

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.382>  
<https://orcid.org/0000-0002-6826-6118>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė Žalytė

# Atsparumo ferroptozei molekuliniai mechanizmai kasos vėžio ląstelėse

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (projektai SEN/01-2016 ir S-SEN-20-16; gauta Lietuvos mokslo tarybos stipendija už akademinis pasiekimus); Vilniaus universitetas (gauta vienkartinė tikslinė stipendija) ir Gyvybės mokslų centras (gauta GMC vardinė stipendija).

**Mokslinis vadovas** – dr. Jonas Cicėnas (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

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

Gynimo taryba:

**Pirmininkė** – dr. Daiva Baltriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

**Nariai:**

dr. Eiva Bernotienė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biologija – N 010),

dr. Daiva Bironaitė (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

dr. Lina Prasmickaitė (Oslo universiteto ligoninė, Norvegija, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

prof. dr. Saulius Šatkauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. rugsėjo mėn. 30 d. 11.30 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-102 auditorijoje ir nuotoliniu būdu. Adresas: Saulėtekio alėja 7, LT-10257, R-102 auditorija, Vilnius, Lietuva, tel. +37052234416; el. paštas info@gmc.vu.lt

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.382>  
<https://orcid.org/0000-0002-6826-6118>

VILNIUS UNIVERSITY

Eglė Žalytė

# Molecular mechanisms of ferroptosis resistance in pancreatic cancer cells

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural sciences,  
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2017 and 2021 at Vilnius University Life Sciences Center Institute of Biochemistry. The research was supported by Research Council of Lithuania (grants SEN/01-2016 and S-SEN-20-16, granted a scholarship for academic achievements); Vilnius University (granted a one-time targeted scholarship) and Life Sciences Center (granted LSC nominal scholarship).

**Academic supervisor** – Dr. Jonas Cicėnas (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

**Academic consultant** – Dr. Mindaugas Valius (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

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

**Chairman** – Dr. Daiva Baltriukienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

**Members:**

Dr. Eiva Bernotienė (State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Daiva Bironaitė (State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Lina Prasmickaitė (Oslo University Hospital, Norway, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Prof. Dr. Saulius Šatkauskas (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biophysics – N 011).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11.30 AM on 30th September 2022 in Room R-102 of Vilnius University Life Sciences Centre and online.

Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania

Tel. +37052234416; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: [www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	8
ĮVADAS .....	10
MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ .....	12
GINAMIEJI TEIGINIAI .....	14
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	15
1.1. Ferroptozė, jos mechanizmai ir priešvėžinis potencialas .....	15
1.1.1. Ferroptozės atradimas .....	15
1.1.2. Ferroptozės molekulinis mechanizmas .....	18
1.1.2.1. Polinesočiųjų riebalų rūgščių turinčių fosfolipidų oksidacija .....	20
1.1.2.2. Oksidacijos-redukcijos reakcijose dalyvaujanti geležis .....	21
1.1.2.3. Išveiklinta lipidinių peroksidų neutralizavimo sistema .....	23
1.1.3. Ferroptozės prigimtis .....	25
1.1.4. Ferroptozės priešvėžinio poveikio potencialas .....	27
1.1.4.1. Vaistams atsparios ląstelės .....	27
1.1.4.2. Vėžio kamieninės ir dediferencijuotos ląstelės .....	30
1.1.4.3. Kontaktus praradusios ir mezenchiminio tipo ląstelės .....	31
1.1.5. Ferroptozės detekcija: žymenys ir metodai .....	33
1.2. Maisto medžiagų trūkumo sukeltas vėžinių ląstelių metabolinis perprogramavimas .....	36
1.2.1. Metabolinis perprogramavimas ir ferroptozė .....	37
1.2.2. Maisto medžiagų trūkumo sukėlimu pagrįsta priešvėžinė terapija (angl. <i>starvation-based anticancer therapy</i> ) .....	39
1.2.2.1. Naviko kraujagyslių tinklą slopinančios/ardančios terapijos .....	40
1.2.2.2. Metabolitų skaidymas arba pernašos į ląstelę slopinimas .....	41
1.2.2.3. Pseudobadavimas .....	42
1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas .....	42
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	44
2.1. Medžiagos .....	44

2.1.1. Citotoksiniai preparatai ir slopikliai .....	44
2.1.2. Rekombinantiniai baltymai .....	44
2.1.3. Ląstelių linijos .....	45
2.1.4. Tirpalai ir kitos medžiagos <i>Western Blot</i> analizei .....	45
2.1.5. Darbo su bakterijomis reagentai .....	46
2.2. Metodai .....	46
2.2.1. Ląstelių kultivavimas .....	46
2.2.2. Ląstelių gyvybingumo testai .....	47
2.2.2.1. MTT metodas .....	47
2.2.2.2. Ląstelių dažymas propidžio jodidu .....	47
2.2.3. Oksiduotų lipidų nustatymas tėkmės citometrijos metodu .....	47
2.2.4. Redukuoto glutationo (GSH) kiekio nustatymas .....	48
2.2.5. Genų raiškos RNR lygmeniu tyrimas .....	49
2.2.6. <i>Western Blot</i> analizė .....	50
2.2.7. Fluorescencinė/konfokalinė mikroskopija .....	51
2.2.8. „Žaizdos gijimo“ testas .....	53
2.2.9. Capan-26 linijos išvedimas ir charakterizavimas .....	53
2.2.9.1. Linijos išvedimas .....	53
2.2.9.2. Ląstelių augimo greičio nustatymas .....	54
2.2.9.3. Minkštojo agaro metodas .....	54
2.2.9.4. Mutacijų analizė .....	54
2.2.9.5. Kariotipavimas .....	55
2.2.10. Rezultatų statistinė analizė .....	56
2.2.11. Disertacijos eksperimentų planas .....	56
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	57
3.1. Badavimo įtakos ląstelių jautrumui feroptozei įvertinimas .....	57
3.2. Akt kinazės reikšmė ląstelių jautrumui feroptozei .....	62
3.3. ERK1/2 kinazės reikšmė ląstelių jautrumui feroptozei .....	63
3.4. JNK kinazės reikšmė ląstelių jautrumui feroptozei .....	67

3.5. Augimo veiksmų trūkumo įtakos ląstelių mezenchiminiam fenotipui įvertinimas .....	69
3.6. Capan-26 ląstelių linijos išvedimas ir charakterizavimas.....	72
3.6.1. Linijos išvedimo procesas ir augimo charakteristikos.....	72
3.6.2. Vėžio žymenų detekcija ir kamieniškumas .....	74
3.6.3. Mutacijų paieška ir kariotipavimas.....	75
3.6.4. Jautrumo chemoterapiniams preparatams įvertinimas.....	77
3.7. Ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčių įtakos jautrumui ferroptozei įvertinimas .....	77
3.8. Epitelio-mezenchimos virsmą reguliuojančių junginių poveikis kasos vėžio ląstelių atsparumui ferroptozei .....	81
DISKUSIJA .....	85
IŠVADOS.....	91
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	92
PRIEDAI .....	115
SUMMARY .....	117
DEDIKACIJA .....	149
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA .....	150
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE DISERTACIJOS TEMA.....	150
KITOS PUBLIKACIJOS IR KONFERENCIJOS .....	151
CURRICULUM VITAE .....	153
UŽRAŠAMS.....	155

## SANTRUMPOS

- FBS – ąštelės, augančios terpėje, neturinčioje fetalinio veršelio serumo
- 5-FU – 5-fluoruracilas
- AA – ąštelės, augančios terpėje, neturinčioje L-glutamino, L-lizino ir L-arginino
- Afa – EGFR (epidermio augimo veiksnio receptoriaus) slopiklis afatinibas
- BG – FGFR (fibroblastų augimo veiksnio receptoriaus) slopiklis BGJ398
- CisPt – cisplatina
- DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolas
- DMSO – dimetilsulfoksidas
- Edu – 5-etinil-2'-deoksiuridinas
- EGF – epidermio augimo veiksnys
- EMT – epitelio-mezenchimos virsmas
- Era – erastinas
- ERK1/2 – ekstrąštelinio signalo reguliuojama kinazė 1/2 (angl. *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*)
- FBS – fetalinis veršelio serumas
- Ferr-1 – ferostatinas-1
- FGF – fibroblastų augimo veiksnys
- Gm – gemcitabinas
- GPX4 – glutationo peroksidazė 4
- GSH – redukuotas glutationas
- INK – mTORC1 ir mTORC2 slopiklis INK128
- JNK – c-Jun N-galo kinazė (angl. *c-Jun N-terminal Kinase*)
- kDNR – kopi DNR, komplementari DNR, susintetinta nuo iRNR matricos
- MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazolio bromidas
- Nec-1 – nekrostatinas-1
- OxaPt – oksaliplatina
- PBS – fosfatinis buferinis tirpalas
- PF – FAK kinazės slopiklis PF573228
- PI – propidžio jodidas
- PUFA – polinesočiosios riebalų rūgštys (angl. *PolyUnsaturated Fatty Acids*)
- PUFA-PL – polinesočiujų riebalų rūgščių turintys fosfolipidai (angl. *PhosphoLipids*)
- Rap – mTORC1 slopiklis rapamicinas
- ROS – aktyviosios deguonies formos
- Sar – Src kinazės slopiklis saracatinibas
- SBI – ULK-1 slopiklis SBI-0206965



SCH – ERK1/2 kinazės slopiklis SCH772984  
SN – standartinis nuokrypis  
SP – JNK kinazės slopiklis SP600125  
TDG – GSK-3 slopiklis tideglusibas  
TDU – YAP1 antagonistas super-TDU  
TPCA – IKK kinazės slopiklis TPCA-1  
XAV – tankirazių slopiklis XAV939  
XMU – MST 1/2 slopiklis XMU-MP-1  
ZVAD – pan-kaspazių slopiklis Z-VAD-FMK

## ĮVADAS

Kasos vėžys yra septintoje vietoje tarp dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų pasaulyje, tačiau pagal mirtingumą jis yra ketvirtas (Sung *et al.*, 2021). To priežastis – pernelyg vėlyva diagnozė ir naviko atsparumas chemoterapijai. Ankstyvosiose stadijose kasos vėžys paprastai neturi simptomų, o jo aptikimą riboja patikimų diagnostinių žymenų trūkumas. Pažengęs kasos navikas (30–40% atvejų) gali būti šalinamas chirurginiu būdu, po operacijos paprastai skiriama chemoterapija arba spindulinė terapija. Deja, dažniausiai po kurio laiko vėžys atsinaujina (Spadi *et al.*, 2016). Metastazavęs kasos vėžys turi blogiausią prognozę, kadangi navikas chirurginiu būdu nebepašalinamas ir dažnai yra atsparus tradiciniams kasos vėžiui gydyti naudojamiems vaistams, pavyzdžiui, gemcitabinui (Amrutkar ir Gladhaug, 2017). Nors pastaraisiais metais buvo pasiūlyta keletas naujų kombinacinių terapijų (gemcitabinas ir nabpaklitakselis, gemcitabinas ir FOLFIRINOX) (Petrillo *et al.*, 2019, Sarabi *et al.*, 2017), mirtingumas nuo metastazavusio kasos vėžio išlieka didelis. Prognozuojama, kad Europoje 2025 m. kasos vėžys netgi gali pasiekti lyderiaujančių vėžinių susirgimų trejetuką (Ferlay *et al.*, 2016).

2012 m. buvo atrasta nauja ląstelės žūties forma – ferroptozė (Dixon *et al.*, 2012). Ferroptozės metu ląstelės žūsta nuo staigios ir stiprios membranos lipidų oksidacijos. Vykstant geležies katalizuojamoms Fentono reakcijoms arba veikiant geležį kaip kofaktorių naudojančioms lipoksigenazėms lipidų peroksidai ir peroksiradikalai ląstelėje susidaro nuolatos, tačiau yra veiksmingai neutralizuojami veikiant antioksidaciniam fermentui glutationo peroksidazei 4 (GPX4). Dauguma ferroptozės induktorių slopina GPX4 aktyvumą arba mažina baltymo kiekį, taip paskatindami žalingų lipidų peroksidų kaupimąsi, membranos oksidaciją ir ląstelės žūtį (Stockwell ir Jiang, 2020). Nuo pat atradimo ferroptozė sulaukė nemažai dėmesio, ji yra tiriami širdies, neurodegeneracinių ligų ir vėžio kontekste (Han *et al.*, 2020). Svarbu tai, kad šis žūties tipas gali būti specifiskai nutaikomas į vėžines ląsteles, kadangi jų citozolyje geležies koncentracija yra gerokai didesnė nei analogiško sveiko audinio ląstelėse (G. Chen *et al.*, 2020). Be to, nustatyta, kad terapijai atsparios ir metastazuoti linkusių navikų ląstelės lengvai žūsta po ferroptozės induktorių poveikio (Gagliardi *et al.*, 2020, Li *et al.*, 2020).

Daugelio tipų vėžiui, įskaitant ir kasos, yra būdingas metabolinis perprogramavimas – atsiradusi priklausomybė nuo tam tikrų maisto medžiagų (Son *et al.*, 2013). Šią priklausomybę, kaip ir sparčios proliferacijos lemiamą padidėjusį maisto medžiagų poreikį, išnaudoja badavimu pagrįsta priešvėžinė

terapija (angl. *starvation-based cancer therapy*). „Bado“ sąlygos naviko aplinkoje gali būti sukuriamos įvairiai: naviką veikiant angiogenezę slopinančiais junginiais, suardant naviko kraujagyslių tinklą, tiesiogiai skaidant naviko mikroaplinkoje cirkuliuojančias maisto medžiagas (Yu *et al.*, 2019). *In vitro* sistemose dažnai taikomas pseudobadavimo modelis, kuomet standartinėmis sąlygomis augančios ląstelės yra veikiamos junginiais, imituojančiais jose badavimo pojūtį, pavyzdžiui, mTOR signalinio kelio slopikliais (Coppock *et al.*, 2016).

Šiandien dar nėra atlikta daug tyrimų, kurie parodytų, kaip badavimas veikia vėžinių ląstelių atsparumą feroptozei. Atsižvelgiant į tai, disertacijoje buvo ieškota šių dviejų strategijų – feroptozės ir vėžinių ląstelių badavimo sukėlimo – sinergijos priešvėžinio potencialo ir tirti jį valdantys veiksniai. Dalis disertacijos darbų buvo orientuoti į klinikai artimesnio vėžio modelio – naujos, pirminį naviką atspindinčios kasos vėžio ląstelių linijos – sukūrimą. Šioje ląstelių linijoje taip pat siekta patikrinti pastoviose (kataloginėse) ląstelių kultūrose pastebėtus atsparumo feroptozei dėsningumus.

