir Loewith, R. 2016. "TORC2 Structure and Function". *Trends in Biochemical Sciences* 41 (6): 532–45. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.001.
- Gesteland, R. F., Cech, T., ir Atkins, J. F., sud. 2006. The RNA world: the nature of modern RNA suggests a prebiotic RNA world. 3rd ed. Cold Spring Harbor monograph series 43. Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E., ir Feinstein, S. C. 2000. "Structural and Functional Differences between 3-Repeat and 4-Repeat Tau Isoforms: IMPLICATIONS FOR NORMAL TAU FUNCTION AND THE ONSET OF NEURODEGENERATIVE DISEASE*". *Journal of Biological Chemistry* 275 (49): 38 182–89. https://doi.org/10.1074/jbc.M007489200.
- Gordan, J. D., Thompson, C. B., ir Simon, M. C. 2007. "HIF and C-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and

Proliferation". *Cancer Cell* 12 (2): 108–13. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.006.

- Graveley, B. R. 2000. "Sorting out the Complexity of SR Protein Functions". *RNA* 6 (9): 1 197–1211. https://doi.org/10.1017/S1355838200000960.
- Groenland, E. H., ir Spiering, W. 2020. "Baroreflex Amplification and Carotid Body Modulation for the Treatment of Resistant Hypertension". *Current Hypertension Reports* 22 (4): 27. https://doi.org/10.1007/s11906-020-1024-x.
- Guertin, D. A., ir Sabatini, D. M. 2007. "Defining the Role of MTOR in Cancer". *Cancer Cell* 12 (1): 9–22. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008.
- Hall, S. L., ir Padgett, R. A. 1996. "Requirement of U12 SnRNA for in Vivo Splicing of a Minor Class of Eukaryotic Nuclear Pre-MRNA Introns". *Science* 271 (5 256): 1 716–18. https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1716.
- Hang, X., Li, P., Li, Z., Qu, W., Yu Y., Li, H., Shen, Z., ir kt. 2009. "Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array". *BMC Genomics* 10 (1): 126. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-126.
- Hara, Sh., Hamada, J., Kobayashi, Ch., Kondo, Y., ir Imura, N. 2001. "Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3α". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287 (4): 808–13. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5659.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., ir Mori, K. 1999. "Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress". *Molecular Biology of the Cell* 10 (11): 3 787–99. https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787.
- Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., ir Myllyharju, J. 2011. "Roles of the Human Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3α Variants in the Hypoxia Response". *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (23): 3 885–3 901. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0679-5.
- Heitman, J., Movva, N. R., ir Hall, M. N. 1991. "Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast". *Science* 253 (5 022): 905–9. https://doi.org/10.1126/science.1715094.
- Hirschfeld, M., zur Hausen, A., Bettendorf, H., Jäger, M. ir Stickeler, E. 2009. "Alternative Splicing of Cyr61 Is Regulated by Hypoxia and Significantly Changed in Breast Cancer". *Cancer Research* 69 (5): 2 082–90. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1997.

- Hnilicova, J., Hozeifi, S., Dus'kova, Icha, E., ir J. 2011. "Histone Deacetylase Activity Modulates Alternative Splicing". *PLoS ONE* 6 (2): 11.
- Höckel, M. ir Vaupel, P. 2001. "Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects". JNCI: Journal of the National Cancer Institute 93 (4): 266–76. https://doi.org/10.1093/jnci/93.4.266.
- Hong, L., ir Hallick, R. B. 1994. "A Group III Intron Is Formed from Domains of Two Individual Group II Introns." Genes & Development 8 (13): 1 589–99. https://doi.org/10.1101/gad.8.13.1589.
- Iadevaia, V., Huo Y., Zhang, Z., Foster, L. J., ir Proud, Ch. G. 2012. "Roles of the Mammalian Target of Rapamycin, MTOR, in Controlling Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis". *Biochemical Society Transactions* 40 (1): 168–72. https://doi.org/10.1042/BST20110682.
- Yamaji, R., Fujita, K., Takahashi, S., Yoneda, H., Nagao, K., Masuda, W., Naito, M., ir kt. 2003. "Hypoxia Up-Regulates Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Mouse Brain Capillary Endothelial Cells: Involvement of Na+/Ca2+ Exchanger". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1 593 (2–3): 269–76. https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00397-x.
- Yamashita, T., Ohneda, O., Nagano, M., Iemitsu, M., Makino, Y., Tanaka, H., Miyauchi, T., ir kt. 2008. "Abnormal Heart Development and Lung Remodeling in Mice Lacking the Hypoxia-Inducible Factor-Related Basic Helix-Loop-Helix PAS Protein NEPAS". *Molecular* and Cellular Biology 28 (4): 1 285–97. https://doi.org/10.1128/MCB.01332-07.
- Yang, H., Rudge, D. G., Koos, J. D., Vaidialingam, B., Yang, H. J., ir Pavletich, N. P. 2013. "MTOR Kinase Structure, Mechanism and Regulation". *Nature* 497 (7 448): 217–23. https://doi.org/10.1038/nature12122.
- Inoue, A., Yamamoto, N., Kimura, M., Nishio, K., Yamane, H., ir Nakajima, K. 2014. "RBM10 Regulates Alternative Splicing". *FEBS Letters* 588 (6): 942–47. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.052.
- Izquierdo, J. M. 2008. "Hu Antigen R (HuR) Functions as an Alternative Pre-MRNA Splicing Regulator of Fas Apoptosis-Promoting Receptor on Exon Definition*". *Journal of Biological Chemistry* 283 (27): 19077–84. https://doi.org/10.1074/jbc.M800017200.
- Izquierdo, J. M., Majós, N., Bonnal, S., Martínez, C., Castelo, R., Guigó, R., Bilbao, D., ir Valcárcel, J. 2005. "Regulation of Fas Alternative Splicing by Antagonistic Effects of TIA-1 and PTB on Exon Definition". *Molecular Cell* 19 (4): 475–84. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.015.

- Izquierdo, J. M., ir Valcárcel, J. 2006. "A Simple Principle to Explain the Evolution of Pre-MRNA Splicing". *Genes & Development* 20 (13): 1679–84. https://doi.org/10.1101/gad.1449106.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., von Kriegsheim, A., ir kt. 2001. "Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O2-Regulated Prolyl Hydroxylation". *Science* 292 (5 516): 468–72. https://doi.org/10.1126/science.1059796.
- Jakubauskienė, E., Pečiulienė, I., Vilys, L., Mocevičius, P., Vilkaitis, G., ir Kanopka, A. 2015. "Gastrointestinal Tract Tumors and Cell Lines Possess Differential Splicing Factor Expression and Tumor Associated MRNA Isoform Formation Profiles". *Cancer Biomarkers* 15 (5): 575–81. https://doi.org/10.3233/CBM-150497.
- Jakubauskienė, E., Vilys, L., Makino, Y., Poellinger, L., ir Kanopka, A. 2015. "Increased Serine-Arginine (SR) Protein Phosphorylation Changes Pre-MRNA Splicing in Hypoxia". *Journal of Biological Chemistry* 290 (29): 18 079–89. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639690.
- Jefferies, H. B., Reinhard, C., Kozma, S. C., ir Thomas, G. 1994. Selectively Translation ..Rapamvcin Represses of the ,Polypyrimidine Tract' MRNA Family". Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (10): 4441-45. https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4441.
- Jeong, S. 2017. "SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA". *Moleucles and Cells* 40 (1): 1–9. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2319.
- Katiyar, S., Liu, E., Knutzen, Ch. A., Lang, E. S., Lombardo, Ch. R., Sankar, S., Toth, J., Petroski, M. D., Ronai, Z., ir Chiang, G. G. 2009. "REDD1, an Inhibitor of MTOR Signalling, Is Regulated by the CUL4A–DDB1 Ubiquitin Ligase". *EMBO Reports* 10 (8): 866–72. https://doi.org/10.1038/embor.2009.93.
- Keith, B., Johnson, R. S., ir Simon, M. C. 2012. "HIF1α and HIF2α: Sibling Rivalry in Hypoxic Tumor Growth and Progression", 28.
- Kent, O. A., Reayi, A., Foong, L., Chilibeck, K. A. ir MacMillan, A. M. 2003. "Structuring of the 3' Splice Site by U2AF65". *Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 50 572–77. https://doi.org/10.1074/jbc.M307976200.
- Khan, D. H., Jahan, S., ir Davie, J. R. 2012. "Pre-MRNA Splicing: Role of Epigenetics and Implications in Disease". Advances in Biological Regulation 52 (3): 377–88. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.04.003.
- Kim, H. K., Pham, M. H. C., Ko, K. S., Rhee, B. D., ir Han, J. 2018. "Alternative Splicing Isoforms in Health and Disease". *Pflügers*

Archiv – European Journal of Physiology 470 (7): 995–1 016. https://doi.org/10.1007/s00424-018-2136-x.