Šio **darbo tikslas** – nustatyti atsparumo feroptozei mechanizmus kasos vėžio ląstelėse.

Tikslui pasiekti buvo iškelti tokie **uždaviniai**:

- Išvesti ir *in vitro* charakterizuoti naują kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių liniją;
- Nustatyti (pseudo)badavimo (augimo veiksnių, aminorūgščių L-glutamino, L-lizino ir L-arginino trūkumo ir mTOR slopiklių poveikio) įtaką feroptozės induktoriaus erastino poveikiui kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse;
- Įvertinti ERK1/2 ir JNK kinazių reikšmę jautrumui erastinui bado sąlygomis augančiose kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelėse;
- Nustatyti badavimo poveikį pastovių (kataloginių) kasos duktalinės adenokarcinomos linijų ir unikalios linijos ląstelių mezenchiminiam fenotipui;
- Įvertinti epitelio-mezenchimos virsmą moduluojančių junginių ir erastino kombinacijų priešvėžinį potencialą.

## MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Šiame buvo tiriama, kaip badavimu pagrįstą priešvėžinę terapiją galima panaudoti ferroptozės sustiprinimui. Lyginant su klasikinėmis ląstelių žūties formomis, ferroptozė atrasta neseniai, tad šiandien dar nėra daug žinoma apie veiksnius, lemiančius jautrumą šiam žūties tipui. Disertacijoje pirmą kartą parodyta, kad jautrumą ferroptozei gali nulemti augimo veiksnių, mTORC1 baltymų komplekso aktyvacijai reikalingų aminorūgščių L-glutamino, L-lizino ir L-arginino trūkumas ir mTORC1 slopiklio rapamicino poveikis. Disertacijoje gauti rezultatai atskleidė, kad skirtingų kasos vėžio ląstelių linijų atsakas į minėtus poveikius yra nevienodas: Miapaca2 ląstelių jautrumas sumažėja, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių jautrumas padidinamas. Pirmą kartą parodyta, kad badaujančiose ląstelėse jautrumą ferroptozei valdo ERK1/2 ir JNK kinazės. Taip pat pirmą kartą po trumpalaikio rapamicino poveikio pademonstruota ERK1/2 pernaša į kasos vėžio ląstelių branduolį – anksčiau panašius tyrimus atlikę autoriai tyrė tik ilgalaikį rapamicino poveikį, po kurio neaptiko ERK1/2 lokalizacijos pokyčių (Soares *et al.*, 2013). Be to, disertacijos darbuose atsiskleidė dvilypė JNK kinazės prigimtis standartinėmis ir bado sąlygomis: standartinėje terpėje augančiose Panc-1 ląstelėse JNK slopinimas sustiprino ferroptozę, o bado sąlygomis JNK slopinimas apsaugojo ląsteles nuo erastino citotoksiškumo. Nors prooksidacinis JNK veikimas buvo anksčiau pastebėtas ir kitų autorių, jie tyrė ne vėžines, o sveiko audinio ląsteles ir jose vykstančią apoptozę (Hanawa *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009, Win *et al.*, 2015), o ferroptozės kontekste atlikti JNK tyrimai niekada nebuvo susieti su ląstelių badavimu ar metabolismu perprogramavimu (Li ir Leung, 2020, Y. Yang *et al.*, 2021).

Taip pat svarbu paminėti, kad disertacijos metu išvesta ir *in vitro* charakterizuota nauja unikali kasos vėžio ląstelių linija Capan-26, geriau nei pastovios (kataloginės) ląstelių linijos reprezentuojanti pirminį kasos naviką. Tai pirmoji kasos vėžio ląstelių linija, išvesta iš lietuvių kilmės pacientės naviko pooperacinės medžiagos. Ir Capan-26, ir pastovios (kataloginės) Miapaca2 linijos ląstelėms augant be augimo veiksnių stebėti jų mezenchiminio fenotipo pokyčiai bei mezenchiminės ir epitelinės būsenų kaita. Pirmą kartą parodyta, kad augimo veiksnių trūkumo sukeltas kasos vėžio ląstelių mezenchiminio fenotipo raiškos padidėjimas koreliuoja su padidėjusiu jų jautrumu erastinui. Atsižvelgiant į tai, įvertintas ferroptozės induktorių ir epitelio-mezenchimos virsmą (EMT) moduluojančių vaistų kombinacijų poveikis vėžinėms ląstelėms ir atrasti nauji ląstelių žūtį sustiprinantys priešvėžinių junginių deriniai. Apibendrinant, šioje

disertacijoje aprašomi nauji molekuliniai atsparumo ferroptozei mechanizmai pastoviose (kataloginėse) ir unikaliose kasos vėžio ląstelių linijose bei atskleidžiamos terapinės kinazių slopiklių ir ferroptozės induktorių kombinacijų perspektyvos. O naujai išvestos Capan-26 ląstelių linijos praktinė vertė ateityje galės atsiskleisti ir kitų mokslininkų darbuose.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Iš naviko pooperacinės medžiagos išvesta kasos vėžio ląstelių linija Capan-26 pasižymi vėžinių ir kamieninių ląstelių savybėmis;
2. (Pseudo)badavimas (augimo veiksnių, aminorūgščių L-glutamino, L-lizino ir L-arginino trūkumas ir mTOR slopiklių poveikis) nevienodai veikia skirtingų kasos vėžio ląstelių linijų jautrumą ferroptozės induktoriui erastinui;
3. (Pseudo)bado sąlygomis ERK1/2 ir JNK kinazės valdo kasos vėžio ląstelių jautrumą ferroptozei;
4. Augimo veiksnių trūkumas keičia Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių mezenchiminį fenotipą; epitelinė būseną pasižymi atsparumu erastinui, o mezenchiminė – jautrumu;
5. Epitelio-mezenchimos virsmą moduliuojantys chemoterapiniai preparatai gali būti panaudoti erastino citotoksiškumui sustiprinti.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Ferroptozė, jos mechanizmai ir priešvėžinis potencialas

### 1.1.1. Ferroptozės atradimas

Ląstelių žūtis yra natūralus visuose organizmuose vykstantis procesas. Ankstyvieji bandymai klasifikuoti šį reiškinį buvo paremti tik jo morfologinėmis charakteristikomis, todėl buvo išskiriami trys ląstelių žūties tipai: 1) apoptozė, kurios metu ląstelė suapvalėja, susitraukia, įtraukia pseudopodijas, stebima chromatinio kondensacija, branduolio fragmentacija ir apoptozinių kūnelių susidarymas; 2) autofagija, kuriai vykstant citoplazmoje intensyviai formuojasi autofaginės pūslelės; 3) nekrozė, kuriai būdingas ląstelės ir jos organelių tūrio padidėjimas, plazminės membranos integralumo praradimas ir ląstelės „subyrėjimas“ (Galluzzi *et al.*, 2007). Nors morfologinė klasifikacija išlieka populiari, dabar Ląstelių žūties nomenklatūros komitetas siūlo žūtį bendruoju atveju skirstyti kitaip: į atsitiktinę ir reguliuojamą. Atsitiktinė ląstelių žūtis yra nekontroliuojama ir neišvengiama. Ją sukelia stiprus ląstelės patirtas stresas: ekstremalus pH, slėgis, temperatūros ar osmosinės jėgos variacijos, taip pat mechaninis poveikis. Priešingai, kaip sako pavadinimas, reguliuojama ląstelių žūtis yra valdoma ląstelėje užkoduotų molekulinį mechanizmų, todėl ją galima nuslopinti arba paskatinti farmakologinėmis ir genetinėmis intervencijomis (Galluzzi *et al.*, 2018). Kai tokia žūtis ląstelę ištinka dėl natūralių fiziologinių priežasčių (vystantis embrionui, palaikant audinių homeostazę, imuninio atsako metu), ji dar vadinama programuota. Tačiau reguliuojamu būdu ląstelė gali žūti ir tuomet, kai nebesusidoroja su mikroaplinkos siunčiamomis pažaidomis (Galluzzi *et al.*, 2015). Reguliuojamą ląstelės žūtį lydintys biocheminiai procesai ir morfologiniai požymiai padeda ją skirstyti į smulkesnius potipius, kurių šiandien oficialiai išskiriama dvylika: tai išorinė ir vidinė apoptozė, imunogeniška ląstelės žūtis, nuo autofagijos priklausoma žūtis, nuo lizosomų priklausoma žūtis, netozė, entozė, partanatos, nekroptozė, mitochondrijų pralaidumo valdoma nekrozė, piroptozė ir ferroptozė (Galluzzi *et al.*, 2018). Kai kurie autoriai ląstelių žūtį skirsto dar smulkiau, pavyzdžiui, su autofagijos mechanizmu yra siejama metuoze (Maltese ir Overmeyer, 2014) ir paraptozė (Fontana *et al.*, 2020), tačiau šios ląstelės žūties formos šiandien dar yra mažai ištirtos.

2003 m. ieškodami naujų priešvėžinių vaistų S. Dolma su kolegomis kombinatorinėje bibliotekoje identifikavo junginį, selektyviai letalų

onkogeninį RAS ir Mažą T onkobaltymą (angl. *Small T oncoprotein*, ST) ekspresuojančioms vėžinėms ląstelėms. Junginys buvo pavadintas erastinu (angl. *erastin - eradicator of RAS and ST*) (Dolma *et al.*, 2003). Įdomu pasirodė tai, kad erastino sukeltai vėžinių ląstelių žūčiai nebuvo būdingi morfologiniai ar biocheminiai apoptozės požymiai – DNR fragmentacija ar kaspazių aktyvacija, poveikio jai neturėjo ir apoptozės slopikliai. Ferroptozė nebuvo panaši ir į kitus klasikinius žūties tipus (1.1 lentelė). Netrukus nustatyta, kad netipinę erastino sukeltą ląstelių žūtį slopina geležį surišantys junginiai, taip pat atrastas analogiškas erastinui junginys RSL3 (angl. *RAS Selective Lethal 3*) (Yang ir Stockwell, 2008). Be to, pastebėta, kad erastinas ir RSL3 skatina ROS kaupimąsi ląstelėje (Yagoda *et al.*, 2007). 2012 m. Dixon ir kolegos šią naują ląstelės žūties formą pavadino ferroptoze (*ferro* nuo *ferrum* – lot. „geležis“, *ptōsis* – graik. „kritimas“) (Dixon *et al.*, 2012).

**1.1 lentelė.** Ferroptozės ir kitų ląstelės žūties tipų palyginimas (Y. Xie *et al.*, 2016).

<b>Žūties tipas</b>	<b>Morfologiniai bruožai</b>	<b>Biocheminiai bruožai</b>	<b>Imunologiniai bruožai</b>	<b>Pagrindiniai regulatoriai</b>
Ferroptozė	Ląstelė suapvalėja, sumažėja mitochondrijos, sumažėja arba išnyksta mitochondrijų kristos. Prarandamas plazminės membranos integralumas. Branduolys nepakinta, chromatino kondensacija nestebima.	Geležies ir ROS kaupimasis ląstelėje, sistemos $x_c^-$ slopinimas, GSH kiekio mažėjimas ląstelėje. Padidėjusi NADPH oksidacija. Toksiškų arachidono rūgšties darinių susidarymas.	Prouždegiminė žūtis, ląstelei žūstant išskiriamos DAMP (angl. <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> ) molekulės, pavyzdžiui, HMGB1.	Teigiami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• VDAC2/3;</li> <li>• Ras;</li> <li>• NOX;</li> <li>• TFR1;</li> <li>• p53;</li> <li>• CARS.</li> </ul> Neigiami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• GPX4;</li> <li>• SLC7A11;</li> <li>• HSPB1;</li> <li>• NRF2.</li> </ul>
Apoptozė	Ląstelė suapvalėja, susitraukia, įtraukia pseudopodijas. Sumažėja branduolio	Kaspazių aktyvacija, DNR fragmentacija, mitochondrijų membraninio potencialo	Dažniausiai antiuždegiminė arba imuninio atsako nesukelianti žūtis. Kai kuriais atvejais	Teigiami: <ul style="list-style-type: none"> <li>• p53;</li> <li>• Bax;</li> <li>• Bak;</li> <li>• Kiti proapoptotiniai</li> </ul>



	tūris, stebima branduolio fragmentacija ir chromatinio kondensacija.	išnykimas, fosfatidilserino atsiradimas išoriniame plazminės membranos sluoksnyje.	prouždegiminė, ląstelei žūstant išskiriamos DAMP molekulės (hisonai, DNR, HMGB1).	Bcl-2 šeimos baltymai.  Neigiami: • Bcl-2; • Bcl-XL; • Kiti antiapoptotiniai Bcl-2 šeimos baltymai
Nekroptozė	Prarandamas plazminės membranos integralumas. Stebimas citoplazmos ir organelių išbrinkimas. Nežymi chromatinio kondensacija.	ATP kiekio sumažėjimas, RIP1, RIP3 ir MLKL aktyvacija, PARP1 aktyvacija.	Dažniausiai prouždegiminė žūtis (išskiriama HMGB1), kai kuriais atvejais antiuždegiminė.	Teigiami: • RIP1; • RIP3; • MLKL.
Autofagija	Plazminės membranos pokyčiai nestebimi. Citoplazmoje kaupiasi autofaginės pūslelės. Chromatinio kondensacija nestebima.	LC3-I verčiamas į LC3-II, substratų (pavyzdžiui, p62) skaidymas.	Dažniausiai antiuždegiminė dėl inflammosomos aktyvacijos slopinimo. Kai kuriais atvejais prouždegiminė dėl citokinų išsiskyrimo.	Teigiami: • ATG5; • ATG7; • Beklinas 1; • Kiti ATG šeimos baltymai.

Reikia paminėti, kad ferroptozės analogijų mokslininkai buvo pastebėję ir seniau. Dar praėjusio amžiaus pabaigoje, ieškant naujų neorologinių ligų gydymo būdų, intensyviai domėtasi glutamato toksiškumu nervinėms ląstelėms. Mokslininkai išsiaiškino, kad glutamatas slopina cistino patekimą į ląsteles blokuodamas cistino/glutamato antiporterį. Tokiu būdu neuronuose mažėja GSH kiekis ir sukiamas oksidacinis stresas (Murphy *et al.*, 1989). Ši ląstelės žūtis buvo pavadinta oksitoze (Tan *et al.*, 2001). Dėl mechanistinio panašumo į ferroptozę kai kurios mokslininkų grupės siūlo šių žūties formų

nediferencijuoti ir vartoti jungtinį terminą oksitozė/feroptozė (Maher *et al.*, 2020), visgi, vėžio kontekste oksitozės terminas kol kas neprigijo. Be to, tarp feroptozės ir oksitozės yra skirtumų, pavyzdžiui, oksitozė yra stipriai priklausoma nuo kalcio pernašos į ląstelę, o feroptozė – nuo geležies metabolizmo (Dixon *et al.*, 2012, Henke *et al.*, 2013).

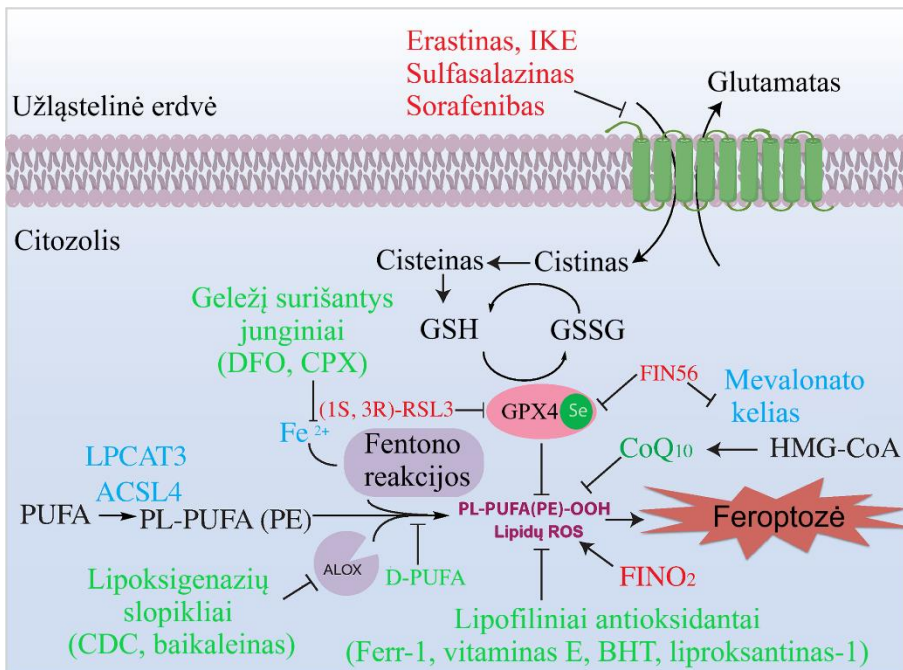
### 1.1.2. Feroptozės molekulinis mechanizmas

Feroptozė – reguliuojama ląstelių žūtis, kurią sukelia intensyvi ląstelės membranos lipidų oksidacija (1.1 pav.). Nuo membranos oksidacinių pažeidimų ląstelę apsaugo glutationo peroksidazė 4 (GPX4). Jeigu šis fermentas tampa neveiklus, prasideda feroptozė (Dixon ir Stockwell, 2019). Priežastys, dėl kurių yra slopinamas GPX4 veikimas, gali būti kelios: sutrikusi kofaktoriaus GSH sintezė, fermento aktyvumo sumažėjimas arba fermento kiekio sumažėjimas ląstelėje. Tuo iš dalies paremta feroptozės induktorių klasifikacija. Iš viso yra išskiriamos keturios feroptozės induktorių klasės. Pirmos klasės feroptozės induktoriai slopina transmembraninį cistino-glutamato antiporterį  $x_c^-$ , kuris į ląstelę įneša vieną cistino (oksiduota cisteino forma) molekulę, kartu iš ląstelės išnešdamas vieną glutamato molekulę. Kai cistino-glutamato antiporterinė sistema slopinama, ląstelėje pradeda trūkti cisteino ir stabdoma GSH sintezė. GSH – tripeptidas, kurį sudaro glutamatas, cisteinas ir glicinas, cisteino įjungimas į molekulę yra GSH sintezės greitį ribojanti stadija. Kadangi GSH yra GPX4 kofaktorius, kartu slopinamas ir šio fermento veikimas, o ląstelė nebeapsaugoma nuo plazminės membranos pažeidimų (Feng ir Stockwell, 2018). Svarbiausi pirmai feroptozės induktorių klasei priklausantys junginiai yra erastinas ir jo analogai imidazolketonerastinas (Larraufie *et al.*, 2015), piperazinerastinas (Yang *et al.*, 2014), taip pat FDA (angl. *Food and Drug Administration*, JAV) patvirtinti vaistai sulfasalazinas (Gout *et al.*, 2001) ir sorafenibas (Louandre *et al.*, 2013). Antros klasės feroptozės induktoriai slopina GPX4 fermentinį aktyvumą. Vienas populiariausių šio tipo junginių yra RSL3, kovalentiškai prisijungiantis prie selenocisteino, esančio GPX4 aktyviajame centre (Yang *et al.*, 2014). Trečios klasės feroptozės induktoriai FIN56 (angl. *Ferroptosis Inducer 56*) ir CIL56 (angl. *Caspase-Independent Lethal 56*) mažina GPX4 kiekį baltymo lygmeniu (netiesiogiai aktyvina skaidymą) ir slopina endogeninio lipofilinio antioksidanto kofermento Q sintezę (Dixon *et al.*, 2015, Shimada *et al.*, 2016). Vienintelis žinomas ketvirtosios feroptozės induktorių klasės junginys endoperoksidazė FINO<sub>2</sub> oksiduoja geležį, netiesiogiai slopina GPX4 fermentinį aktyvumą ir sukelia lipidų peroksidaciją

(Gaschler *et al.*, 2018). Dėl mažo tirpumo arba dar neištirtų farmakologinių savybių dalis minėtų ferroptozės induktorių naudojami tik *in vitro* tyrimuose. *In vivo* ferroptozę sukelia imidazolketonerastinas (Zhang *et al.*, 2019), piperazinerastinas (Yang *et al.*, 2014) ir FIN56 (X. Zhang *et al.*, 2021). Klinikoje taip pat yra naudojami sulfasalazinas ir sorafenibas. Sulfasalazinas yra priešūždegiminis vaistas, daugiausiai vartojamas reumatoidiniam artritui ir opiniam kolitui gydyti, o sorafenibas yra priešvėžinis junginys, įvairių kinazių slopiklis. Nors abu junginiai slopina cistino-glutamato antiporterinę sistemą  $x_c^-$ , sulfasalazinas ir sorafenibas nėra specifiniai ferroptozės induktoriai (Sehm *et al.*, 2016, Zheng *et al.*, 2021). Iš minėtų junginių, specifškai ferroptozę aktyvina erastinas ir jo analogai, RSL3 bei FIN56.

Laštelės membranos lipidų peroksidai ir peroksidikalai susidaro geležies vykdomose Fentono reakcijose arba dėl fermentų, naudojančių geležį kaip kofaktorių, veiklos, pavyzdžiui, lipoksigenazių. Ferroptozė yra nuo geležies priklausoma laštelių žūtis, todėl ją slopina geležį surišantys junginiai bei lipofiliniai antioksidantai (Dixon ir Stockwell, 2019). Pirmai grupei priskiriamas deferoksaminas ir ciklopiroksas, antrai –  $\alpha$ -tokoferolis (vitamino E komponentas), butilintas hidrokstitoluenas (BHT), ferostatinas-1 (Ferr-1) ir liproksantinas-1. Geležį surišantys junginiai neleidžia vykti lipidų peroksidacijai slopinami lipoksigenazes ir Fentono reakcijas, o lipofiliniai antioksidantai neutralizuoja lipidinius radikalus. Nustatyta, kad deferoksaminas ir ciklopiroksas yra tinkami naudoti *in vivo* (Feng ir Stockwell, 2018). Trečios klasės ferroptozės slopikliai, taip pat tinkami naudoti gyvosiose sistemose, yra deuterintos polinesočiosios riebalų rūgštys (D-PUFA, pavyzdžiui, D<sub>4</sub>-arachidono rūgštis), kurios slopina lipidų peroksidacijos iniciacijos ir grandinės augimo etapus. Ketvirtai klasei priskiriami lipidų oksigenazių (LOX) slopikliai. Be minėtų junginių, ferroptozę taip pat galima slopinti panaudojant cikloheksimidą (slopinama transliacija),  $\beta$ -merkptoetanolį (redukuoja užlaštelinį cistiną iki cisteino), dopaminą (slopinama GPX4 skaidymą), seleną (GPX4 kofaktorių) ir vildagliptiną (slopinama DPP4 valdomą lipidų peroksidaciją) (Stockwell *et al.*, 2017). Visgi, akivaizdu, kad šie ferroptozės slopikliai specifinio poveikio neturės.

Taigi, apibendrinant galima teigti, kad ferroptozei vykti būtinos trys sąlygos: 1) oksiduojami (acilinti polinesočiosiomis riebalų rūgštimis) fosfolipidai; 2) oksidacijos-redukcijos reakcijose galinti dalyvauti geležis; 3) išveiklinta arba nuslopinta lipidinių peroksidų neutralizavimo sistema (Dixon ir Stockwell, 2019).



**1.1 pav.** Ferroptozės molekulinis mechanizmas. Ferroptozės induktoriai parašyti raudonu šriftu, slopikliai – žaliu. ACSL4, *Acyl-CoA Synthetase Long chain family member 4*; ALOX, arachidonato lipoksigenazė; BHT, butilintas hidroksitoluenas; CoQ10, kofermentas O10; CPX, ciklopiroksolaminas; DFO, deferoksaminas; D-PUFA, deuterintos polinesočiosios riebalų rūgštys; FIN56, ferroptozės induktorius 56; FINO2, ferroptozės induktorius endoperoksidas; GSSG, glutationo disulfidas; HMG-CoA, β-hidroksi-β-metilglutarilkofermentas A; IKE, imidazolketonerastinas; LPCAT3, lizofosfatidilcholino aciltransferazė 3; RSL3, *RAS Selective Lethal 3* (Feng ir Stockwell, 2018).

### 1.1.2.1. Polinesočiųjų riebalų rūgščių turinčių fosfolipidų oksidacija

Žinduolių ląstelių membranose gausu glicerofosfolipidų (sutrumpintai fosfolipidų, angl. *phospholipids*, PL), acilintų bent viena polinesočiaja riebalų rūgštimi (angl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA). Įvairaus ilgio (C18 ir daugiau) bei nesotumo laipsnio (pavyzdžiui, C18:3, C20:4, C22:5) riebalų rūgštys kartu su šoninėmis grupėmis (fosfatidilinozitoliu, fosfatidilcholinu, fosfatidiletanolaminu) sudaro daugybę skirtingų fosfolipidų (Magtanong *et al.*, 2016). PUFA turinčių PL svarbą ferroptozėje išryškina faktas, kad genų, reikalingų PUFA aktyvacijai ir įjungimui į membranas *ACSL4* ir *LPCAT3* delecija apsaugo ląsteles nuo ferroptozės (Dixon *et al.*, 2015). Tai taip pat parodo, kad ferroptozei vykti PUFA turi būti fosfolipidų sudėtyje, o ne laisvoje formoje.

Priešingai nei sočioiose ir mononesočiosiose riebalų rūgštyse, PUFA esantys bisaliliniai vandenilio atomai lengvai oksiduojami laisvųjų radikalų arba fermentinėse nuo geležies priklausomose reakcijose (Gaschler ir

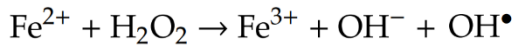
Stockwell, 2017). Mechanizmas, kuriuo membranų PUFA oksidacija sukelia ląstelės žūtį, iki galo neišaiškintas. Visų pirma, kyla klausimas, kokių organelių lipidai oksiduojami, nes be plazminės, gali būti oksiduojamos ir mitochondrijų, endoplazminio tinklo ir lizosomų membranos. Nors mitochondrijos yra pagrindinis ROS šaltinis ląstelėje, tiesioginės sąsajos tarp mitochondrijų ir ferroptozės nėra: mitochondrijų neturintiose ląstelėse ferroptozė sėkmingai vyksta (Gaschler *et al.*, 2018). Endoplazminiame tinkle randama daugiausiai ląstelės lipidų, todėl jis galėtų būti patrauklus kandidatas lipidų oksidacijai vykti. Ferroptozės induktoriai erastinas ir sorafenibas sukelia endoplazminio tinklo stresą, o poveikis antioksidantais jį slopina (Dixon *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2018, Malhotra *et al.*, 2008). Kita vertus, Ramano spektroskopijos metodu nustatė, kad ferostatinai kaupiasi lizosomose, galvota, kad jų membranos oksiduojamos ferroptozės metu, juolab, kad lizosomose kaip ir mitochondrijose pastoviai kaupiasi ROS (Gaschler *et al.*, 2018). Išties, poveikis lizosomų ATPazių, proteazių slopikliais ir junginiais, neutralizuojančiais lizosomų pH, slopina erastino ir RSL3 sukeltą ferroptozę (Torii *et al.*, 2016). Lizosomose taip pat kaupiasi geležis, o susidarius jos pertekliui ir oksidavus lizosomų membraną ląstelėje inicijuojama ferroptozė, bet ir kiti žūties tipai, pavyzdžiui, nuo lizosomų priklausoma ląstelių žūtis (Wang *et al.*, 2018). Be to, ferroptozė apibūdinama kaip autofaginis procesas, kadangi feritino, GPX4 ir kitų baltymų arba lipidų skaidymas lizosomose didina oksidatorių kiekį ląstelėje (Bai *et al.*, 2019, Hou *et al.*, 2016, Z. Wu *et al.*, 2019, M. Yang *et al.*, 2019). Apibendrinant, mitochondrijų, endoplazminio tinklo ir lizosomų vaidmuo ferroptozėje nėra iki galo iširtas, todėl kol kas visuotinai sutariama, kad ferroptozę sukelia plazminės membranos lipidų oksidacija.