- Koh, M. Y., ir Powis, G. 2012. "Passing the Baton: The HIF Switch". *Trends in Biochemical Sciences* 37 (9): 364–72. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.004.
- Kornblihtt, A. R., De La Mata, M., Fededa, J. P., Muñoz, M. J., ir Nogués, G. 2004. "Multiple Links between Transcription and Splicing". *RNA* 10 (10): 1 489–98. https://doi.org/10.1261/rna.7100104.
- Leask, A., ir Abraham, D. J. 2006. "All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker". *Journal of Cell Science* 119 (23): 4803–10. https://doi.org/10.1242/jcs.03270.
- Lee, J. W., Bae S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., ir Kim, K. W. 2004. "Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1)α: Its Protein Stability and Biological Functions". *Experimental & Molecular Medicine* 36 (1): 1–12. https://doi.org/10.1038/emm.2004.1.
- Lendahl, U., Lee, K. L., Yang, H., ir Poellinger, L. 2009. "Generating Specificity and Diversity in the Transcriptional Response to Hypoxia". *Nature Reviews Genetics* 10 (12): 821–32. https://doi.org/10.1038/nrg2665.
- Leu, T., Schützhold, V., Fandrey, J., ir Ferenz, K. B. 2019. "When the Brain Yearns for Oxygen". *Neurosignals* 27 (1): 50–61.
- Liu, F., ir Gong, Ch. X. 2008. "Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies". *Molecular Neurodegeneration* 3 (1): 8. https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-8.
- Lodish, H. F., sud. 2000. *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman.
- Long, J. C., ir Caceres, J. F. 2009. "The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression". *Biochemical Journal* 417 (1): 15–27. https://doi.org/10.1042/BJ20081501.
- López-Barneo, J., Pardal, R., ir Ortega-Sáenz, P. 2001. "Cellular Mechanism of Oxygen Sensing". *Annual Review of Physiology* 63 (1): 259–87. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.259.
- Lu, H., Dalgard, C. L., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A. S., ir Verma, A. 2005. "Reversible Inactivation of HIF-1 Prolyl Hydroxylases Allows Cell Metabolism to Control Basal HIF-1*". *Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 41 928–39. https://doi.org/10.1074/jbc.M508718200.
- Lumb, A. B. 2017a. "Control of Breathing". *Nunn's Applied Respiratory Physiology*, 51-72.e2. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6294-0.00004-6.
- 2017b. "Hypoxia". Nunn's Applied Respiratory Physiology, 327– 334.e1. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6294-0.00022-8.

- Luo, Y., Xu, W., Li, G., ir Cui, W. 2018. "Weighing In on MTOR Complex 2 Signaling: The Expanding Role in Cell Metabolism". Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018: e7838647. https://doi.org/10.1155/2018/7838647.
- Lutz, P. L., ir Storey, K. B. 2011. "Adaptations to Variations in Oxygen Tension by Vertebrates and Invertebrates". *Comprehensive Physiology*, sudare Ronald Terjung, cp130221. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/cphy.cp130221.
- Mahon, P. C., Hirota, K., ir Semenza, G. L. 2001. "FIH-1: A Novel Protein That Interacts with HIF-1α and VHL to Mediate Repression of HIF-1 Transcriptional Activity". *Genes & Development* 15 (20): 2 675– 86. https://doi.org/10.1101/gad.924501.
- Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., ir Poellinger, L. 2001. "Inhibitory PAS Domain Protein Is a Negative Regulator of Hypoxia-Inducible Gene Expression". *Nature* 414 (6 863): 550–54. https://doi.org/10.1038/35107085.
- Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W. J., Tanaka, H., ir Poellinger, L. 2002. "Inhibitory PAS Domain Protein (IPAS) Is a Hypoxia-Inducible Splicing Variant of the Hypoxia-Inducible Factor-3α Locus". *Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32 405–8. https://doi.org/10.1074/jbc.C200328200.
- Maniatis, T., ir Tasic, B. 2002. "Alternative Pre-MRNA Splicing and Proteome Expansion in Metazoans". *Nature* 418 (6 894): 236–43. https://doi.org/10.1038/418236a.
- Martin, R. L., Lloyd, H. G. E., ir Cowan, A. I. 1994. "The Early Events of Oxygen and Glucose Deprivation: Setting the Scene for Neuronal Death?" *Trends in Neurosciences* 17 (6): 251–57. https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90008-6.
- Martin, S. K., Diamond, P., Gronthos, S., Peet, D. J., ir Zannettino, A. C. W. 2011. "The Emerging Role of Hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in Multiple Myeloma". *Leukemia* 25 (10): 1 533–42. https://doi.org/10.1038/leu.2011.122.
- Mata, M. de la, Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., ir Kornblihtt, A. R. 2003. "A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo". *Molecular Cell* 12 (2): 525–32. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001.
- Matlin, A. J., Clark, F., ir Smith, Ch. W. J. 2005. "UNDERSTANDING ALTERNATIVE SPLICING: TOWARDS A CELLULAR CODE", gegužės, 13.
- McKeown, S. R. 2014. "Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response". *The British Journal*

of Radiology 87 (1 035): 20130676. https://doi.org/10.1259/bjr.20130676.

- Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martínez, C., ir Valcárcel, J. 1999. "Inhibition of Msl-2 Splicing by Sex-Lethal Reveals Interaction between U2AF 35 and the 3' Splice Site AG". *Nature* 402 (6 763): 838–41. https://doi.org/10.1038/45602.
- Michiels, C. 2004. "Physiological and Pathological Responses to Hypoxia". *The American Journal of Pathology* 164 (6): 1 875–82.
- Mori, K. 2009. "Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals". *The Journal of Biochemistry* 146 (6): 743–50. https://doi.org/10.1093/jb/mvp166.
- Muñoz, M. J., de la Mata, M., ir Kornblihtt, A. R. 2010. "The Carboxy Terminal Domain of RNA Polymerase II and Alternative Splicing". *Trends in Biochemical Sciences* 35 (9): 497–504. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.010.
- Nakayama, K., ir Kataoka, N. 2019. "Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions". *International Journal of Molecular Sciences* 20 (13): 3 278. https://doi.org/10.3390/ijms20133278.
- Neuhaus, P., Klupp, J., ir Langrehr, J. M. 2001. "MTOR Inhibitors: An Overview". *Liver Transplantation* 7 (6): 473–84. https://doi.org/10.1053/jlts.2001.24645.
- Niblock, M., ir Gallo, J. M. 2012. "Tau Alternative Splicing in Familial and Sporadic Tauopathies". *Biochemical Society Transactions* 40 (4): 677–80. https://doi.org/10.1042/BST20120091.
- Oh, H. K., Lee, E., Jang, H. N., Lee, J., Moon, H., Sheng, Z., Jun, Y., ir kt. 2013. "HnRNP A1 Contacts Exon 5 to Promote Exon 6 Inclusion of Apoptotic Fas Gene". *Apoptosis* 18 (7): 825–35. https://doi.org/10.1007/s10495-013-0824-8.
- Ostrowski, R. P., ir Zhang, J. H. 2020. "The Insights into Molecular Pathways of Hypoxia-Inducible Factor in the Brain". *Journal of Neuroscience Research* 98 (1): 57–76. https://doi.org/10.1002/jnr.24366.
- Park, S. A., Ahn, S. I., ir Gallo, J. M. 2016. "Tau Mis-Splicing in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders". *BMB Reports* 49 (8): 405–13. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.084.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Parkkila, A., Opavsky, R., Zelnik, V., Saarnio, J., ir Pastorek, J. 1997. "Carbonic Anhydrase IX, MN/CA IX: Analysis of Stomach Complementary DNA Sequence and Expression in Human and Rat Alimentary Tracts". *Gastroenterology* 112 (2): 398–408. https://doi.org/10.1053/gast.1997.v112.pm9024293.
- Patel, A. A., McCarthy, M., ir Steitz, J. A. 2002. "The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression". *The EMBO Journal* 21 (14): 3 804–15. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf297.

- Patel, A. A., ir Steitz, J. A. 2003. "Splicing Double: Insights from the Second Spliceosome". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (12): 960–70. https://doi.org/10.1038/nrm1259.
- Pečiulienė, I., Vilys, L., Jakubauskienė E., Zaliauskienė, L., ir Kanopka, A. 2019. "Hypoxia Alters Splicing of the Cancer Associated Fas Gene". *Experimental Cell Research* 380 (1): 29–35. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.015.
- Perbal, B. 2009. "Alternative Splicing of CCN MRNAs It Has Been upon Us". *Journal of Cell Communication and Signaling* 3 (2): 153– 57. https://doi.org/10.1007/s12079-009-0051-9.
- Pilarsky, Ch. P., Schmidt, U., Eißrich, C., Stade, J., Froschermaier, S. E., Haase, M., Faller, G., Kirchner, T. W., ir Wirth, M. P. 1998. "Expression of the Extracellular Matrix Signaling Molecule Cyr61 Is Downregulated in Prostate Cancer". *The Prostate* 36 (2): 85–91. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19980701)36:2<85:AID-PROS3>3.0.CO;2-D.
- Porter, R. S., Jaamour, F., ir Iwase, S. 2018. "Neuron-Specific Alternative Transcriptional Machineries: Implications Splicing of for Neurodevelopmental Disorders". Molecular and Cellular Neuroscience, Chromatin in nervous system development and 35-45. (kovo): disease. 87 https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.10.006.
- Qian, W., ir Liu F. 2014. "Regulation of Alternative Splicing of Tau Exon 10". *Neuroscience Bulletin* 30 (2): 367–77. https://doi.org/10.1007/s12264-013-1411-2.
- Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, Ch., Lam T., ir kt. 2018. "Comparative Transcriptome Profiling of the Human and Mouse Dorsal Root Ganglia: An RNA-Seq–Based Resource for Pain and Sensory Neuroscience Research". *Pain* 159 (7): 1 325–45. https://doi.org/10.1097/j.pain.000000000001217.
- Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallese, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., ir Glimcher, L. H. 2001. "Plasma Cell Differentiation Requires the Transcription Factor XBP-1". *Nature* 412 (6 844): 300–307. https://doi.org/10.1038/35085509.
- Rymond, B. 2007. "Targeting the Spliceosome" 3 (9): 3.
- Rudner, D. Z., Breger, K. S., Kanaar, R., Adams, M. D., ir Rio, D. C. 1998. "RNA Binding Activity of Heterodimeric Splicing Factor U2AF: At Least One RS Domain Is Required for High-Affinity Binding". *Molecular and Cellular Biology* 18 (7): 4 004–11. https://doi.org/10.1128/MCB.18.7.4004.
- Salminen, A., Kauppinen, A., ir Kaarniranta, K. 2017. "Hypoxia/Ischemia Activate Processing of Amyloid Precursor Protein: Impact of Vascular Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease".