Kitas klausimas, kas tiksliai sukelia ląstelės žūtį ferroptozės metu – nepataisomos plazminės membranos pažaidos ar šio proceso metu susidarę žalingi produktai, tokie kaip malondialdehidai ar 4-hidroksinonenalis. Šie junginiai pažeidžia ne tik membranų lipidus, bet ir ląstelės baltymus (Dalleau *et al.*, 2013) bei DNR (Zarkovic *et al.*, 2013), o tai neišvengiamai inicijuoja ląstelės žūtį. Oksidavus lipidus plazminėje membranoje susidaro poros ir iškreipiama jonų homeostazė, dėl to aktyvumą gali prarasti membranos baltymai (Agmon *et al.*, 2018).

#### 1.1.2.2. Oksidacijos-redukcijos reakcijose dalyvaujanti geležis

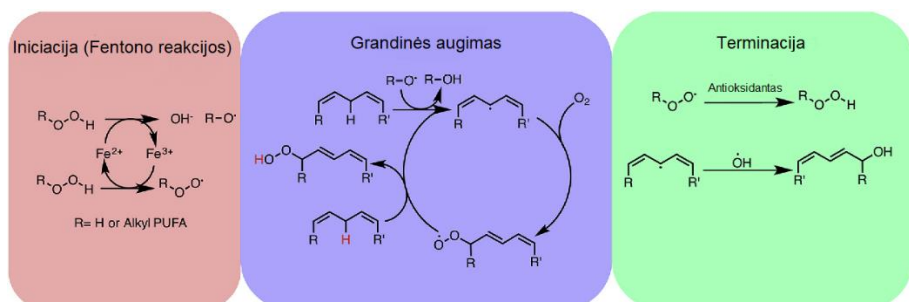
Kaip sako pavadinimas, ferroptozė yra nuo geležies priklausoma ląstelių žūtis. PUFA-PL pažaidas geležis gali sukelti dvejopai: tiesiogiai dalyvaudama

Fentono reakcijose arba netiesiogiai, kuomet lipidų oksidaciją inicijuoja fermentai, naudojantys geležį kaip kofaktorių. Didžioji dalis geležies ląstelėje egzistuoja hemo pavidalu, tačiau citozolyje randamas ir nedidelis kiekis laisvos divalentės geležies  $Fe^{2+}$ . Fentono reakcija vyksta  $Fe^{2+}$  reaguojant su vandenilio peroksidu, reakcijos produktai yra  $Fe^{3+}$ , hidroksido jonas ir hidroksiradikalas (1.2 pav.). Vandenilio peroksidas ląstelėje susidaro dismutuojant dviems superoksido jonams. Superoksido jonai, kaip pašalinis apykaitos produktas, išskiriami mitochondrijų elektronų pernašos grandinės I ir III komplekse oksidacinio fosforilinimo metu (Harris ir DeNicola, 2020).



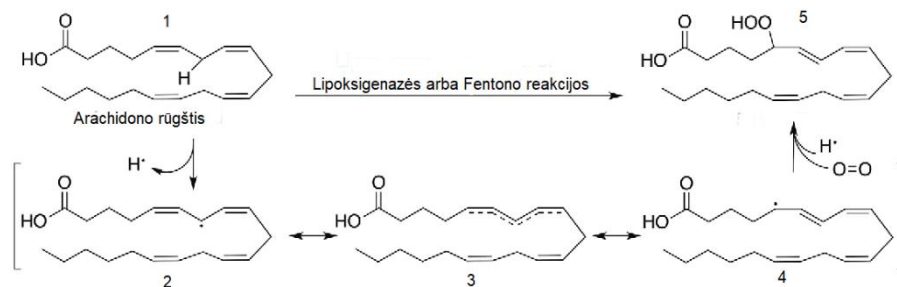
1.2 pav. Fentono reakcija.

PUFA-PL oksidacija vyksta, kai Fentono reakcijų metu susidarę radikalai atplėšia vandenilio atomus, esančius šalia bisalilinės anglies. Šias reakcijas slopina antioksidantai arba kiti radikalai (1.3 pav.) (Gaschler ir Stockwell, 2017).



1.3 pav. Trys nefermentinės lipidų oksidacijos etapai. Inicijacijos metu, vykstant Fentono reakcijoms, susidaro lipidiniai radikalai, kurie grandinės augimo metu reaguoja su naujais substratais, taip susidarant naujiems radikalams. Terminacijos metu radikalus redukuoja antioksidantai arba du radikalai sureaguoja tarpusavyje (Gaschler ir Stockwell, 2017).

Be Fentono reakcijų, membranų oksidacijoje gali dalyvauti ir fermentai. Trys pagrindinės tokių fermentų klasės yra ciklooksigenazės, citochromo p450 šeima ir lipoksigenazės. Pastarosios feroptozės kontekste geriausiai ištirtos (1.4 pav.), yra žinoma, kad lipoksigenazių slopinimas apsaugo sveikas ir vėžines ląsteles nuo feroptozės (Feng ir Stockwell, 2018). Tačiau svarbu paminėti, jog šis faktas dar nereiškia, kad vien tik fermentai yra atsakingi už lipidų pažaidas, kadangi dauguma lipoksigenazių slopiklių veikia kaip radikalų „gaidyklės“, kurios kartu nuklenksmina ir lipidinius radikalus, susidariusius nefermentinių reakcijų metu (Shah *et al.*, 2018).



**1.4 pav.** Bendras fermentinės PUFA oksidacijos mechanizmas. Arachidono rūgšties molekulėje (1) bisalilinėje padėtyje esantį vandenilio atomą pašalina lipoksigenazės arba Fentono reakcijose dalyvaujanti geležis, taip susidaro anglies radikalas (2). Izomerizuojantis dvigubiesiems ryšiams (3) susiformuoja termodinamiškai stabilus dienas (4), kuriam reaguojant su deguonimi susidaro lipidinis peroksidas (5) (Gaschler ir Stockwell, 2017).

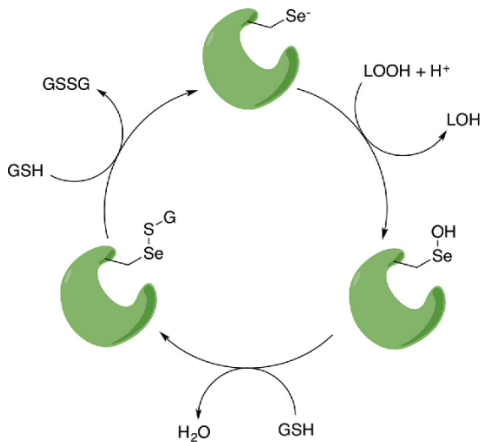
Šiandien žinoma, kad geležies pernašą valdantys baltymai – transferinas ir transferino receptoriai, geležies metabolizmo reguliatoriai, feritiną skaidantys fermentai – kartu reguliuoja ir ferroptozę (Dixon *et al.*, 2012, Hou *et al.*, 2016, Yang ir Stockwell, 2008). Kai kurių iš šių baltymų, pavyzdžiui, transferino receptoriaus, kiekis vėžinėse ląstelėse stipriai padidėjęs, kadangi dėl aktyvesnio metabolizmo šių ląstelių citozolyje kaupiama daugiau laisvos geležies nei atitinkamų sveikų audinių ląstelėse. Tai leidžia ferroptozę specifiskai nutaikyti į vėžines ląsteles (Tan *et al.*, 2018).

#### 1.1.2.3. Išveiklinta lipidinių peroksidų neutralizavimo sistema

Šiandien yra žinomos trys ląstelės antioksidacinės sistemos, dalyvaujančios ferroptozės slopinime: GPX4, FSP1 ir DHODH (L. Luo *et al.*, 2021). Pagrindinis baltymas, neutralizuojantis žalingus lipidinius peroksirus, yra glutationo peroksidazė GPX4 (1.5 pav.). Fermento veikimui būtini du kofaktoriai: selenocisteinas ir redukuotasis glutationas GSH. Reakcijos metu selenocisteinas (-Se<sup>-</sup>) atakuoja lipidinį peroksidą (LOOH), susidaro seleno rūgšties tarpininkas (-Se-OH) ir neutralus lipidinis hidroksidas (LOH). Fermento aktyvųjų centrą regeneruoja dvi GSH molekulės, redukuojančios seleno rūgštį iki selenocisteino (Gaschler ir Stockwell, 2017).

GPX4 aktyvumas ir ląstelių jautrumas ferroptozei priklauso nuo GSH kiekio ląstelėje. Glutationas – labiausiai žinduolių ląstelėse paplitęs antioksidantas, taip pat randamas augaluose, bakterijose ir archėjose. Glutationas egzistuoja dviejų formų pavidalu: redukuotos GSH ir oksiduotos GSSG. Normoksijos sąlygomis GSH ir GSSG santykis yra 9:1. GSH sintezė vyksta citozolyje. Pirmo etapo metu iš glutamato ir cisteino susidaro  $\gamma$ -glutamilsteinas. Šią reakciją katalizuoja  $\gamma$ -glutamato-cisteino ligazė ir tai yra

GSH sintezės greitį ribojanti stadija. Antro etapo metu glutationo sintetazė prie  $\gamma$ -glutamilsteino C galo prijungia glicino molekulę (Capelletti *et al.*, 2020).



**1.5 pav.** GPX4 veikimo mechanizmas. GPX4 pavaizduota žalia spalva (Gaschler ir Stockwell, 2017).

GPX4 yra vienintelis selenobaltymas, būtinas žinduolių vystymuisi, iš 25 žmogaus ląstelėse ekspresuojamų selenobaltymų, o *GPX4* delecija yra letali pelėms (Ingold *et al.*, 2018, Yang *et al.*, 2014). Tačiau įdomu tai, kad kai kurių tipų vėžinės ląstelės išgyvena be veiklaus GPX4 baltymo, galimai dėl sustiprėjusio antioksidacinio atsako arba nesočiųjų riebalų rūgščių nedidelio kiekio plazminėje membranoje (Y. Xie *et al.*, 2016). 2019 m. dvi mokslininkų grupės nepriklausomai viena nuo kitos parodė, kad ferroptozės slopinime dalyvauja ir kitas baltymas, FSP1 (angl. *Ferroptosis Supressor Protein 1*), kuris anksčiau buvo žinomas kaip AIFM2 (angl. *Apoptosis-Inducing Factor Mitochondrial 2*). FSP1 redukuoja ir tokiu būdu regeneruoja antioksidantą kofermentą Q (Bersuker *et al.*, 2019, Doll *et al.*, 2019). Be to, neseniai mitochondrijų vidinėje membranoje identifikuota antioksidacinė sistema DHODH, kuri netiesiogiai paskatina kofermento Q regeneraciją redukuodama flavino mononukleotidą FMN (Mao *et al.*, 2021). Eksperimentiškai parodyta, kad FSP1 slopiklis iFSP ir DHODH slopiklis BQR didina jautrumą ferroptozei jai atspariose vėžinėse ląstelėse (Doll *et al.*, 2019, Mao *et al.*, 2021). Taigi, tiriant ferroptozės mechanizmus, turėtų būti atsižvelgiama ne tik į GPX4, bet ir į FSP1 bei DHODH antioksidacinį veikimą.



### 1.1.3. Ferroptozės prigimtis

Siekdami suprasti ferroptozės prigimtį, mokslininkai ieško oksidacinio streso sukeltos ląstelės žūties formų evoliuciškai nutolusiuose organizmuose. Nors visų žinomų organizmų membranų struktūrą sudaro fosfolipidai, ne visuomet jų sudėtyje randamos polinesočiosios riebalų rūgštys, kurių dvigubieji ryšiai yra ROS taikynys. Pavyzdžiui, archėjų ir bakterijų membranų lipiduose dominuoja sočiosios ir mononesočiosios riebalų rūgštys, padedančios prisitaikyti ir išgyventi ekstremaliuose biotopuose (Siliakus *et al.*, 2017). Taigi, tipiniu atveju bakterijos ir archėjos ferroptozei yra atsparios. Tiesa, vandenynų gelmėse gyvenančių *Shewanella* genties bakterijų membranoje randamos omega-3 riebalų rūgštys (Dailey *et al.*, 2016), o patogeninės *Vibrio* rūšys polinesočiąsias riebalų rūgštis gali perimti iš aplinkos ir įjungti į membranų lipidų struktūrą. Pakitęs lipidų sąstatas keičia membranos pralaidumą, takumą ir gebėjimą formuoti bioplėveles, o tai padeda įgyti atsparumą antimikrobiniais preparatais (Moravec *et al.*, 2017). Kadangi daugelio rūšių bakterijų genomuose randamos į lipidų oksigenazių genus panašios sekos (Horn *et al.*, 2015), galima tikėtis, kad ferroptozę sukelti bakterijose pavyktų. Mielės, kaip ir bakterijos, taip pat paprastai nesintetina polinesočiųjų riebalų rūgščių, bet gali jas perimti iš aplinkos ir įjungti į membranų lipidus, be to, mielėse randami net trys į GPX4 panašūs baltymai (Avery *et al.*, 2004). Parodyta, kad polinesočiosiomis riebalų rūgštimis papildžius kofermento Q neturinčių mutantų ir laukinio tipo *Saccharomyces cerevisiae* augimo terpę, ląstelėse sukiamas oksidacinis stresas (Hill *et al.*, 2012). Taigi, galima daryti prielaidą, kad ferroptozė veikiausiai nėra įgimta žemesniesiems organizmams, greičiau priešingai: keisdami membranų sudėtį jie prisitaiko prie ekstremalios aplinkos, tačiau kartu atsiranda palankios sąlygos ferroptozei vykti.

ROS valdomas signalo perdavimas stipriai išreikštas augaluose, tad nenuostabu, kad juose aptikti ir į ferroptozę panašūs procesai (Doyle *et al.*, 2010). Paveikus *Arabidopsis thaliana* šaknis 55°C temperatūra sukeliama ląstelių žūtis, kurią slopina geležį surišantis ciklopiroksas ir lipofilinis antioksidantas ferostatinas-1. Ląstelėse mažėja glutationo kiekis, didėja NADPH oksidazės aktyvumas ir kaupiasi ROS, taip pat stebimas morfologinis ferroptozės požymis – susitraukusios mitochondrijos, tačiau ląstelių branduoliai išlieka nepakitę. Prieš karščio šoką *Arabidopsis thaliana* ląsteles palaikius terpėje su neoksiduojamomis polinesočiosiomis riebalų rūgštimis (turinčiomis sunkųjį deuterio izotopą šalia bisalilinės anglies), ląstelių žūtis slopinama (Distefano *et al.*, 2017). Nors ROS augalams yra naudingi kaip

signalo perdavimo tarpininkai, susidarius jų pertekliui kyla grėsmė pažeisti gyvybiškai svarbių baltymų struktūrą. Todėl augaluose feroptozė gali būti panaudota eliminuojant ląsteles, kuriose elektrofilinių tarpininkų yra per daug.

Viena aišku – žinduoliuose natūrali feroptozės funkcija yra naviko slopinimas. Vienas iš svarbiausių naviko supresorių žinduolių ląstelėse yra p53 baltymas, kuris, atsiradus ląstelių pažaidoms, stabdo jų ciklą, skatina senėjimą arba sukelia apoptozę (Kasthuber ir Lowe, 2017). Tačiau tai gali būti ne vieninteliai p53 valdomi naviko supresoriniai mechanizmai. Nustatyta, kad defektyvus p53<sup>3KR</sup> mutantas (3KR: K117R+K161R+K162R), kuris negali stabdyti ląstelės ciklo, sukelti senėjimo ar apoptozės, vis tiek išlaiko naviko supresorines savybes *in vivo* reguliuodamas ląstelės metabolizmą – mažindamas SLC7A11, cistino-glutamato antiporterinės sistemos komponento, kiekį (Jiang *et al.*, 2015). Papildoma taškinė mutacija K98 eliminuoja šį efektą, o kartu ir p53 baltymo supresorinę funkciją (Wang *et al.*, 2016). Kitas naviko supresorius, reguliuojantis feroptozę, yra BAP1 (angl. *BRCA1-associated protein 1*), kuris taip pat mažina SLC7A11 kiekį; BAP1 išveiklinimas didina vėžinių ląstelių atsparumą feroptozei ir skatina naviko formavimąsi (Zhang *et al.*, 2018). Trečias vėžio supresorius, siejamas su feroptoze, yra fumarazė. Dalyvaudamas trikarboksirūgščių cikle, šis fermentas katalizuoja fumarato virtimą į malatą, todėl fumarazės išveiklinimas didina fumarato kiekį ląstelėje, lėtina trikarboksirūgščių ciklą, o kartu ir oksidacinį fosforilinimą. Tuomet ląstelėse slopinama feroptozė (neaktyviose mitochondriose susidaro mažiau ROS), lėtėja GSH sunaudojimas. Kai fumarazė aktyvi, mitochondrijų metabolizmas nestabdomas, GPX4 intensyviai naudoja GSH, todėl feroptozė inicijuojama (Gao *et al.*, 2019).

Iš esmės feroptozės mechanizmas yra paprastas: cisteino kiekio sumažėjimas ląstelėje slopina GPX4, todėl ląstelėje kaupiasi ROS ir sukeliama žūtis. Feroptozėje nedalyvauja kinazės ar proteazės, ji nereikalauja transkripcijos, translacijos ir netgi specifinės viduląstelinės organelių sistemos. Taigi, feroptozė galėtų būti primityvus ląstelių atrankos metodas, valdomas vienos aminorūgšties – cisteino – kiekio aplinkoje (Dixon, 2017). Be to, skirtingai nei apoptozė, feroptozė yra imunogeniška, todėl labiau pravarti tais atvejais, kuomet yra naudinga organizmo imuninė reakcija – slopinant naviką arba esant patogenų infekcijai (Kim *et al.*, 2016, Linkermann *et al.*, 2014).

Jau seniai žinoma, kad gliukozės, glutamino ar leucino stoka sukelia apoptozę (Iurlaro *et al.*, 2017, Mates *et al.*, 2006, Xiao *et al.*, 2016). Kodėl ląstelėms negaunant cisteino arba nuslopinus GPX4 prasideda būtent feroptozė? Pirma hipotezė – proferoptotiniai stimulai iš tiesų sukelia ir

apoptozę, ir ferroptozę, bet ferroptozė įvyksta greičiau. Visgi: a) ląstelėse nuslopinus cistino-glutamato antiporterį ferroptozė įvyksta tik po paros, o tai būtų pakankamas laiko tarpas įvykti ir apoptozei; b) specifiniai ferroptozės slopikliai neblokuoja apoptozės, bet pilnai nuslopina ferroptozės induktorių sukiamą ląstelių žūtį (Dixon *et al.*, 2012). Todėl peršasi išvada, kad ferroptozė ir apoptozė vyksta nepriklausomai viena nuo kitos. Gali būti taip, kad metaboliniai ar kiti pokyčiai, sukeltys ferroptozę, apoptozę slopina. Pavyzdžiui, inicijavus ferroptozę ląstelėse stipriai sumažėja GSH kiekis, o GSH yra reikalingas kaspazės-3 aktyvacijai, todėl jo trūkstant ląstelėse apoptozė vyksti nebegali (Ueda *et al.*, 1998).

#### 1.1.4. Ferroptozės priešvėžinio poveikio potencialas

##### 1.1.4.1. Vaistams atsparios ląstelės

Sutrikusi ferroptozės reguliacija dažnai tampa atsparumo chemoterapiniams preparatams ir nesėkmingo vėžio gydymo priežastimi. Farmakologinė ir genetinė ferroptozės moduliacija gali padėti šias problemas įveikti. Atsižvelgiant į ferroptozės molekulinį mechanizmą, atsparumas chemoterapijai galėtų būti sumažinamas reguliuojant GPX4, geležies arba lipidų metabolizmo kelius (Zhang *et al.*, 2022).

**Kanoninio GPX4 kelio reguliacija.** Glioblastomos ląstelių atsparumą chemoterapiniam preparatui temozolomidui lemia androgeno receptoriaus aktyvacija. Natūralaus ferroptozės induktoriaus kurkumino analogas paskatina šio receptoriaus ubikvitilinimą, kartu sukeldamas ferroptozę ir sustiprindamas temozolomido veikimą (Chen *et al.*, 2020). Kolorektalinio vėžio ląstelių atsparumas oksaliplatinai koreliuoja su padidėjusiu KIF20A kiekiu, o KIF20A/NUAK1/Nrf2/GPX4 kelio sutrikdymas šį atsparumą sumažina (C. Yang *et al.*, 2021). Kitam platinos vaistui, cisplatinai, atsiradęs vėžinių ląstelių atsparumas taip pat gali būti slopinamas panaudojant natūralius ferroptozės induktorius diterpenoidus, slopinant xCT sistemą erastinu, sulfasalazinu arba genetinėmis intervencijomis (Fu *et al.*, 2021, Roh *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2021).

**Geležies metabolizmo kelių reguliacija.** Cisplatinai atsparių kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių gyvybingumas gali būti sėkmingai sumažinamas jas veikiant ferroptozės induktoriais dihidroartemisiniu. Nustatyta, kad šiuo atveju ląstelių jautrumas keičiasi dėl stipriai padidėjusio laisvos geležies kiekio citozolyje ir tokiu būdu sukeltos ferroptozės (Du *et al.*, 2021). Kolorektalinio vėžio ląstelių atsparumas 5-fluoruracilui koreliuoja

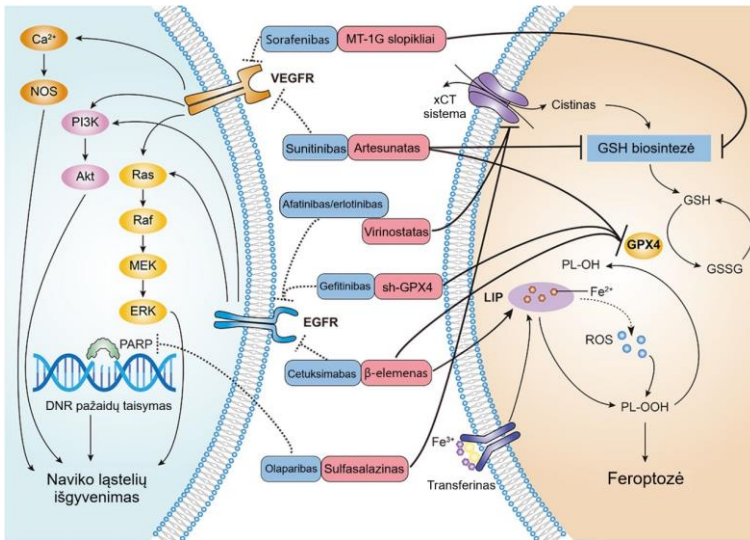
su padidėjusiu glikoproteino LCN2 kiekiu. Kadangi LCN2 dalyvauja palaikant geležies homeostazę, jis yra naudojamas kaip taikynys siekiant sustiprinti 5-fluoruracilo citotoksiškumą feroptozės keliu (Chaudhary *et al.*, 2021). Kitas baltymas, valdantis geležies kiekį ląstelėje, yra divalenčių metalų transporteris 1 (DMT1). Turcu *et al.* parodė, kad DMT1 slopinimas didina laisvos geležies kiekį ląstelėje, panaikina krūties vėžio kamieninių ląstelių daugiavaistį atsparumą ir sukelia jų žūtį feroptozės būdu (Turcu *et al.*, 2020).

**Lipidų metabolizmo reguliacija.** Kasos vėžio ląstelių atsparumas gemcitabinui išnyksta ląstelėse aktyvavus ACSL4 (fermentą, aktyvinantį riebalų rūgštis prieš jas įjungiant į membranos fosfolipidų sudėtį) ir sukėlus feroptozę (Ye *et al.*, 2020).

Feroptozė taip pat gali padėti įveikti įgimtą ir įgytą atsparumą taikinių terapijai (1.6 pav.).

**Feroptozė ir įgimtas atsparumas.** Olaparibas, plačiai naudojamas poli-ADP ribozės polimerazės (PARP) slopiklis, yra FDA (angl. *Food and Drug Administration*, JAV) patvirtintas vaistas pažengusiam gimdos vėžiui gydyti. Tačiau jis yra padeda tik toms pacientėms, kurių vėžinės ląstelės turi mutavusį BRCA1/2 baltymą. Nustatyta, kad feroptozės induktoriai padidina laukinio tipo BRCA1/2 turinčių gimdos vėžio ląstelių jautrumą olaparibui *in vitro* ir *in vivo* sistemose (Hong *et al.*, 2021). Daugiau kaip pusėje metastazavusio kolorektalinio vėžio navikų randamos RAS mutacijos. RAS dalyvauja perduodant signalą augimo veiksmų receptoriais, o šio baltymo mutacijos riboja antikūnų prieš augimo veiksmų receptorius, pavyzdžiui, cetuksimabo (anti-EGFR), panaudojimą. Cetuksimabo ir natūralaus feroptozės induktoriaus β-elemento kombinacija ne tik veiksmingai sukelia feroptozę kolorektalinio vėžio ląstelėse, bet ir slopina epitelio-mezenchimos virsmą, įprastai lydintį vėžio metastazavimo procesą (P. Chen *et al.*, 2020). Feroptozės sukėlimas taip pat padidina gefitinibo veiksmingumą trigubai neigiamo tipo (angl. *triple negative*) krūties vėžio ląstelėse, tipiniu atveju nejautriose šiam vaistui (Song *et al.*, 2020). Be to, feroptozė gali būti panaudota ne tik chemoterapiniam, bet ir imunoterapiniam atsparumui įveikti: feroptozės būdu žūstančios vėžinės arba imuninės ląstelės išskiria DAMP (angl. *Damage-Associated Molecular Pattern*) molekules ir citokinus, kurie pritraukia kitas imuninio atsako ląsteles, sunaikinančias naviką (X. Luo *et al.*, 2021, Xu *et al.*, 2021).

**Feroptozė ir įgytas atsparumas.** Sorafenibas yra įvairių onkogeninių kinazių slopiklis, naudojamas pažengusios hepatoląstelinės karcinomos gydymui. Deja, jam dažnai išsivysto atsparumas. Be kitų ląstelės žūties tipų, sorafenibas gali sukelti ir feroptozę, jis yra pirmo tipo feroptozės induktorius. Parodyta, kad sorafenibo proferoptotinis veikimas jam atspariose ląstelėse gali būti sustiprinimas slopinant ROS surišančius baltymus metalotioneinus, pavyzdžiui, metalotioneiną-1G (MT-1G) (Sun *et al.*, 2016).

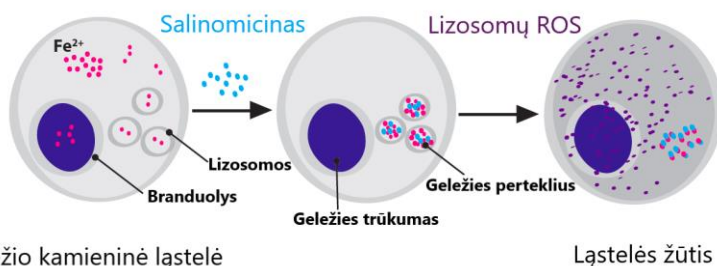


**1.6 pav.** Atsparumo taikinių terapijai mažinimas sukiant feroptozę. VEGFR, EGFR ir PARP signalinių kelių aktyvacija skatina naviko ląstelių išgyvenimą ir atsparumą tam tikriems slopikliams (mėlyni stačiakampiai). Kombininė terapija su feroptozės induktoriais (rožiniai stačiakampiai) šį atsparumą panaikina. EGFR, epidermio augimo veiksnio receptorių; LIP, laisva geležis (angl. *labile iron pool*); MT-1G, metalotioneinas-1G; PARP, poli-ADP ribozės polimerazė; PL-OH, fosfolipidų alkoholiai; PL-OOH, fosfolipidų hidroperoksida; VEGFR, kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptorių; xCT, cistino/glutamato antiporteris (Zhang *et al.*, 2022).

Plaučių adenokarcinomos atveju dažna *EGFR* mutacija. Pacientai, kurių navikuose ši mutacija aptinkama, gali būti sėkmingai gydomi EGFR slopikliais, pavyzdžiui, afatinibu arba erlotinibu. Įdomu tai, kad EGFR slopikliams atsparios plaučių vėžio ląstelės įgyja padidėjusį jautrumą feroptozės induktoriams (T. Zhang *et al.*, 2021). Panašus efektas stebimas ir inkstų vėžio ląstelėse, atspariose plataus poveikio tirozino kinazių slopikliui sunitinibui (Markowitsch *et al.*, 2020).