Journal of Neurochemistry 140 (4): 536–49. https://doi.org/10.1111/jnc.13932.

- Sampath, D., Zhu, Y., Winneker, R. C., ir Zhang, Z. 2001. "Aberrant Expression Cvr61. Member of а of the CCN (CTGF/Cyr61/Cef10/NOVH) Family, and Dysregulation by 17β-Estradiol and Basic Fibroblast Growth Factor in Human Uterine Leiomvomas". The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86 707-15. (4): 1 https://doi.org/10.1210/jcem.86.4.7423.
- Saxton, R. A., ir Sabatini, D. M. 2017. "MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease". *Cell* 168 (6): 960–76. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., ir Elazar, Z. 2007. "Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4". *The EMBO Journal* 26 (7): 1 749–60. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623.
- Schindler, A. J., ir Schekman, R. 2009. "In Vitro Reconstitution of ER-Stress Induced ATF6 Transport in COPII Vesicles". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (42): 17 775–80. https://doi.org/10.1073/pnas.0910342106.
- Semenza, G. L. 2014. "Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology". Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 9 (1): 47–71. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104720.
- Semenza, G. L., Shimoda, L. A., ir Prabhakar, N. R. 2006. "Regulation of Gene Expression by HIF-1". Novartis Foundation Symposium 272: 2–8; discussion 8–14, 33–36.
- Sena, J. A., Wang, L., Heasley, L. E., ir Hu, Ch. J. 2014. "Hypoxia Regulates Alternative Splicing of HIF and Non-HIF Target Genes". *Molecular Cancer Research* 12 (9): 1 233–43. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0149.
- Seta, K. A., Yuan, Y., Spicer, Z., Lu, G., Bedard, J., Ferguson, T. K., Pathrose, P., Cole-Strauss, A., Kaufhold, A., ir Millhorn, D. E. 2004. "The Role of Calcium in Hypoxia-Induced Signal Transduction and Gene Expression". *Cell Calcium*, Integrative aspects of calcium involvement in hypoxic response, 36 (3): 331–40. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.02.006.
- Sharp, Ph. A. 1985. "On the Origin of RNA Splicing and Introns". *Cell* 42 (2): 397–400. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90092-3.
- Shchors, K., ir Evan G. 2007. "Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer?" *Cancer Research* 67 (15): 7 059–61. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2053.
- Sheen-Chen, Shyr-Ming, Chen, H. S., Eng, H. L., ir Chen, W. J. 2003. "Circulating Soluble Fas in Patients with Breast Cancer". World

Journal of Surgery 27 (1): 10-13. https://doi.org/10.1007/s00268-002-6378-5.

- Shen, H., Kan, J. L. C., ir Green, M. R. 2004. "Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly". *Molecular Cell* 13 (3): 367–76. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00025-5.
- Sickmier, E. A., Frato, K. E., Shen, H., Paranawithana, Sh. R., Green, M. R., ir Kielkopf, C. L. 2006. "Structural Basis for Polypyrimidine Tract Recognition by the Essential Pre-MRNA Splicing Factor U2AF65". *Molecular Cell* 23 (1): 49–59. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.025.
- Suñé-Pou, M., Prieto-Sánchez, S., Boyero-Corral, S., Moreno-Castro, C., Yousfi, Y. E., M^a Suñé-Negre, J., Hernández-Munain, C., ir Suñé, C. 2017. "Targeting Splicing in the Treatment of Human Disease". *Genes* 8 (3): 87. https://doi.org/10.3390/genes8030087.
- Tollervey, J. R., Wang, Z., Hortobágyi, T., Witten, J. T., Zarnack, K., Kayikci, M., Clark, T. A., ir kt. 2011. "Analysis of Alternative Splicing Associated with Aging and Neurodegeneration in the Human Brain". *Genome Research* 21 (10): 1 572–82. https://doi.org/10.1101/gr.122226.111.
- Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D., ir Bertolotti, A. 2011. "Selective Inhibition of a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1 Restores Proteostasis". *Science* 332 (6 025): 91–94. https://doi.org/10.1126/science.1201396.
- Ule, J., ir Blencowe, B. J. 2019. "Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution". *Molecular Cell* 76 (2): 329–45. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.017.
- Vande V., C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., ir Greenberg, A. H. 2000. "BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore". *Molecular and Cellular Biology* 20 (15): 5 454– 68. https://doi.org/10.1128/MCB.20.15.5454-5468.2000.
- Vézina, C., Kudelski, A., ir Sehgal, S. N. 1975. "RAPAMYCIN (AY-22, 989), A NEW ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC I. TAXONOMY OF THE PRODUCING STREPTOMYCETE AND ISOLATION OF THE ACTIVE PRINCIPLE". *The Journal of Antibiotics* 28 (10): 721–26. https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.721.
- Vilys, L. 2021. "U2AF Hypoxia-Induced Fas Alternative Splicing Regulator". *Experimental Cell Research*, 8.
- Vingtdeux, V., Sergeant, N., ir Buee L. 2012. "Potential Contribution of Exosomes to the Prion-Like Propagation of Lesions in Alzheimer's Disease". Frontiers in Physiology 0. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00229.

- Wahl, M. C., Will, C. L., ir Lührmann, R. 2009. "The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine". *Cell* 136 (4): 701–18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009.
- Walter, P., ir Ron, D. 2011. "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation". *Science* 334 (6 059): 1 081–86. https://doi.org/10.1126/science.1209038.
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y. M., Li, J., Huang, L. F., Lin, J., ir kt. 2015. "Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review)". *Biomedical Reports* 3 (2): 152–58. https://doi.org/10.3892/br.2014.407.
- Webby, C. J., Wolf, A., Gromak, N., Dreger, M., Kramer, H., Kessler, B., Nielsen, M. L., ir kt. 2009. "Jmjd6 Catalyses Lysyl-Hydroxylation of U2AF65, a Protein Associated with RNA Splicing". *Science* 325 (5936): 90–93. https://doi.org/10.1126/science.1175865.
- Will, C. L. ir Lührmann, R. 2005. "Splicing of a Rare Class of Introns by the U12-Dependent Spliceosome". *Biological Chemistry* 386 (8). https://doi.org/10.1515/BC.2005.084.
- Wouters, B. G. ir Koritzinsky, M. 2008. "Hypoxia Signalling through MTOR and the Unfolded Protein Response in Cancer". *Nature Reviews Cancer* 8 (11): 851–64. https://doi.org/10.1038/nrc2501.
- Xiao, Q., Ford, A. L., Xu, J., Yan, P., Lee, K. Y., Gonzales, E., West, T., Holtzman, D. M., ir Lee, J. M. 2012. "Bcl-x Pre-MRNA Splicing Regulates Brain Injury after Neonatal Hypoxia-Ischemia". *Journal* of Neuroscience 32 (39): 13 587–96. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2617-12.2012.
- Zamore, Ph. D., Patton, J. G., ir Green, M. R. 1992. "Cloning and Domain Structure of the Mammalian Splicing Factor U2AF". *Nature* 355 (6361): 609–14. https://doi.org/10.1038/355609a0.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K. I., Dang, Ch. V., ir Semenza, G. L. 2007. "HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity". *Cancer Cell* 11 (5): 407–20. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.001.
- Zorio, D. A. R., ir Blumenthal, T. 1999. "Both Subunits of U2AF Recognize the 3' Splice Site in Caenorhabditis Elegans". *Nature* 402 (6 763): 835–38. https://doi.org/10.1038/45597.

SUMMARY OF DOCTORAL DISERTATION

Laurynas Vilys

Investigating pre-mRNA splicing and its regulatory factors in a hypoxic cell microenvironment

DOCTORAL DISSERTATION

Life sciences, Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2021

INTRODUCTION

Hypoxia is a term used to describe the reduced amount of oxygen in the cell's microenvironment when it is no longer sufficient to maintain normal cell functions. Hypoxia can also be associated with physiological conditions (eg, intense sports, mountain climbing, etc.), but is usually a pathological condition with ischemic disease (heart attack, stroke) and cancer. As the tumor grows, its constituent cells move away from the blood vessels and hypoxic areas are formed, in which cells become resistant to treatment (chemotherapy, radiotherapy), most of which rely on the promotion of damage caused by reactive oxygen species. Hypoxia affects the progression of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and others. One of the pathways for the response to hypoxia is altered expression of protein isoforms formed by alternative pre-mRNA splicing.

Maturation of mRNA is one of the key cellular processes in which mRNA is synthesized from DNA encoding a gene, from which protein synthesis can occur. The maturation of mRNA consists of several steps: transcription, splicing, polyadenylation, 5 'cap attachment and transport of mRNA from the nucleus. Pre-mRNA splicing is one of the steps in mRNA maturation in which non-protein coding sequences (introns) are removed from pre-mRNA and protein coding sequences (exons) are joined. This process in the higher eukaryotes is catalyzed by a multiprotein complex called the splaisosome, composed of more than 100 different proteins and regulatory elements. Alternative splicing is a process by which proteins encoding different or even opposite functions can be formed from a single pre-mRNA. Alternative splicing increases the variety of proteins, but changes in splicing can also lead to diseases such as retinitis pigmentosa and others. It is known that changes in alternative splicing can also lead to the onset and development of neurodegenerative diseases.

Hypoxia alters the splicing profile of some genes and produces protein isoforms that help the cell survive under adverse conditions. Although the consequences of these changes are widely studied, the exact mechanism of regulation remains unclear.