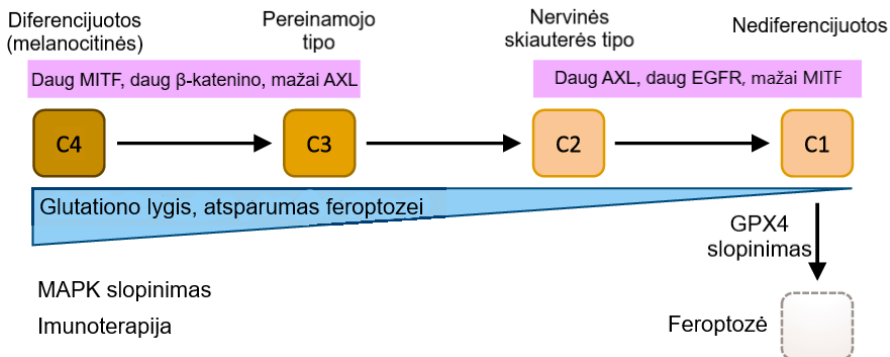
### 1.1.4.2. Vėžio kamieninės ir dediferencijuotos ląstelės

Vėžio kamieninės ląstelės (dar vadinamos į kamienines panašiomis vėžinėmis ląstelėmis arba naviką inicijuojančiomis ląstelėmis) yra naviko ląstelių populiacija, pasižyminti kamieninių ląstelių savybėmis (Cosialls *et al.*, 2021). Jų buvimu taip pat galima aiškinti naviko atsparumą priešvėžinei terapijai. Atsparų šių ląstelių fenotipą lemia: 1) specifinė mikroaplinka (fibroblastai, endotelio, mezenchiminės, imuninės ląstelės, sekretuojami augimo veiksniai ir citokinai), kurie aktyvina atsparumą valdančius signalinius kelius bei fiziškai apsaugo ląsteles nuo vaistų poveikio (Prieto-Vila *et al.*, 2017); 2) padidėjęs ABC nešiklių kiekis ir paspartėjusi vaisto išnaša iš ląstelės (Dean *et al.*, 2005); 3) sulėtėjęs vėžio kamieninių ląstelių dalijimasis (angl. *quiescent state*) (Chen *et al.*, 2016); 4) Notch, Wnt, Hedgehog signalinių kelių aktyvacija (Pattabiraman ir Weinberg, 2014). Įdomu tai, kad vėžio kamieninėse ląstelėse yra pakitęs geležies metabolizmas – padidėjęs transferino receptoriaus 1, feritino ir sumažėjęs feroportino kiekis (Raggi *et al.*, 2017, Schonberg *et al.*, 2015). Vienas iš kamieninių ląstelių žymenų yra glikoproteinas CD44. Sudariusi kompleksą su CD44 ligandu hialuronatu, geležis lengvai patenka į vėžio kamienines ląsteles (Muller *et al.*, 2020). Taigi, lyginant su nekamieninėmis ląstelėmis, vėžio kamieninių ląstelių citozolyje geležies koncentracija yra didesnė, o tai lemia ir didesnę jų jautrumą ferroptozei. Kita vertus, geležies kiekis vėžio kamieninėse ląstelėse gali būti didinamas ir dirbtinai, pasitelkiant tam tikrus chemoterapinius preparatus. Pavyzdžiui, Mai *et al.* parodė, kad salinomocinas ir jo darinys irinomicinas skatina geležies kaupimąsi vėžio kamieninių ląstelių lizosomose. Citozolyje sumažėjus laisvos geležies koncentracijai, ląstelė gauna signalą, kad susiduriama su geležies stygiumi. Siekiant atstatyti geležies balansą, lizosomose pradedamas skaidyti geležį surišantis baltymas feritinas. Taip ląstelėje dar labiau padidėja geležies kiekis ir sukeliama ferroptozė (1.7 pav.) (Mai *et al.*, 2017).



**1.7 pav.** Salinomocinas paskatina geležies kaupimąsi vėžio kamieninių ląstelių lizosomose ir sukelia ląstelių žūtį (Mai *et al.*, 2017).

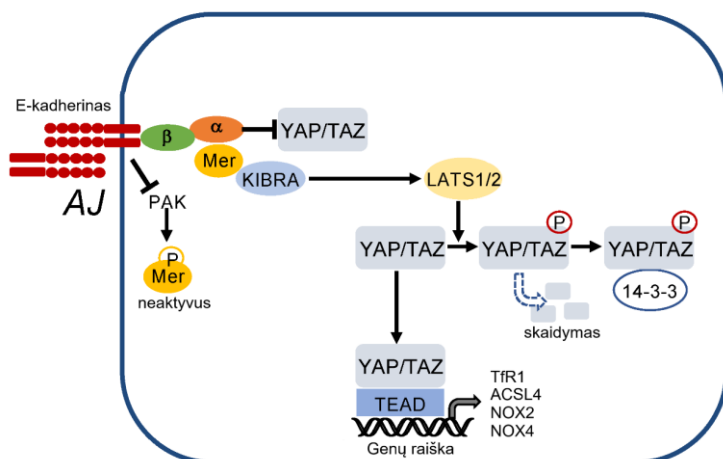
Melanomos ląstelių atsparumas ferroptozei siejamas su jų diferenciacijos statusu. Vystantis melanomai, melanocitai gali įgyti keturias skirtingas diferenciacijos būsenas (1.8 pav.). Melanomos ląstelės gali dediferencijuoti spontaniškai, po poveikio MAP kinazių slopikliais arba imunoterapiniais agentais. Dediferencijuotos būsenos ląstelės pasižymi mažesniu GSH kiekiu ir didesniu jautrumu ferroptozės induktoriams (Tsoi *et al.*, 2018).



**1.8 pav.** Įgimta arba terapijos sukelta melanomos ląstelių dediferenciacija C4-C1 kryptimi koreliuoja su didėjančiu jautrumu ferroptozei. EGFR, epidermio augimo veiksnio receptorių; MAPK, MAP kinazės; MITF, *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (Tsoi *et al.*, 2018).

#### 1.1.4.3. Kontaktus praradusios ir mezenchiminio tipo ląstelės

Dar 1960 m. mokslininkai pastebėjo, kad didesniu tankiu augančios ląstelės yra ne tokios jautrios cisteino nebuvimui augimo terpėje nei tos, kurios išsėjamos retai (Eagle, 1960). Vėliau buvo parodyta, kad dideliu tankiu augantys pelės embriono fibroblastai yra atsparūs GPX4 slopinimui (Seiler *et al.*, 2008). Šie pastebėjimai pasiūlė idėją, kad jautrumas ferroptozei priklauso nuo ląstelių tankio. Visgi, tiesioginė tarpląstelinė kontaktų įtaka ferroptozės slopinimui atskleista tik prieš keletą metų (Wenz *et al.*, 2019). Wu *et al.* siūlo, kad lemiamą vaidmenį turi Hippo signalinis kelias (1.9 pav.). Dideliu tankiu augančiose ląstelėse šio kelio tarpininkus YAP ir TAZ slopina E-kadherinas. Kolorektalinės karcinomos ląstelėse E-kadherinas slopina PAK kinazę, taip netiesiogiai aktyvindamas jos taikinį merliną. Aktyvus merlinas sudaro kompleksą su KIBRA ir aktyvina LATS1/2, kuris fosforilina YAP/TAZ. Fosforilinti YAP/TAZ skaidomi, o jų taikinių, dalyvaujančių ferroptozės valdyje – transferino receptoriaus TfR1, fosfolipidų biosintezės fermento ACSL4, NADPH oksidazių NOX2 ir NOX4 – raiška slopinama (J. Wu *et al.*, 2019, W. H. Yang *et al.*, 2019, Yang *et al.*, 2020). Be to, YAP ferroptozę reguliuoti gali ir per kitą taikinį – E3 ubikvitino ligazę SKP2, kaip – tiksliai nežinoma (W. H. Yang *et al.*, 2021).



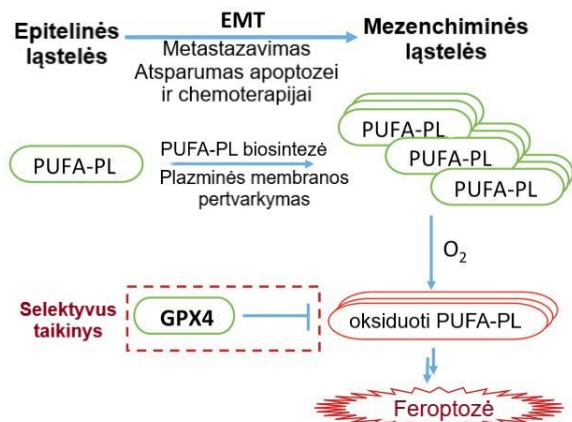
**1.9 pav.** E-kadherino reguliuojama ferroptozė. Dideliu tankiu augančiose ląstelėse E-kadherinas slopina YAP/TAZ, tokiu būdu sumažindamas ferroptozę valdančių baltymų genų raišką. ACSL4, *Acyl-CoA Synthetase Long chain family member 4*; AJ, adhezinės jungtys;  $\alpha$ ,  $\alpha$ -kateninas;  $\beta$ ,  $\beta$ -kateninas; Mer, merlinas; NOX, NADPH oksidazė; TFR1, transferino receptorius 1. Pagal (Dietrich ir Hofmann, 2021).

Naviko ląstelės kontaktus su užląsteliniu užpildu palaiko per integrinus. Nustatyta, kad integrino  $\alpha\beta4$  perduodamas signalas valdo krūties vėžio ląstelių jautrumą ferroptozei. Ant neadhezyvaus paviršiaus kultivuojamos  $\alpha\beta4$  neekspresuojančios ląstelės yra jautrios ferroptozės induktoriams, jų žūtį iš dalies sumažina ferroptozės slopikliai ferostatinas-1 ir deferoksaminas. Manoma, kad  $\alpha\beta4$  integrinas atsparumą ferroptozei valdo dviem būdais: 1) aktyvindamas STAT3 signalinį kelią ir mažindamas ACSL4 kiekį; 2) didindamas GPX4 kiekį. Tačiau svarbu paminėti, kad neadhezinėmis sąlygomis augančių ląstelių žūtį iš dalies slopina ir pan-kaspazių slopiklis Z-VAD-FMK, kas rodo, kad dalis populiacijos žūsta apoptozės būdu (Brown *et al.*, 2017). Bet kokių atveju, šie tyrimai atskleidžia, kad praradusios kontaktą su augimo pagrindu vėžinės ląstelės tampa lengvu ferroptozės induktorių taikiniu.

Kontaktai su aplinkinėmis ląstelėmis ir augimo pagrindu prarandami metastazės proceso pradžioje, vėžinėms ląstelėms atsiskiriant nuo pirminio naviko. Naviko metastazavimą beveik visuomet lydi epitelio-mezenchimos virsmas (EMT). EMT – tai procesas, kurio metu padidėja epitelinių ląstelių plastiškumas, judrumas, jos praranda sąveiką su pamatine membrana, pradeda išskirti užląstelinį užpildą skaidančius fermentus ir virsta judriomis mezenchiminėmis ląstelėmis (Kalluri ir Weinberg, 2009). Tam, kad ląstelės taptų judresnės, turi pasikeisti jų plazminės membranos takumas, todėl į membranų sudėtį pradedama įtraukti daugiau PUFA-PL. Kaip jau minėta, PUFA stipriai padidina membranų jautrumą peroksidacijai (Liu *et al.*, 2018).



Viswanathan *et al.* parodė, kad EMT perėjusios ir terapijai atsparios karcinomos, melanomos, prostatos vėžio ir sarkomos ląstelės tampa priklausomos nuo GPX4 veikimo. Atsiveria galimybės šias ląsteles eliminuoti ferroptozės keliu (1.10 pav.) (Viswanathan *et al.*, 2017).



**1.10 pav.** Vėžinės ląstelės, perėjusios EMT, įgauna atsparumą apoptozei ir chemoterapijai. EMT procesui reikalingas didesnis PUFA-PL kiekis ląstelių plazminėje membranoje, kas neišvengiamai padidina jų jautrumą ferroptozei ir GPX4 slopinimui (Liu *et al.*, 2018).

### 1.1.5. Ferroptozės detekcija: žymenys ir metodai

Ferroptozės reguliatorių ir žymenų duomenų bazėje FerrDb V2 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/>) šiuo metu yra anotuota apie penkiasdešimt teigiamų ir neigiamų ferroptozės žymenų, t. y. baltymų ir nekoduojančių RNR, kurių lygis didėja arba mažėja ląstelėse vykstant ferroptozei (1.2 lentelė). Dauguma baltymų dalyvauja lipidų, geležies apykaitoje, signalo perdavime ir transkripcijos reguliacijoje (Zhou ir Bao, 2020). Taip pat šiandien žinomos aštuonios ferroptozę valdančios nekoduojančios RNR (SLC16A1-AS1, SETBP1-DT, ZNF93-AS1, SLC25A5-AS1, AC073896.2, LINC00242, PXN-AS1 ir AC036176), kurios yra prognostiniai kasos vėžio biožymenys (Chen *et al.*, 2022).

**1.2 lentelė.** Ferroptozės biožymenys (FerrDb V2 duomenys).

Genas	Geno produkto funkcija	Raiškos pokytis	Raiškos nustatymo metodas	PMID
<i>ARRDC3</i>	Adrenerginių receptorių sintezės baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246

<i>ASNS</i>	Aminorūgščių biosintezės baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>ATF3</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>ATF4</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>ATP6V1G2</i>	Vakuolių ATPazės komponentas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>BLOC1S5-TXNDC5</i>	Ilga nekoduojanti RNR	↓	RNR sekoskaita	24844246
<i>CBS</i>	Aminorūgščių biosintezės baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>CEBPG</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>CHAC1</i>	Glutationo apykaitos baltymas	↑	RNR sekoskaita, kiekybinė PGR	24844246
<i>DDIT3</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>DDIT4</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>FTH1</i>	Feritino sunkioji grandinė	↓	Imunoblotas, kiekybinė PGR	27514700
<i>FTH1</i>	Feritino sunkioji grandinė	↓	Western blot analizė, kiekybinė PGR	27773819
<i>GDF15</i>	Augimo veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>GPT2</i>	Aminorūgščių biosintezės baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>GPX4</i>	Glutationo peroksidazė 4	↓	Western blot analizė, kiekybinė PGR	27773819
<i>HERPUD1</i>	Endoplazminio streso baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>HSPB1</i>	Šaperonas	↓	Kiekybinė PGR	27773819
<i>JDP2</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>KLHL24</i>	Ubikvitino ligazės komplekso baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>LOC284561</i>	Ilga nekoduojanti RNR	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>LOC390705</i>	Ilga nekoduojanti RNR	↓	RNR sekoskaita	24844246

<i>LURAP1L</i>	Adaptorinis baltymas, dalyvauja ląstelių migracijoje	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>NFE2L2</i>	Transkripcijos veiksnys	↓	Kiekybinė PGR	27773819
<i>PCK2</i>	Oksalacetato apykaitos baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>PSAT1</i>	Oksalacetato apykaitos baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>PTGS2</i>	Ciklooksigenazė	↑	Kiekybinė PGR	24439385
<i>RGS4</i>	G baltymų signalo perdavimo baltymas	↓	RNR sekoskaita	24844246
<i>SESN2</i>	Streso indukuojamas metabolinis reguliatorius	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>SLC1A4</i>	Aminorūgščių transportas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>SLC3A2</i>	Aminorūgščių transportas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>SLC40A1</i>	Geležies transporto reguliatorius	↑	Kiekybinė PGR	27773819
<i>SLC7A5</i>	Aminorūgščių transporto reguliatorius	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>SNORA16A</i>	Mažoji branduolio RNR	↓	RNR sekoskaita	24844246
<i>TF</i>	Geležies transporto reguliatorius	↑	Kiekybinė PGR	27773819
<i>TFRC</i>	Geležies transporto reguliatorius	↑	Kiekybinė PGR	27773819
<i>TRIB3</i>	Kinazė	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>TSC22D3</i>	Transkripcijos reguliatorius	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>TUBE1</i>	Citoskeleto baltymas	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>TXNIP</i>	Oksidacinio streso atsako reguliatorius	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>VEGFA</i>	Augimo veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>VLDLR</i>	Lipoproteinų receptoriai	↑	RNR sekoskaita	24844246
<i>XBP1</i>	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246

ZFP69B	Transkripcijos veiksnys	↑	RNR sekoskaita	24844246
--------	-------------------------	---	----------------	----------

Be žymenų raiškos tyrimo, feropozės detekcijai naudojami ir kiti metodai. Ląstelių žūtis po feropozės induktorių poveikio gali būti vertinama pagal plazminės membranos integralumo praradimą, ląsteles dažant propidžio jodidu ir analizuojant tėkmės citometru. Šiuo atveju ląstelės paprastai kartu veikiamos ir specifiniais feropozės slopikliais bei parodoma, kad jie slopina feropozės induktoriais paveiktų ląstelių žūtį. Feropozės procesą taip pat atspindi membranos lipidų oksidacija, kuri detektuojama panaudojant su peroksiradikalais ar lipidiniais peroksidais reaguojančius fluorescuojančius dažus C11-BODIPY, Click-It LAA ir LiperFluo (Kagan *et al.*, 2017). Pavyzdžiui, C11-BODIPY 581/591 lipidiniam reagentui pereinant iš redukuotos į oksiduotą formą jo fluorescencija pasikeičia iš raudonos į žalią. Fluorescenciniu mikroskopu arba tėkmės citometru fiksuojamas raudonos fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas (ląstelės plazminėje membranoje mažėja redukuotų lipidų) ir/arba žalios fluorescencijos intensyvumo didėjimas (membranoje daugėja oksiduotų lipidų) (Drummen *et al.*, 2002). Membranos lipidų oksidacija gali būti detektuojama ir netiesiogiai, pagal šalutinių produktų malondialdehido (MDA) ir 4-hidroksinonenalio (4HNE) susidarymą. Tam dažniausiai pasitelkiama spektrofotometrija. Be to, feropozę galima sekti pagal GSH/GSSG ir  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  kiekio santykio pokyčius ląstelėje. Dažniausiai tam taip pat naudojami spektrofotometriniai metodai, tačiau yra sukurta ir fluorescuojančių dažų, kurie leidžia vertinti minėtų junginių kiekio pokyčius realiu laiku gyvoje ląstelėse (Aron *et al.*, 2016, Shi *et al.*, 2018).

## 1.2. Maisto medžiagų trūkumo sukeltas vėžinių ląstelių metabolinis perprogramavimas

Sveikų ir vėžinių ląstelių atsakas į nepalankias augimo sąlygas, tokias kaip maisto medžiagų ar augimo veiksnių trūkumas, yra skirtingas. Badaujančios sveikos ląstelės dažniausiai sulėtina metabolizmą ir pereina į nesidalinančių ląstelių (angl. *quiescent*) būseną (Codeluppi *et al.*, 2011), o vėžinės ląstelės prie pakitusios aplinkos prisitaiko ir dalijasi toliau. Lengvesnę adaptaciją lemia pastovus maisto medžiagų stygius kancerogenezės metu. Kancerogenezės pradžioje vėžinėms ląstelėms sparčiai besidalinant stipriai išauga jų energijos ir maisto medžiagų poreikis. Išgyvena tik tos ląstelės, kurios prie metabolitų stygiaus yra labiausiai prisitaikiusios. Navikui didėjant, jame susidaro maisto medžiagų gradientai, kurie vėlgi riboja ląstelių priėjimą

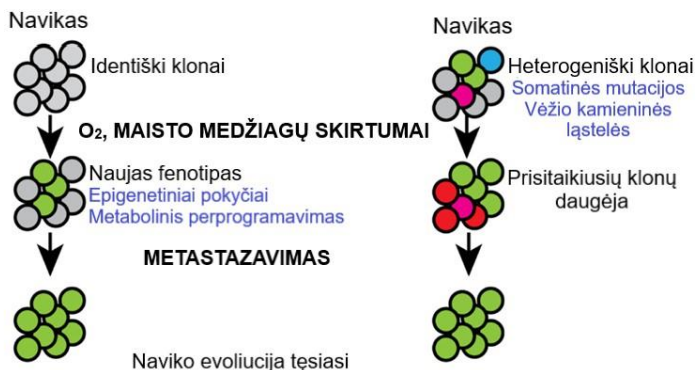
prie konkrečių maisto medžiagų. O navikui metastazuojant vėžinės ląstelės pastoviai atsiduria joms nepalankiose nišose (Faubert *et al.*, 2020). Visais šiais etapais tam tikrų maisto medžiagų buvimas arba nebuvimas ląstelių mikroaplinkoje sukelia jų metabolinį perprogramavimą (angl. *metabolic rewiring*) – priklausomybę nuo tam tikrų maistinių junginių (Lorendeau *et al.*, 2015). Taip vieni navikai tampa priklausomi nuo glutamino, kiti – nuo arginino ar serino (Luo, 2011, Patil *et al.*, 2016, Wise ir Thompson, 2010). Konkrečią priklausomybę lemia ne tik kancerogenezės metu žmogaus organizme cirkuliuojančios maisto medžiagos, bet ir audinio, iš kurio formuojasi navikas, tipas, naviko heterogeniškumas, vėžinių ląstelių sąveika su stromos ląstelėmis bei funkciniai tam tikro vėžio tipo ląstelių poreikiai (Altea-Manzano *et al.*, 2020). Ar metastazavimui svarbūs naviko ląstelių metaboliniai pokyčiai yra įgyjami, ar įgimti, nėra iki galo išaiškinta (1.11 pav.). Pagal vieną scenarijų, pirminį naviką sudaro fenotipiškai identiški klonai, tačiau priklausomai nuo maisto medžiagų ir deguonies kiekio aplinkoje, kai kuriose ląstelėse įvyksta fenotipiniai pokyčiai. Lengviausiai prisitaikantys klonai metastazuoja. Pagal kitą scenarijų, naviko ląstelės pasižymi skirtingu metaboliniu fenotipu dar evoliucijos pradžioje. Nors šis vidinis metabolinis heterogeniškumas gali būti nepastebimas ir nesuteikti pranašumo pirminiame navike, iš pakitusių ląstelių gali atsirasti klonai, sugebantys metastazuoti ir formuoti antrinius navikus naujoje aplinkoje (Fendt *et al.*, 2020).

Yra išskiriami du vėžinių ląstelių metabolinio perprogramavimo tipai: lankstumas (angl. *flexibility*), arba gebėjimas panaudoti skirtingas maisto medžiagas energijos gamybai, ir plastiškumas (angl. *plasticity*), arba tų pačių maisto medžiagų panaudojimas skirtinguose metaboliniuose keliuose (Grasmann *et al.*, 2021). Metabolinis lankstumas svarbus formuojantis pirminiam navikui, tačiau metastazėse jis dominuoja retai, joms būdingesnis metabolinis plastiškumas (Andrzejewski *et al.*, 2017, Dupuy *et al.*, 2015, Tasdogan *et al.*, 2020).

### 1.2.1. Metabolinis perprogramavimas ir ferroptozė

Ląstelių jautrumas ferroptozei glaudžiai susijęs su jų metabolizmu. Pagrindiniai metabolitai, valdantys ferroptozę, yra, žinoma, geležis, taip pat selenas, naudojamas kaip GPX4 kofaktorius, antioksidantai kofermentas Q ir vitaminas E (Qi *et al.*, 2021). Metabolinį perprogramavimą vėžinėse ląstelėse valdo SLC7A11. SLC7A11 yra cistino-glutamato antiporterinės sistemos xc<sup>-</sup> komponentas, atliekantis pernašos funkciją (kitas heterodimero subvienetas

SLC3A2 yra struktūrinis ir palaiko SLC7A11 stabilumą plazminėje membranoje) (Koppula *et al.*, 2021). Xc transporteriu į ląstelę įnešamas cistinas, naudojamas redokso homeostazei palaikyti ir kaip statybinė medžiaga. Svarbu paminėti, kad pernašos būdu į ląstelę patenka didžioji dalis jai reikalingo cisteino (redukuota cisteino forma), ir tik nedidelė dalis gali būti sintetinama iš metionino (Adelmann *et al.*, 2020).



**1.11 pav.** Du galimi naviko evoliucijos keliai. Pagal pirmąjį (kairėje), pirminio naviko heterogeniškumas didėja dėl aplinkos poveikio. Pagal antrąjį (dešinėje), pirminis navikas yra heterogeniškas evoliucijos pradžioje, o jos eigoje vyksta geriau prisitaikiusių ląstelių atranka. Abiem atvejais metastazuoja labiausiai evoliucionavę klonai.

Vėžinėse ląstelėse SLC7A11 kiekis neretai yra padidėjęs. Visgi, sklandžiam SLC7A11 veikimui ląstelės turi „paaukoti“ tam tikras medžiagas. Visų pirma, cisteino įnaša vyksta kartu su glutamato išnaša. Prarandama glutamato dalis svyruoja nuo 30 iki 50% viduląstelinio jo kiekio (Bannai ir Ishii, 1988). Be to, užląstelinėje erdvėje cistinas egzistuoja cisteino pavidalu. Cisteino redukcijai naudojamas NADPH. Intensyvus glutamato ir NADPH naudojimas sukelia SLC7A11 ekspresuojančių vėžinių ląstelių priklausomybę nuo kitų junginių – glutamino ir gliukozės.

**Metabolinė ląstelių priklausomybė nuo glutamino.** Į ląstelę per SLC1A5 ar kitus transporterius patekusį glutaminą glutaminazė verčia į glutamatą. Ląstelėje glutamatas naudojamas GSH sintezei arba metabolizuojamas į  $\alpha$ -ketoglutaratą ir dalyvauja trikarboksirūgščių cikle. Kadangi padidėjusį SLC7A11 kiekį ekspresuojančiose vėžinėse ląstelėse aktyviau vyksta glutamato išnaša, jose turi būti paspartinama glutamino įnaša bei padidintas glutaminazės aktyvumas. Taigi, tokios ląstelės tampa priklausomos nuo glutamino kiekio aplinkoje (angl. *glutamine addiction*) (Muir *et al.*, 2017, Timmerman *et al.*, 2013).

**Metabolinė ląstelių priklausomybė nuo gliukozės.** Kiek sunkiau paaiškinti, kaip SLC7A11 sukelia ląstelių priklausomybę nuo gliukozės, kadangi SLC7A11 nėra tiesiogiai susijęs su gliukozės metabolizmu. Kaip jau minėta, cistinas ląstelėje greitai redukuojamas iki cisteino, tam naudojamas NADPH. NADPH sintetinamas pentozų fosfato kelio metu, o šiam yra reikalinga gliukozė. Esant gliukozės trūkumui aplinkoje stabdoma NADPH sintezė, ląstelėje kaupiasi jai nuodingas cistinas bei ROS ir ląstelė žūsta. Tokiu būdu SLC7A11 paverčia vėžines ląsteles priklausomomis nuo gliukozės (angl. *glucose addiction*) (Liu *et al.*, 2020).

**SLC7A11 – taikyns priešvėžinėje terapijoje.** Pagrindiniai SLC7A11 slopinimui naudojami priešvėžiniai junginiai yra pirmos klasės feropozės induktoriai: erastinas ir jo analogai, sulfasalazinas, sorafenibas. Be to, akivaizdu, kad padidėjusiu SLC7A11 lygiu pasižyminčiose vėžinėse ląstelėse terapiniais taikyniais tampa glutamino ir gliukozės metabolizmo baltymai. Pavyzdžiui, glutamino priklausomybę išvysčiusios vėžinės ląstelės turėtų būti jautrios glutaminazių slopikliams. Nuo gliukozės priklausomų vėžinių ląstelių žūtis sukeliama slopinant gliukozės nešiklius GLUT (Koppula *et al.*, 2021).

Reikia paminėti, kad metabolinio perprogramavimo sukelti antioksidacinio atsako pokyčiai gali būti naudingi siekiant įveikti atsparumą tam tikriems chemoterapiniams preparatams, kurių pagrindinis veikimo mechanizmas nėra oksidacinio streso sukėlimas. Tai iliustruoja atsparumo cisplatinai pavyzdys. Šiam vaistui atspariose plaučių vėžio ląstelėse metabolinis perprogramavimas padidina ROS kiekį, taigi, ląstelės tampa priklausomos nuo deguonies metabolizmo (Cruz-Bermudez *et al.*, 2019). Didelis ROS kiekis padidina GSH poreikį, o glutamato įnašos slopinimas selektyviai sunaikina cisplatinai atsparias ląsteles. Glutamatas GSH sintezei gali būti sintetinamas iš glutamino, taigi, ląstelės kartu tampa priklausomos ir nuo glutamino kiekio aplinkoje (Wangpaichitr *et al.*, 2017).