The **aim** of this work was to identify splicing factors that regulate alternative pre-mRNA splicing that is dependent on the hypoxic cell microenvironment.

Specific tasks of the dissertation:

1. To determine the influence of hypoxic cell microenvironment on the formation of mRNA isoforms of genes associated with neurodegenerative diseases.

2. To determine the influence of splicing factors SRSF1 and SRSF5 on the formation of 3R / 4R TAU mRNA isoforms.

3. To determine the influence of individual subunits of the splicing factor U2AF on the hypoxia-dependent formation of FAS / sFAS mRNA isoforms in cells.

4. To determine the changes in the activity of individual subunits of the splice factor U2AF and the causes of these changes, which determine the changes in pre-mRNA splicing in hypoxic cells.

Scientific novelty and practical importance of the thesis

Regulation of pre-mRNA splicing is an extremely complex and intricate process. Numerous factors influencing the formation of alternative isoforms of various genes have been identified under normal oxygen conditions, but it is not known how splicing is regulated under hypoxic conditions. Hypoxia is an important factor in the development of neurodegenerative, oncological and other diseases, but little is known about the influence of hypoxic microenvironment on cellular processes.

In this work, alternative splicing of *APP* and *TAU* genes associated with neurodegenerative diseases and its dependence on the hypoxic cell microenvironment were investigated. Hypoxia has been shown for the first time to induce the formation of the 4R *TAU* mRNA isoform (inclusion of exon 10), which alters the ratio of 3R / 4R isoforms in the cell, an important indicator in the development of neurodegenerative diseases. Pre-mRNA splicing of the *APP* gene is independent of the hypoxic microenvironment. This work also shows that the splicing factor SRSF1 is important in regulating the formation of *TAU* 3R / 4R isoforms. The change in the expression of this factor affects the ratio of *TAU* 3R / 4R isoforms in both cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions. The increased or decreased expression of the splicing factor SRSF5 had no effect on *TAU* alternative splicing.

The second part of this work shows, for the first time, that not only changes in the expression of splicing factors alone regulate the hypoxiadependent gene inclusion / skipping of *FAS* exon 6 in maturing mRNA. The obtained results showed that the level of modification of splicing factors also plays a very important role in the regulation of alternative splicing. Changes in modification of U2AF subunits are important for regulation of hypoxiadependent pre-mRNA splicing, although the expression of this factor subunits does not change when comparing normal oxygen and hypoxic conditions. The results suggest that altered levels of modification change the efficiency of U2AF interaction with RNA, which influences the formation of hypoxia-dependent mRNA isoforms. In this work, a mechanism for the regulation of hypoxia-dependent pre-mRNA splicing has been discovered, which may be one of the key regulators of this process.

These studies on the formation of hypoxia-dependent mRNA isoforms contribute to the understanding of the pathogenesis of neurodegenerative, oncological, and other diseases associated with the hypoxic cellular microenvironment. Establishing a precise mechanism to regulate alternative splicing under hypoxic conditions will make it possible to discover specific targets for the treatment and prevention of diseases.

MATERIALS AND METHODS

Cell line cultivation

HCT116 cells were cultured in McCoy's 5A (Gibco) media, U-87 cells – in EMEM (Gibco) and SK-N-Be(2) cells – in 1:1 mixture of EMEM:F12 (Gibco), supplemented with 10% FBS (Biochrom) and Penicillin / Streptomycin (100 U/ml / 100 μ g/ml) (Biochrom) under 37°C in either normoxic at 5 % CO₂ or hypoxic (24 h at 1 % O2, 5 % CO2, and 94 % N2 in an Invivo200 hypoxic work station (Ruskin Technologies)) conditions.

Reduction of cellular protein levels using CRISPR/Cas9 system

Cas9 expression vector (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)) was obtained from Addgene (Addgene no 62988). Synthesized oligos for single guide RNA (sgRNA) expression were denaturated at 95 °C for 5 min and annealed at room temperature before being cloned between two BpiI sites of linearized Cas9-sgDNA expression vector. Specific target sequences for *SRSF1* and *SRSF5* genes editing were selected by using RGEN Tool (http://www.rgenome.net).

All CRISPR/Cas9 targeting experiments were performed in human glioblastoma U-87 MG and neuroblastoma SK-N-Be (2) cell lines. For targeting individual genes, cells were seeded at 8 x 10⁴ cells per well of 12-well plate in complete medium as described earlier and transfected with constructed Cas9-sgDNA or empty Cas9 plasmid (containing no sgDNA). Cells were treated with puromycin (2 μ g/ml) 72 h post transfection, diluted, and plated in to 96 well plates (1 cell / well). Cells were incubated for 2–3 weeks. Reduced target protein expression containing single cell colonies were identified by Western blotting and confirmed by DNA sequence analysis.

RNA, protein extraction and reverse transcription PCR (RT-PCR)

Cells were harvested by scraping and washed twice with cold PBS. 1/3 of the cells were used for RNA extraction using Quick RNA extraction Kit ("Zymo Research") following the manufacturer's instructions. 1 μ g of extracted total RNA was used in a cDNA synthesis reaction using MuLV Revert Aid reverse transcription kit ("Thermo Fisher Scientific") following the manufacturer's instructions. All PCR reactions were performed using DreamTaq DNA polymerase ("Thermo Fisher Scientific") following the manufacturer's recommendations. PCR products were analyzed on 1,5 % agarose gel in 1 x TBE (90 mM Tris, 90 mM Boric acid, 2mM EDTA (pH =

8) buffer and. Band density was quantified using MultiGauge analysis software (Fuji).

2/3 of the cells collected were lysed in RIPA (100 mM TRIS-HCl (pH = 7,4), 300 mM NaCl, 1 % CA-630, 0,25 % Na-deoxycholate, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (ROCHE), 1 mM PMSF) buffer and samples were incubated on ice for 10 min following 5 min of vortexing. Samples were then centrifuged at 16 000 x g to remove the cell debris. Supernatant was used for protein concentration measurement using Bradford assay (ROTH).

Immunoblot analysis

 $35 \ \mu g$ of cell lysate was run on a $12 \ \%$ Tris-Glycine PAAG at 40 mA per gel (1,5 mm thickness) and then were transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare).

Membranes were blocked with 5 % milk in TBST (20 mM Tris-HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) and, following two 15 min washing steps, incubated with appropriate primary antibodies overnight at +4°C. Membranes were then washed twice for 15 min with TBST and incubated with appropriate secondary antibodies for 2 hours at room temperature. After two washing steps, membranes were visualised using TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) or ECL reagents ("Thermo Fisher Scientific").

UV crosslinking

RNA was labelled using $[\alpha$ -³²P] CTP and $[\alpha$ -³²P] UTP during an in vitro transcription reaction using MEGAshortscript T7 Transcription Kit ("Ambion", "Thermo Fisher Scientific") according to the manufacturer's instructions. 100 ng of labelled RNA and 30 µg protein extract were mixed in Buffer D (20 mM HEPES (pH = 7,9), 20 % (v/v) Glycerol, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA (pH = 8), 0,5 mM DTT) and incubated on ice for 15–30 min. Samples were exposed to UV light for 30 min. Then the samples were treated with RNase A/T1 Mix (80 µg/mL/200 U/mL) ("Thermo Fisher Scientific") (30 min incubation at 37°C), mixed with equal volume of 2x sample buffer (125 mM Tris-HCL (pH = 6,8), 20 % Glycerol, 4 % SDS, 0,2 % 2-Mercaptoethanol, 0,001 % Bromphenol Blue) and incubated at 100°C for 10 min. The reaction mix was then run on 12 % Tris-Glycine PAAG and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was exposed to x-ray film for 14 hours and then used in Western blot analyses.

Obtained images were overlaid to identify corresponding RNA and protein bands.

Nuclear extract preparation

HCT 116 cells were harvested by scraping in cold 1 x PBS. Cell nuclei were separated from the cytoplasmic fraction as described by Dignam et al., 1983 and then lysed with IEF Buffer (7M Urea, 2M thiourea, 2 % CHAPS, 1 % Ampholytes (pH = 3-10), 0,001 % Bromphenol blue).

2D electrophoresis

First dimension NEPHGE was performed according to the protocol of the manufacturer, using a set of standardized materials (from WITA Gmbh). NEPHGE was made with a non-linear pH = 3-10 gradient formed by carrier ampholytes. The mixture of carrier ampholytes and IEF gel solution composition was made according to Klose and Kobalz, 1995 [12].

Two gel solutions were cast in succession in a vertical device for preparation of the two-layered rod gels of the first dimension. For complete polymerization, the gels of the first dimension were held at room temperature for 30 min and then kept in a damp chamber for additional 72 h. The first-dimensional separation of proteins in the rod gels was performed in a vertical electrophoresis device according to the operating instructions of the manufacturer ("Vitavision"). The lower chamber of the device was filled with degassed cathode buffer (0.54M glycerine, 9M urea, 0.75M ethylenediamine). Following fixation of the rod gels in the device, the sample solutions containing 70–80 ug of the protein from nuclear extracts in agarose-supplemented ampholyte phosphate buffer were applied to the anodic sides of the capillary gels, and the remaining volumes of the capillary glass tubes were then covered with a sample stabilizing overlay solution ("Vitavision"). Subsequently, degassed anode buffer (3M urea, 0,73M phosphoric acid) was applied to the upper chamber of the device, and the electrophoretic separation of the first dimension was started by using the following sequence of programmed running conditions: 100 V for 1 hr; 200 V for 1 hr; 400 V for 17,5 hr; 600 V for 1 hr; 1 000 V for 30 min; 1 500 V for 10 min; 2 000 V for 5 min. After the termination of electrophoresis, the rod gels were carefully pushed out of the glass tubes onto plastic rails, and adaptation to the conditions of the second dimension was achieved by a series of three 5-min equilibrations in a corresponding equilibration buffer containing 75 mM DTT, followed by equilibration in the same buffer with 125 mM 2-iodoacetamyde. The equilibrated rod gels of the first dimension were stored at -80° C before application to the second dimension of the 2DE system.

For separation in the second dimension of 2DE, standard SDS-PAGE was performed with 12 % (w/v) polyacrylamide gels using a Minigel-Twin units ("Biometra"). Rod gels of the first dimension were gently transferred from equilibration and storage rails to the top of the stacking gel zones and covered with 0,5 % (w/v) agarose to fix the rod gels. The electrophoresis running conditions of the second dimension separation were set as follows: 15 mA per gel (~100 V) for ~ 15 min (untill the dye reached resolving gel); 30 mA per gel (voltage gradually rises up to 200 V limit) for about 1 hr, until the Bromphenol blue front reached the bottom of the gel. After 2DE protein separation was complete, gels were transferred to Protein Transfer Buffer (PTB) for Western blotting.

Statistical analysis

Statistical significance of all experiments was tested with a Mann Whitney U non-parametric test using R statistical software based on a minimum of 3 independent experiments. A value of *p < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Influence of hypoxic microenvironment on mRNA isoform formation

Pre-mRNA splicing studies of endogenous *TAU* and *APP* genes used human glioblastoma (U-87) and neuroblastoma (SK-N-BE (2)) cells cultured under normal oxygen (21 % O_2) (hereinafter referred to as normal conditions) and hypoxic conditions (1 % O_2) (Figure 3.1A and Figure 3.2A).



Fig. 1. *TAU* pre-mRNA alternative splicing. (A) Splicing scheme and resulting isoforms. RT-PCR of mRNA isoforms 4R and 3R in U-87 (B) and SK-N-BE (2) (D) cells cultured under normal (N) and hypoxic (H) conditions. Quantitative ratio of 4R and 3R isoforms in U-87 (C) and SK-N-BE (2) (E) cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions. The total amount of *TAU* (4R + 3R) mRNA is 100 %. Loading control – 18S RNA. Mean \pm SD values were calculated from five independent experiments (n = 5),** p < 0.01;* p < 0.05.

First, we analyzed inclusion (isoform 4R) or skipping (isoform 3R) of exon 10 in maturing *TAU* mRNA in cells cultured under hypoxic conditions. RT-PCR analysis showed an increase in 4R mRNA isoform formation in both cell lines cultured under hypoxic conditions compared to *TAU* 4R isoform formation in cells cultured under normal oxygen conditions (Fig. 1

B and D). Incorporation of exon 10 into the emerging pre-mRNA was increased approximately 2-fold in cells cultured under hypoxic conditions compared to cells cultured under normal oxygen conditions.



Fig. 2. APP pre-mRNA alternative splicing. (A) Splicing scheme and resulting isoforms. RT-PCR of mRNA isoforms APP770, APP751 and APP695 in U-87 (B) and SK-N-BE (2) (D) cells cultured under normal (N) and hypoxic (H) conditions. Quantitative ratio of APP770, APP751, and APP695 isoforms in U-87 (C) and SK-N-BE (2) (E) cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions. The total mRNA content of APP (APP770 + APP751 + APP695) is 100 %. Loading control – 18S RNA. Mean \pm SD values were calculated from five independent experiments (n = 5).

We compared the formation of three main splicing variants associated with neurodegenerative diseases of *APP* mRNA in U-87 and SK-N-BE (2) cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions. The results showed that the hypoxic microenvironment does not affect the formation of APP770, APP751, and APP695 mRNA splice variants in the analyzed cell lines (Fig. 2 B–E).

In addition, in U-87 and SK-N-BE (2) cells, the formation of the TAU 4R isoform is regulated by the hypoxic microenvironment, in contrast to the formation of *APP* mRNA isoforms. Thus, hypoxia-regulated *TAU* alternative splicing was analyzed in further studies to elucidate the role of individual splicing factors.

Influence of increased expression of splicing factors SRSF1 or SRSF5 to inclusion / skipping of *TAU* exon 10 to mRNA under normal oxygen and hypoxic conditions

The splicing factor SRSF1 has been identified as a regulator of TAU exon 10 inclusion / skipping that promotes exon 10 inclusion under normal conditions in cells of neural and non-neural origin (D'Souza and Schellenberg 2006). No data were available on the role of SRSF5 in the regulation of TAU splicing in brain cells, so we investigated whether splicing factors SRSF1 and SRSF5 could affect TAU exon 10 inclusion / skipping using both brain cell lines under hypoxic conditions.

Increased expression of SRSF1 in U-87 and SK-N-BE (2) cells cultured under normal and hypoxic conditions induced the formation of TAU 4R mRNA (Fig. 3 A–D, lane 2). The data showed that increased SRSF1 protein expression increased the inclusion of exon 10 in the 4R TAU mRNA splice variant by approximately 1.5-fold compared to controls (cells transfected with non-protein-encoding plasmid DNA) (Fig. 3 A – D, lanes 1, 2) in cells cultured under normal conditions.

Increased expression of the splicing factor SRSF1 in both cell lines cultured under hypoxic conditions also increased 4R *TAU* mRNA by approximately 1,5-fold (Fig. 3 A–D, lanes 4, 5).

Increased expression of the splicing factor SRSF5 did not show any significant effect on alternative TAU pre-mRNA splicing in either U-87 or SK-N-BE (2) cells cultured under both normal and hypoxic conditions (Fig. 3 A–D, lanes 1, 3, 4, 6).

Comparison of SRSF1 and SRSF5 protein expression showed similar levels of both proteins in cells cultured in normal and hypoxic microenvironment.



Fig. 3. Influence of increased expression of splicing factors SRSF1 and SRSF5 on the formation profile of *TAU* 4R and 3R mRNA isoform variants. (A) U-87 and (C) in SK-N-BE (2) cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions. Quantitative ratio of 4R and 3R mRNA isoforms in U-87 (B) and SK-N-BE (2) (D) cells cultured under normal and hypoxic conditions. The total amount of *TAU* (4R + 3R) mRNA is 100 %. Lanes 1, 4 – control, lanes 2, 5 – increased SRSF1, lanes 3, 6 – increased SRSF5. Loading control – 18S RNA. Mean ± SD values were calculated from three independent experiments (n = 3),* p < 0,05.

We have shown that increased expression of the factor SRSF1 but not SRSF5 promotes the formation of the *TAU* 4R mRNA variant in hypoxic U-87 and SK-N-BE (2) cells. Hypoxic microenvironment did not effect neither SRSF1 nor SRSF5 protein levels.

Effects of reduced expression of SRSF1 and SRSF5 factors to inclusion / skipping of TAU exon under normal oxygen and hypoxic conditions

We further analyzed whether reduced expression of SRSF1 or SRSF5 would affect *TAU* pre-mRNA alternative exon 10 splicing in brain cells cultured under normal and hypoxic conditions. The CRISPR / Cas9 system was used to reduce endogenous SRSF1 and SRSF5 in U-87 and SK-N-BE (2) cells.



Fig. 4. Influence of reduced expression of splicing factors SRSF1 and SRSF5 on the formation profile of *TAU* mRNA variants. (A) U-87 and (C) in SK-N-BE (2) cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions. Quantitative ratio of 4R and 3R mRNA isoforms in U-87 (B) and SK-N-BE (2) (D) cells cultured under normal and hypoxic conditions. The total amount of *TAU* (4R + 3R) mRNA is 100 %. Lanes 1, 4 – control, lanes 2, 5 – reduced SRSF1, 3, 6 lanes – reduced SRSF5. Loading control – 18S RNA. Mean ± SD values were calculated from three independent experiments (n = 3),* p < 0,05.

Reduction of SRSF1 protein expression in both cell lines resulted in an approximately 2-fold decrease in 4R *TAU* mRNA splice variant (Fig. 4 A–D, lane 1, 2). Under hypoxic conditions, a decrease in SRSF1 expression in both cell lines showed only a small decrease in 4R *TAU* mRNA isoform formation (Fig. 4 A–D, lanes 4, 5). This change is important because hypoxia itself increases the formation of a 4R mRNA splice variant.

Reduction in the expression of the splicing factor SRSF5 had no significant effect on TAU 3R / 4R ratio in both cell lines under neither normal nor hypoxic conditions (Fig. 4 A–D, lanes 3, 6). We can conclude that the factor SRSF5 is not involved in the regulation of the inclusion / skipping of exon 10 in TAU mRNA.

We found that a reduction in SRSF1 expression under hypoxic conditions has only a small effect on TAU 4R / 3R mRNA ratio in both U-87 and SK-N-BE (2) cell lines. We also found no effect of SRSF5 on the inclusion / skipping of TAU exon 10 in the cell lines tested. The complexity of the response to hypoxia suggests that TAU 10 exon splicing may be regulated by SRSF1 in combination with yet unidentified factors.

Influence of hypoxia on the expression of CLK family kinases

Previous studies have shown that the expression of SR protein kinases (CLK1, SRPK1, and SRPK2) is increased in cervical and prostate cancer cell lines cultured under hypoxic conditions (Jakubauskiene et al., 2015; Bowler et al., 2018). We also examined the expression of four CLK kinase family proteins (CLK 1–4) in hypoxic SK-N-BE (2) and U-87 cells. We found that mRNA expression of all these kinases was increased in cells cultured under hypoxic conditions.



Fig. 5. Hypoxia causes changes in the expression of kinases in the CLK family. (A) U-87 and (C) in SK-N-BE (2) cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions. Loading control - 18S RNA. (D) Quantitative changes in mRNA of CLK family kinases under hypoxic conditions. The RNA expression of all kinases in cells grown under normal oxygen conditions is taken as 1 (control) and plotted in a single column for simplicity. Columns 2, 3, 4, and 5 show changes in CLK1, CLK2, CLK3, and CLK4 mRNA expression in U-87 (B) and SK-N-BE (2) (D) cells cultured under hypoxic (H) conditions, respectively. Mean \pm SD values were calculated from five independent experiments (n = 5),* p < 0.05.
U2AF is a hypoxia-dependent regulator of alternative splicing

Recently, in cell lines cultured under hypoxic conditions, FAS premRNA splicing has been shown to change from a pro-apoptotic (FAS) to an anti-apoptotic (sFAS) mRNA isoform lacking the exon 6 sequence encoding the transmembrane domain (Peciuliene et al., 2019). Elevated sFAS formation has also been reported in many tumors. In this part of the study, endogenous FAS pre-mRNA in HCT116 cells cultured under normal and hypoxic conditions was used as a model system.

Influence of U2AF65 subunit expression on FAS pre-mRNA splicing

U2AF is a heterodimeric splicing factor consisting of 65 kDa and 35 kDa subunits. We first examined the effect of the amount of the 65 kDa U2AF subunit on hypoxia-dependent alternative *FAS* splicing. The results showed that in cells cultured for 24 h under hypoxic conditions, the formation of the anti-apoptotic *sFAS* mRNA isoform was promoted and the formation of the pro-apoptotic *FAS* mRNA isoform was inhibited (Fig. 6 lanes 1, 4). An increase in U2AF65 expression compared to controls (cells transfected with non-protein-encoding plasmid DNA) caused an increase in *FAS* mRNA isoform formation in cells cultured under hypoxic conditions (Fig. 6 lanes 4, 5).

Decreased U2AF65 expression slightly increased the formation of *sFAS* mRNA isoform under normal oxygen conditions in cultured cells (Fig. 6 lanes 1, 3) and increased the formation of this isoform under hypoxic conditions (Fig. 6 lanes 4, 6) compared to controls. Reduced U2AF65 expression reduced *FAS* mRNA isoform formation in cells cultured under both normal oxygen and hypoxic conditions (Fig. 6 lanes 3, 6).

The results obtained show that increased or decreased expression of U2AF65 protein in hypoxic cells has the greatest effect on *FAS* mRNA formation and has only a small effect on *sFAS* mRNA formation.



Fig. 6. Influence of splicing factor U2AF65 expression on *FAS* and *sFAS* mRNA isoform profiling. (A) HCT116 cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions. Lanes 1, 4 - control, lanes 2, 5 – increased U2AF65 expression, 3, 6 lanes – reduced U2AF65 expression. WB – Western blot immunohybridization. Loading control – 18S RNA (RT-PCR), β-actin (WB). Quantitative ratio of *FAS* and *sFAS* isoforms in HCT116 cells (B) cultured under normal and hypoxic conditions. The total amount of *FAS* (*FAS* + *sFAS*) mRNA is 100 %. Mean ± SD values were calculated from five independent experiments (n = 5),* p < 0,05.

Influence of U2AF35 subunit expression on FAS pre-mRNA splicing

We also examined the role of the U2AF 35 kDa subunit in hypoxiadependent splicing. Increased U2AF35 cellular expression slightly reduced *sFAS* mRNA production under normal conditions (Fig. 7, lanes 1 and 2) and increased *FAS* isoform formation in cells cultured under hypoxic conditions (Fig. 7, lanes 4 and 5).



Fig. 7. Influence of splicing factor U2AF35 expression on *FAS* and *sFAS* mRNA isoform profile. (A) HCT116 cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions. Lanes 1, 4 – control, lanes 2, 5 – increased U2AF35 expression, lanes 3, 6 – reduced U2AF35 espression. Quantitative ratio of *FAS* and *sFAS* isoforms in HCT116 cells (B) cultured under normal and hypoxic conditions. The total amount of *FAS* (*FAS* + *sFAS*) mRNA is 100 %. WB – Western blot immunohybridization. Loading control – 18S (RT-PCR), β-actin (WB). Mean ± SD values were calculated from five independent experiments (n = 5),* p < 0,05.

Reduced expression of U2AF35 in HCT116 cells cultured under normal conditions showed a mRNA-forming profile characteristic of hypoxic cells (Fig. 7, lanes 1, 3, and 4). Reduction of U2AF35 expression in HCT116 cells cultured under hypoxic conditions further increased sFAS isoform formation compared to controls (Fig. 7 lanes 4 and 6). It can be concluded, that U2AF35 has an effect on *FAS* mRNA formation in hypoxic HCT116 cells.

In hypoxic cells, the interaction between U2AF subunits and RNA is weaker

We investigated how U2AF is involved in the regulation of *FAS* splicing. No significant changes in the expression of U2AF subunits were observed when comparing cells cultured under normal and hypoxic conditions (Fig. 8 A). We also found no change in total *FAS* mRNA expression between cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions; hypoxia had no effect on overall *FAS* mRNA expression (Fig. 8 B). Thus, we investigated the efficiency of interaction of individual U2AF subunits with RNA in normal and hypoxic cells.



Fig. 8. Changes in the interaction of U2AF subunits with RNA under hypoxic conditions. Expression of U2AF subunits in HCT116 cells cultured under normal (N) and hypoxic (H) conditions (A). *FAS* (*FAS* + *sFAS*) mRNA expression in HCT116 cells cultured under normal oxygen (N) and hypoxic (H) conditions (B). *FAS* intron 6 – exon 7 RNA sequences used in RNA – protein interaction experiments (C). FAS intron 5 – exon 5 RNA sequences used in RNA – protein interaction experiments (D). U2AF65 interaction with [32P]-labeled *FAS* intron 6-exon 7 RNA (E), U2AF65 interaction with [32P]-labeled *FAS* intron 5–6 exon RNA. The expression under normal oxygen conditions is 1. The mean \pm SD of the values was calculated from three independent experiments (n = 3).

In this study, we used two short RNA constructs comprising the 3 ' end sequence of intron 5 or 6 and 2 nt of exon 6 or 7 (Fig. 8 C and D).

The formation of both *FAS* mRNA isoforms is different in hypoxic cells: *FAS* mRNA formation is reduced and *sFAS* mRNA is increased.

We first analyzed the interaction between RNA and U2AF65. A study of stable binding of U2AF65 to RNA showed that the U2AF65 protein interacts less with RNA in hypoxic cells than in cells cultured under normal conditions (Fig. 8 E).

Analogous experiments also showed reduced efficiency of U2AF35 subunit interaction with RNA in hypoxic cells (Fig. 8 F).

The results showed that the efficiency of U2AF-RNA interaction in hypoxic cells is lower for both subunits compared to cells cultured under normal oxygen conditions.

In hypoxic cells, the level of modification of both U2AF subunits changes

Comparing the expression of both U2AF subunits in cells cultured under normal and hypoxic conditions, we found no change in the efficiency of their interaction with RNA.

The expression of SR protein kinases SRPK and CLK in hypoxic cells is known to be increased (Jakubauskiene et al., 2015). Both U2AF subunits have short RS regions (Zamore, Patton and Green, 1992). These regions of the U2AF subunits can be phosphorylated by both SRPK and CLK kinases (Colwill et al., 1996). Therefore, we further investigated whether U2AF subunits are differentially modified in hypoxic cells.

Analysis of nuclear extracts isolated from cells cultured under normal and hypoxic conditions by 2-dimensional electrophoresis and Western blot showed that the mobility of both U2AF subunits in hypoxic extracts was slightly shifted to the acidic side (Figure 9). This indicates different levels of modification of these proteins in normal and hypoxic cells. This change appears to effect the efficiency of their interaction with RNA.



Fig. 9. Hypoxia induces modifications in both U2AF subunits. Nuclear extracts of HCT116 cells grown under normal and hypoxic conditions were analyzed by twodimensional electrophoresis. U2AF35 (A) and U2AF65 (B) detected by Western blot immunohybridization. Loading control – β -actin. The results represent data from three independent experiments.

The results obtained suggest that different interactions of U2AF subunits with RNA in hypoxic cells may be due to increased levels of modification of 35 kDa and 65 kDa subunits.

DISCUSSION

Neurodegenerative diseases are often connected with heart diseases (Firoz et al., 2015). Although heart and brain are made up of different cells, their common feature is high energy demmand to function. Circulatory disorders lead to hypoxic episodes, which contribute to the progression of neurodegeneration (Firoz et al., 2015). The aim of this work is to discover new genes whose changes in pre-mRNA splicing depend on the hypoxic microenvironment of cells. Also using newly identified and previously in the laboratory discovered hypoxia-dependent FAS gene exon 6 inclussion / skipping to identify the factors regulating this process.

The *APP* and *MAPT* genes, associated with neurodegenerative diseases, have been selected for study because several isoforms are formed from these genes by alternative splicing. Due to varying morphological properties, cells of different tissues respond differently to hypoxia (Chi et al., 2006), so two cell lines derived from different brain tissues (glial and neuronal tissue) were used in this work.

The gene encoding *APP* has been implicated in the development of hereditary neurodegenerative Alzheimer's disease, but no effect of a hypoxic microenvironment on the profile of isoforms formed during mRNA splicing of this gene has been identified. This could mean that alternative splicing of this gene is more affected by mutations than by the hypoxic microenvironment.

By investigating alternative pre-mRNA splicing of the gene encoding the TAU protein, which is also involved in the development of neurodegenerative diseases, we have shown for the first time that the hypoxic microenvironment alters the ratio of TAU 3R / 4R mRNA isoforms. This change may effect the development of neurodegenerative diseases. The human brain is made up of different types of cells, so we used cell lines of glial and neuronal origin in this work. The results obtained suggest that the hypoxic microenvironment influences changes in alternative pre-mRNA splicing in various types of brain cells.

Regulation of alternative splicing is a complex process involving exonic / intronic sequences of splicing inhibitors and enhancers and external (trans) factors (Wang et al., 2015). One of the external factors are SR proteins, which have a broad spectrum of function in regulating splicing (Long and Caceres, 2009; Jeong, 2017). Even small changes in the SR protein SRSF1 may affect the splicing efficiency of weak 5' and 3' splice targets. Exon 10 of

the gene encoding the TAU protein has weak 5' and 3' splice target sequences, so changes in SRSF1 expression in cells result in inclusion / skipping of this exon in non-neuronal HeLa and neuronal PC12 cells (D'Souza and Schellenberg, 2006). Very little has been known about the effect of the SR protein SRSF5 on the alternative formation of TAU 4R / 3R mRNA isoforms in brain cells (Oian and Liu, 2014). Splicing factors involved in the regulation of alternative splicing under normal oxygen conditions do not regulate the same pre-mRNA splicing under hypoxic conditions (Peciuliene et al., 2019) The factor SRSF1, but not SRSF5, is involved in the alternative splicing of the gene encoding TAU exon 10 under normal conditions: increased expression of SRSF1 promotes and decreased inhibits inclussion of this exon into the maturing mRNA. It was not known whether SRSF1 and SRSF5 play the same role in the formation of an alternative TAU 4R / 3R isoform balance under hypoxic conditions. Our studies using brain cells cultured under hypoxic conditions showed that increased expression of SRSF1 promoted the inclusion of TAU exon 10, whereas decreased expression inhibited it. Altered expression of SRSF1 also alters the expression balance of the 3R / 4R isoforms. Comparison of SRSF1 protein expression under normal conditions with cells cultured under hypoxic conditions revealed no significant change in the expression of this protein.

It has been previously shown that the hypoxic microenvironment activates the expression of SR protein kinases and this results in an increased level of SR protein phosphorylation (Jakubauskiene et al., 2015). Our CLK1-4 kinase expression studies have shown that in brain cell lines cultured under hypoxic conditions, their expression is increased compared to cells cultured under normal oxygen conditions. Changes in the ability of SRSF1 to regulate splicing are likely to be due to different protein modification or the involvement of another splicing factor in combination with SRSF1.

FAS pre-mRNA splicing is regulated by the hypoxic microenvironment: *FAS* exon 6, encoding the transmembrane domain is included or skipped (Oh et al., 2013). Despite the fact that the cell lines are derived from tumors, their *FAS* splicing profile is more similar to that of healthy tissues than that of tumors (Jakubauskiene et al., 2015). Hypoxia in cells promotes the formation of the *sFAS* isoform (Peciuliene et al., 2019).

NORMOXIA



Fig. 10. Schematic of splicing regulation in hypoxia. Under normal oxygen conditions (21 % O_2), the U2AF-RNA interaction promotes the inclusion of exon 6 and thus increases the formation of the *FAS* mRNA isoform. In hypoxic cells U2AF-RNA interactions are weaker due to modification of both subunits, resulting in decreased *FAS* and increased *sFAS* mRNA isoform formation. Efficient interaction of both U2AF subunits with RNA is important for the incorporation of the *FAS* exon 6 into mRNA in cells under normal oxygen and hypoxic conditions.

The work shows that the incorporation of exon 6 into mRNA is dependent on changes in the expression of both U2AF subunits, but it has not been established that hypoxic conditions affect their expression. In this work we, for the first time, found that *FAS* alternative splicing depends on the efficiency of U2AF interaction with RNA, and the skipping of exon 6 is particularly dependent on the efficiency of U2AF35 and RNA interaction. Reducing the amount of U2AF35 subunit in a cell, even under normal conditions, results in a similar splicing profile as under hypoxic conditions. Thus, the efficiency of U2AF35 interaction with the 3'-terminal splice target sequence, which is attenuated in the hypoxic microenvironment, is crucial for the incorporation of the *FAS* exon 6 into the mRNA.

Both U2AF subunits belong to the class of SR protein-associated proteins and are substrates for SRPK1 and Clk / Sty kinases in vitro (Rudner et al., 1998; Colwill et al., 1996; Graveley, 2000). Unlike SR proteins, they have a short RS region in the N-terminal protein sequence. Not surprisingly, the level of modification of both U2AF subunits is increased in hypoxic cells, which probably results in decreased efficiency of protein-RNA interactions. Our results also suggest that not only the change in protein expression but also the alterations to splicing factor modification that result in changes in their activity are important for the formation of different mRNA isoforms in the cell.

Our proposed hypoxia-dependent *FAS* alternative splicing model is shown in Fig. 10. Under normal conditions, efficient U2AF-RNA interactions promote the inclusion of exon 6 and thus increase the amount of *FAS* mRNA. In hypoxic cells, the level of modification of both U2AF subunits is altered, resulting in a decrease in the efficiency of their interaction with RNA and a change in the formation profile of mRNA isoforms.

In summary, the hypoxic microenvironment has been shown to alter the profile of *MAPT* mRNA splicing isoforms, but does not affect *APP* gene splicing. We found that changes in the expression of splicing factor SRSF1 effect the formation ratio of *TAU* 4R and 3R isoforms, and changes in the expression of splicing factor SRSF5 have no effect on the inclusion / skipping of *TAU* exon 10. We also found that CLK1-4 kinase expression is increased in brain cell lines under hypoxic conditions.

In this work, we have shown for the first time that changes in pre-mRNA splicing are determined not only by changes in the expression of splicing factors but also by changes in their modifications. We found that the U2AF-RNA interaction is reduced in hypoxic cells. The level of modification of both U2AF subunits is increased under hypoxic conditions, resulting in their attenuated interaction with RNA. Efficient interaction of both U2AF subunits with RNA is important for the incorporation of *FAS* exon 6 into the mRNA under normal oxygen and hypoxic conditions. The contribution of hypoxia and hypoxia-induced molecular pathways to neurodegeneration processes has also been demonstrated for the first time and U2AF may be a key factor in the regulation of hypoxic splicing, but further studies are needed.

CONCLUSIONS

1. Hypoxic microenvironment in brain cells promotes TAU 4R mRNA isoform formation but does not affect APP alternative pre-mRNA splicing.

2. Changes in SRSF1 splicing factor expression in brain cells alter MAPT pre-mRNA alternative splicing under both normal and hypoxic conditions: increased SRSF1 expression promotes and decreased expression inhibits TAU 4R isoform formation. Changes in SRSF5 factor expression do not affect the formation of TAU 3R/4R mRNA isoforms.

3. Changes in U2AF65 expression affect pro-apoptotic FAS mRNA isoform formation in HCT116 cells cultured under normal oxygen and hypoxic conditions.

4. The formation of the anti-apoptotic sFAS mRNA isoform is affected by changes in U2AF35 expression in HCT116 cells under both normal oxygen and hypoxic conditions.

5. Hypoxic microenvironment decreases the efficiency of the interaction of both U2AF subunits with FAS pre-mRNA.

6. Hypoxic conditions in the cell microenvironment alter the level of modification of U2AF65 and U2AF35 subunits.

REFERENCES

Bowler, E., Porazinski, S., Uzor, S., Thibault, Ph., Durand, M., Lapointe, E., Rouschop, K. M. A., Hancock, J., Wilson, I., and Ladomery, M. 2018. 'Hypoxia Leads to Significant Changes in Alternative Splicing and Elevated Expression of CLK Splice Factor Kinases in PC3 Prostate Cancer Cells'. *BMC Cancer* 18 (1): 355. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4227-7.

Chi, J. T., Wang, Z., Nuyten, D. S. A., Rodriguez, E. H., Schaner, M. E., Salim, A., Wang, Y., et al. 2006. 'Gene Expression Programs in Response to Hypoxia: Cell Type Specificity and Prognostic Significance in Human Cancers'. *PLOS Medicine* 3 (3): e47. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030047.

Colwill, K., Feng, L. L., Yeakley, J. M., Gish, G. D., Cáceres, J. F., Pawson, T., and Fu, X. D. 1996. 'SRPK1 and Clk/Sty Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-Rich Splicing Factors*'. *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24 569–75. https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24569.

D'Souza, I., and Schellenberg, G. D. 2006. 'Arginine/Serine-Rich Protein Interaction Domain-Dependent Modulation of a Tau Exon 10 Splicing Enhancer: Altered Interactions and Mechanisms for Functionally Antagonistic Ftdp-17 Mutations Δ 280k and N279k'. *Journal of Biological Chemistry* 281 (5): 2 460–69. https://doi.org/10.1074/jbc.M505809200.

Firoz, C. K., Jabir, N. R., Khan, M. Sh., Mahmoud, M., Shakil, Sh., Damanhouri, G. A., Zaidi, S. K., Tabrez, Sh., and Kamal, M. A. 2015. 'An Overview on the Correlation of Neurological Disorders with Cardiovascular Disease'. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Special issue: Biological Aspects of Global Health Issues, 22 (1): 19–23. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.003.

Graveley, B. R. 2000. 'Sorting out the Complexity of SR Protein

Functions'.
RNA
6
(9):
1
197–1
211.

https://doi.org/10.1017/S1355838200000960.

211.

211.

6

211.

211.

<t

Jakubauskiene, E., Vilys, L., Makino, Y., Poellinger, L., and Kanopka, A. 2015. 'Increased Serine-Arginine (SR) Protein Phosphorylation Changes Pre-MRNA Splicing in Hypoxia'. *Journal of Biological Chemistry* 290 (29): 18 079–89. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639690.

Jeong, S. 2017. 'SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA'. *Moleucles and Cells* 40 (1): 1–9. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2319.

Long, J. C., and Caceres, J. F. 2009. 'The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression'. *Biochemical Journal* 417 (1): 15–27. https://doi.org/10.1042/BJ20081501.

Oh, H. K., Lee, E., Jang, H. N., Lee, J., Moon, H., Sheng, Z., Jun, Y., et al. 2013. 'HnRNP A1 Contacts Exon 5 to Promote Exon 6 Inclusion of Apoptotic Fas Gene'. *Apoptosis* 18 (7): 825–35. https://doi.org/10.1007/s10495-013-0824-8.

Peciuliene, I., Vilys, L., Jakubauskiene, E., Zaliauskiene, L., and Kanopka, A. 2019. 'Hypoxia Alters Splicing of the Cancer Associated Fas Gene'. *Experimental Cell Research* 380 (1): 29–35. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.04.015.

Qian, W., and Liu F. 2014. 'Regulation of Alternative Splicing of Tau Exon 10'. *Neuroscience Bulletin* 30 (2): 367–77. https://doi.org/10.1007/s12264-013-1411-2.

Rudner, D. Z., Breger, K. S., Kanaar, R., Adams, M. D., and Rio, D. C. 1998. 'RNA Binding Activity of Heterodimeric Splicing Factor U2AF: At Least One RS Domain Is Required for High-Affinity Binding'. *Molecular and Cellular Biology* 18 (7): 4 004–11. https://doi.org/10.1128/MCB.18.7.4004.

Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y. M., Li, J., Huang, L. F., Lin, J., et al. 2015. 'Mechanism of Alternative Splicing and Its Regulation (Review)'. *Biomedical Reports* 3 (2): 152–58. https://doi.org/10.3892/br.2014.407.

Zamore, Ph. D., Patton, J. G., and Green, M. R. 1992. 'Cloning and Domain Structure of the Mammalian Splicing Factor U2AF'. *Nature* 355 (6361): 609–14. https://doi.org/10.1038/355609a0.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Vilys, L., Pečiulienė, I., Jakubauskienė, E., Zinkevičiutė, R., Makino, Y., Kanopka, A. U2AF – Hypoxia-induced fas alternative splicing regulator. *Experimental Cell Research*, 2021 Feb 1; 399 (1): 112444. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112444.

2. Jakubauskienė, E., **Vilys, L.**, Pečiulienė, I., Kanopka, A. The role of hypoxia on Alzheimer's disease-related APP and *TAU* mRNA formation. *Gene*. 2021 Jan 15; 766:145146. doi: 10.1016/j.gene.2020.145146.

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. Jakubauskienė, E., **Vilys, L.**, Makino, Y., Poellinger, L., Kanopka, A. 65 kDa protein plays an important role in hypoxia dependent pre-mRNA splicing regulation. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje "Sensing and Signaling of Hypoxia: Interfaces with Biology and Medicine", Brekenridžas, Kolorado valstija, JAV.

2. Vilys, L., Vaidžiulytė, K., Pečiulienė, I., Kanopka, A. The role of U2AF in hypoxia-dependant pre-mRNA splicing regulation. Stendinis pranešimas 13-toje tarptautinėje Lietuvos biochemikų draugijos konferencijoje, 2014, Birštonas, Lietuva.

3. Jakubauskienė, E., **Vilys, L.**, Makino, Y., Poellinger, L., Kanopka, A. HIF-1 is Indirectly Involved in Hypoxia Dependent Splicing Regulation. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje "Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics", 2015, Dublinas, Airija.

4. Vilys, L., Pečiulienė, I., Jakubauskienė, E., Kanopka, A. Hypoxia induces changes in alternative pre-mRNA splicing that may lead to tumour cell survival. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje "RNA Society 22'nd Annual Meeting", 2017, Praha, Čekija.

5. Vilys, L., Pečiulienė, I., Jakubauskienė, E., Kanopka, A. Hypoxia induces changes in alternative pre-mRNA splicing that may lead to tumour cell survival. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje "Vita Scientia'18", 2018, Vilnius, Lietuva.

CURRICULUM VITAE

Laurynas Vilys

Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras Biotechnologijos institutas Jaunesnysis mokslo darbuotojas

El. paštas: laurynas.vilys@bti.vu.lt

Išsilavinimas:

2007–2011 molekulinės biologijos bakalauro studijos Vilniaus universitete.

2011–2013 molekulinės biologijos magistrantūros studijos Vilniaus universitete.

Nuo 2013 biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Darbinė veikla:

Nuo 2009 biologas tyrėjas, Biotechnologijos institutas, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius, Vilnius.

Nuo 2016 jaunesnysis mokslo darbuotojas, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius, Vilnius.

Stažuotės:

2013-10 Mokslinė stažuotė. Švedija, Karolinska institutas, Molekulinės ir ląstelės biologijos laboratorija (CMB);

2014-01 Mokslinė stažuotė. Švedija, Karolinska institutas, Molekulinės ir ląstelės biologijos laboratorija (CMB);

2016-04 – 2016-06 Stažuotė-"Erasmus" praktika. Švedija, Karolinska institutas, Molekulinės ir ląstelės biologijos laboratorija (CMB)

Moksliniai interesai: hipoksijos poveikis ląstelėms, pre-iRNR splaisingas, deguonies koncentracijos aplinkoje reguliuojamas pre-iRNR splaisingas, pre-iRNR splaisingo faktoriai.

Publikacijos:

Jakubauskienė, E., Vilys, L., Makino, Y., Poellinger, L., Kanopka, A. Increased serine-arginine (SR) protein phosphorylation changes pre-mRNA splicing in hypoxia. *J Biol Chem* (2015) 290 (29): 18 079-18 089. DOI: 10.1074/jbc.M115.639690

Jakubauskienė, E., Pečiulienė, I., Vilys, L., Mocevičius, P., Vilkaitis, G., Kanopka, A. Gastrointestinal tract tumors and cell lines possess differential splicing factor expression and tumor associated mRNA isoform formation profiles. *Cancer Biomarkers (2015) 15 (5): 575–581. DOI: 10.3233/CBM-150497*

Butkytė, S., Čiupas, L., Jakubauskienė, E., Vilys, L., Mocevičius, P., Kanopka, A., Vilkaitis, G. Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells. *Clin Epigenetics.* 2016 Mar 25; 8:33. DOI: 10.1186/s13148-016-0200-y

Pečiulienė, I., **Vilys, L.**, Jakubauskienė, E., Zaliauskienė, L., Kanopka, A. Hypoxia alters splicing of the cancer associated Fas gene. *Experimental Cell Research*, 2019, 380, 29–35. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.04.015

Jakubauskienė, E., **Vilys, L.**, Pečiulienė, I., Kanopka, A. The role of hypoxia on Alzheimer's disease-related APP and *TAU* mRNA formation. *Gene*. 2021 Jan 15; 766:145146. doi: 10.1016/j.gene.2020.145146.

Vilys, L., Pečiulienė, I., Jakubauskienė, E., Zinkevičiutė, R., Makino, Y., Kanopka, A. U2AF – Hypoxia-induced fas alternative splicing regulator. *Experimental Cell Research*, 2021 Feb 1; 399 (1): 112444. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112444.

Darbas su studentais:

Konsultantas rengiant bakalauro darbą, biotechnologijos laboratorinių darbų vedimas, vadovavimas bakalauro darbui.

Programų vykdytojas:

2009–2014 ES 7-osios bendrosios programos projektas "Hipoksinės mikroaplinkos įtaka metastatinių vėžinių auglių vystymuisi" ("Metastatic tumours facilitated by hypoxic tumour micro-environments") vykdytojas. Projekto vadovas: dr. A. Kanopka.

2012–2014 Nacionalinės mokslo programos "Lėtinės neinfekcinės ligos" projekto "Splaisingo faktoriai ir jų reguliuojamos miRNR kaip virškinimo sistemos vėžinių susirgimų biožymenys" vykdytojas. Projekto vadovas: dr. A. Kanopka. 2020–2021 Lietuvos mokslo tarybos finansuojamos programos "Sveikas senėjimas" projekto "Hipoksijos, kaip ląstelių streso poveikis iRNR įvairovei ir senėjimui" ("Hypoxia as cell stress in mRNA diversity and aging"). Projekto vadovas: dr. A. Kanopka.

PADĖKA

Dėkoju vadovui Arvydui už skirtą laiką, pasitikėjimą, palaikymą bei gyvenimo pamokas. Taip pat dėkoju kolegėms Eglei ir Ingai už visokeriopą pagalbą ir už bendravimą pastaruosiu 11 metų, tiek, kad net "žinom jau net ir vienas kitų batų dydžius".

Labai dėkoju už paramą ir palaikymą žmonai, tėvams, sesei, seneliams, dėdėms, tetoms ir visiems kitiems šeimos nariams ir draugams. Ačiū, kad nepasidavėte ir neleidote man pasiduoti.

Ir galiausiai dėkoju esamiems ir buviems studentams – Kotrynai, Airinai, Gintarei, Rasai, Aistei, Justui ir Karinai už tai, kad turėjau garbės jus kažko išmokyti ir daug ko išmokti iš jūsų.

L.

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius El. p. info@leidykla.vu.lt, <u>www.leidykla.vu.lt</u> <u>bookshop.vu.lt</u>, <u>journals.vu.lt</u> Tiražas 20 egz.