### 1.2.2. Maisto medžiagų trūkumo sukėlimu pagrįsta priešvėžinė terapija (angl. *starvation-based anticancer therapy*)

Vėžinių ląstelių metabolinis perprogramavimas ir pastovus maisto medžiagų poreikis atveria galimybes naujai priešvėžinės terapijos rūšiai – maisto medžiagų trūkumo sukėlimu (badavimu) pagrįstai priešvėžinei terapijai (angl. *starvation-based anticancer therapy*). Ji turi dvi kryptis. Kadangi pagrindiniais metabolitais naviką aprūpina kraujagyslės, pirmoji kryptis siekia slopinti kraujagyslių formavimąsi arba suardyti jau esantį naviko kraujagyslių tinklą (Hollebecque *et al.*, 2012, Mukherjee ir Patra,

2016). Antroji strategija pagrįsta naviko mikroaplinkoje cirkuliuojančių maisto medžiagų suskaidymu arba jų pernašos į vėžines ląsteles blokavimu (Fu *et al.*, 2018, Selwan *et al.*, 2016). Siekiant padidinti terapinį efektyvumą, badavimu pagrįsta priešvėžinė terapija dažnai derinama su kitais priešvėžiniais metodais, tokiais kaip chemoterapija, fototerapija arba fotodinaminė terapija (Feng *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2017, X. Yang *et al.*, 2019). Atskiras potipis yra pseudobadavimo (angl. *pseudostarvation*) sukėlimas, kuomet standartinėmis sąlygomis augančios vėžinės ląstelės yra veikiamos junginiais, sukeliančiais jose badavimo iliuziją, pavyzdžiui, mTOR signalinio kelio slopikliais (Zhou ir Huang, 2012).

#### 1.2.2.1. Naviko kraujagyslių tinklą slopinančios/ardančios terapijos

Naujų kraujagyslių formavimasis iš jau esančių vadinamas angiogeneze (Jiang *et al.*, 2020). Angiogenezės slopinimu pagrįsta antiangiogeninė terapija. Paprastai joje naudojami junginiai, blokuojantys kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGF signalo perdavimą, tai – antikūnai prieš VEGF arba jo receptoriaus VEGFR slopikliai. Kai kurie yra patvirtinti FDA (angl. *Food and Drug Administration*, JAV) klinikiniam naudojimui (Meadows ir Hurwitz, 2012). Antiangiogeninė terapija sėkmingai slopina inkstų, skydliaukės, kiaušidžių, gimdos vėžio ir hepatoląstelinės karcinomos navikų augimą, tačiau kasos vėžiui gydyti nėra efektyvi (Lupo *et al.*, 2016). Visų pirma, ilgesnį laiką taikant šią terapiją paskatinama naviko hipoksija ir gaunamas priešingas efektas – padidinamas VEGF kiekis bei kraujagyslių formavimasis. Be to, blokuojant kraujo cirkuliaciją navike kartu slopinamas ir vaisto patekimas, vadinasi, mažėja chemoterapijos efektyvumas (Annese *et al.*, 2019). Taip pat žinoma, kad kasos navikai naudoja angiogenezės alternatyvas, pavyzdžiui, *vascular co-option*, kai maisto medžiagų patekimui „pasisavina“ aplinkinių organų kraujagysles, bei mimikriją (angl. *vasculogenic mimicry*), kai plastiškos vėžinės ląstelės imituoja kraujagyslių endotelio ląsteles (Li *et al.*, 2019).

Skirtingai nei antiangiogeninė terapija, kurios metu blokuojami endotelio ląstelių išgyvenimą valdantys signaliniai keliai, kraujagysles ardantys junginiai (angl. *Vascular Disrupting Agents*, VDA) staigiai sustabdo kraujo cirkuliaciją navike ir sukelia jo nekrozę (Cooney *et al.*, 2006). VDA suardo endotelio ląstelių citoskeletą (dažniausiai taikinytis būna tubulinas) arba tarpusavio jungtis, palaikomas integrinų. Stipriausiai VDA veikia didesnio tūrio navikus ir jų šerdyje esančias ląsteles, tačiau yra mažiau toksiški naviko periferijos ląstelėms, kurios maisto medžiagas gali perimti iš aplinkinių



audinių (Gridelli *et al.*, 2009). Neretai antiangiogeniai vaistai ir VDA derinami. Keletas VDA junginių pastaraisiais metais perėjo į klinikines tyrimų stadijas (Siemann *et al.*, 2017).

Kraujo cirkuliacija navike taip pat blokuojama panaudojant į naviką nutaikytus peptidus (angl. *Tumor-Homing Peptide*, THP). THP yra trumpas (dažniausiai iki 30 aminorūgščių ilgio) oligopeptidas, specifiskai sąveikaujantis su vėžinėmis ląstelėmis (Kondo *et al.*, 2021). Prie tokio peptido prijungus trombiną, galima „užkimšti“ naviko kraujagysles ir sukelti maisto medžiagų stygių navike (Li *et al.*, 2018).

#### 1.2.2.2. Metabolitų skaidymas arba pernašos į ląstelę slopinimas

Gliukozės oksidazė (GOx) katalizuoja gliukozės oksidaciją iki gliukono rūgšties ir vandenilio peroksido. Šioje reakcijoje ne tik sunaudojama gliukozė, bet ir didėja aplinkos rūgštingumas ir sukeliamas oksidacinis stresas, naviko ląstelių struktūrinės pažaidos ir jų žūtis (Yu *et al.*, 2019). Panaudojant nanomedžiagas, GOx gali būti specifiskai pernešama į naviką, viena arba kartu su tam tikrais priešvėžiniais vaistais, sustiprinančiais gydymo efektyvumą. Kadangi GOx katalizuojamoje reakcijoje susidaro ROS, perspektyvu GOx derinti su vaistais, kuriuos ROS aktyvina, pavyzdžiui, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jautriu doksorubicino analogu BDOX arba ROS aktyvinamu kamptotecino provaistu PCPTMA (Cheng *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2017). 450-490 nm bangos ilgio šviesa skatina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> virtimą hidroksiradikalu ·OH, kuris yra dar toksiškesnis vėžinėms ląstelėms nei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chang *et al.*, 2017). Be fototerapijos, GOx derinama ir su fotodinamine terapija (angl. *photodynamic therapy*, PDT). Prie nanodalelių prijungiama GOx, katalazė ir į naviką nukreipiantis peptidas. Tokioms dalelėms patekus į vėžines ląsteles, katalazė hidrolizuoja GOx reakcijoje susidariusį H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, susidaro deguonis. Ląsteles paveikus fotosensibilizatoriumi ir apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa, generuojamos ROS ir sukeliama ląstelių žūtis. Šis būdas idealus prieš hipoksinius navikus, kurie į PDT reaguoja silpnai (X. Yang *et al.*, 2019).

Naviką priversti „badauti“ galima ne tik tiesiogiai, skaidant maisto medžiagas jo mikroaplinkoje, bet ir slopinant metabolitų pasisavinimą. Slopinami gali būti gliukozės, aminorūgščių, acetato ir laktato nešikliai, mažo tankio lipoproteinų receptoriai, makropinosomų susidarymas, jų skaidymas lizosomose arba autofagija. Kitaip tariant, blokuojami bet kokie keliai, kuriais ląstelė gali būti aprūpinama maisto medžiagomis (Selwan *et al.*, 2016).

### 1.2.2.3. Pseudobadavimas

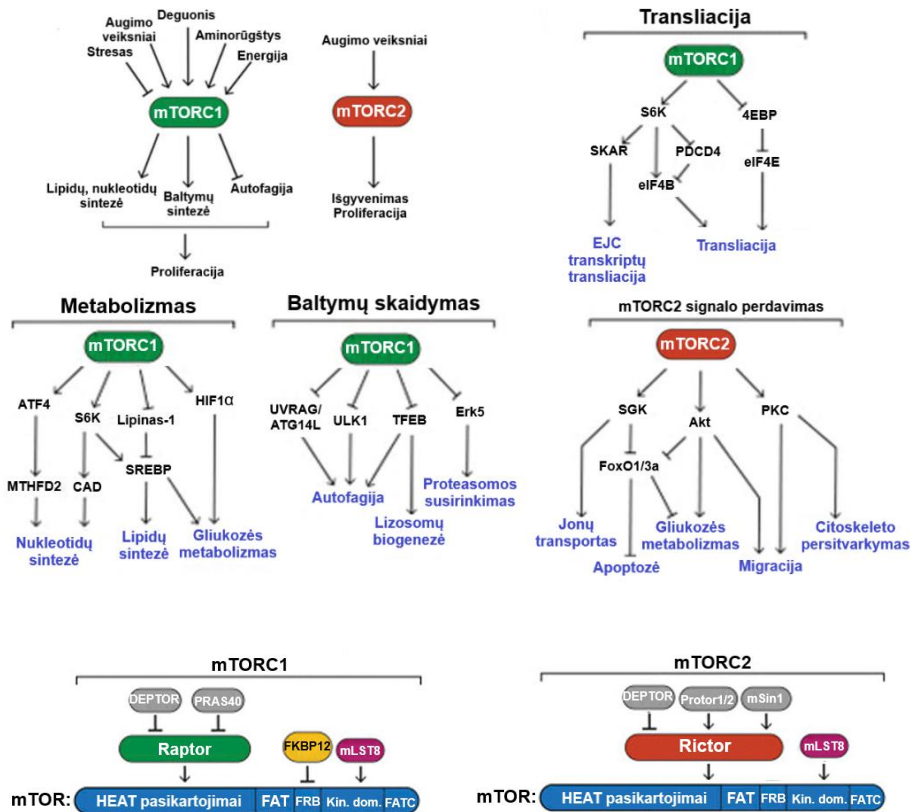
Pseudobadaujanti vėžinė ląstelė gauna signalus, kad jos aplinkoje trūksta maisto medžiagų, nors iš tiesų taip nėra. Patirdama mitybinį stresą, ląstelė pirmiausiai bando slopinti tuos procesus, kurie reikalauja daug energijos ir statybinų medžiagų. Vienas iš jų yra baltymų biosintezė (transliacija). Pagrindinis ląstelės energijos „sensorius“ šiuo atveju yra mTOR (1.12 pav.). Tai – serino/treonino kinazė, kuri konverguoja augimo veiksmų receptorių ir maisto medžiagų transporterių perduodamus signalus ir pagal juos aktyvina arba slopina tam tikrus procesus, tuo metu naudingus ląstelei. Jeigu maisto medžiagų yra pakankamai, mTOR skatina baltymų ir lipidų biosintezę bei slopina baltymų skaidymą. Trūkstant maisto medžiagų ar augimo veiksmų, mTOR kompleksai slopinami, todėl slopinama ir transliacija, o autofagija paskatinama. Taip ląstelė prisitaiko prie nepalankių augimo sąlygų mTOR įeina į dviejų baltyminių kompleksų sudėtį: mTORC1 ir mTORC2. mTORC1 pagrindiniai taikiniai yra transliaciją ir autofagiją reguliuojantys baltymai, o mTORC2 daugiausiai aktyvina augimo veiksmus (Saxton ir Sabatini, 2017).

Atsižvelgiant į mTOR funkciją, pseudobadavimo būseną ląstelėje galima sukelti slopinant mTOR kompleksus arba kitus mTOR signalinio kelio tarpininkus, dalyvaujančius streso atsake, pavyzdžiui, AMPK (O'Neill ir Hardie, 2013, Procaccini *et al.*, 2021). mTOR slopikliai būna kelių tipų. Pirmos kartos mTOR slopikliai yra rapamicinas ir jo analogai rapalogai, kurie slopina mTORC1 kompleksą netiesiogiai, jungdamiesi su jo sąveikos partneriu FKBP12. FKBP12 ir rapamicino ar rapalogų kompleksui prisijungus prie FRB domeno, blokuojama mTOR sąveika su substratais. Antros kartos mTOR slopikliai (AZD8055, INK128, OSI027) konkuruoja su ATP dėl prisijungimo mTOR kinazės aktyviajame centre. Trečios kartos mTOR slopiklis RapaLink-1 vienu metu sąveikauja su FKBP12 ir slopina mTOR katalizinį aktyvumą, todėl yra efektyvus išsivysčius atsparumui pirmos ir antros kartos slopikliams (J. Xie *et al.*, 2016).

### 1.3. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Feroptozė – neseniai atrasta nuo geležies priklausoma ląstelių žūtis, kuriai vykstant oksiduojami ląstelės membranos lipidai. Feroptozei vykti reikalingos trys sąlygos: ląstelės membranos fosfolipidų sudėtyje turi būti oksidacijai jautrių polinesočiųjų riebalų rūgščių, citozolyje turi pakakti oksidacijos-redukcijos reakcijose galinčios dalyvauti geležies, o GPX4, fermentas, apsaugantis ląsteles nuo lipidų oksidacijos, turi būti neveiklus.

Todėl feroptozės induktoriai paprastai tiesiogiai arba netiesiogiai slopina GPX4 aktyvumą arba mažina šio baltymo kiekį ląstelėje.



**1.12 pav.** Viršuje: mTORC1 ir mTORC2 valdomi procesai ir pagrindiniai signaliniai keliai. Apačioje: mTORC1 ir mTORC2 subvienetai ir sąveikos su mTOR vietas (Saxton ir Sabatini, 2017).

Kancerogenezės metu vėžinės ląstelės nuolatos patiria maisto medžiagų ir augimo veiksnių trūkumą, todėl prisitaikydamos gali atsisakyti vienu metabolitų, bet tapti priklausomomis nuo kitų. Tai gali keisti ląstelių jautrumą feroptozei. Be to, metabolinis perprogramavimas ir visuminis didelis maisto medžiagų poreikis atveria galimybes badavimu pagrįstoms priešvėžinėms terapijoms (angl. *starvation-based cancer therapies*). Jos pagrįstos maisto medžiagų patekimo į naviką slopinimu arba naviko mikroaplinkos metabolitų skaidymu. Badavimo pojūtį vėžinėse ląstelėse galima sukelti ir slopinant mTOR signalinį kelią, kuris yra pagrindinis aplinkos sąlygų „sensorius“. Tokia dar palyginus nedaug iširta ląstelių būseną vadinama pseudobadavimu.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

Medžiagos pirktos iš *Carl Roth*, jei neparašyta kitaip.

#### 2.1.1. Citotoksiniai preparatai ir slopikliai

Cisplatina (CisPt, 0,1-100  $\mu\text{M}$ ), pirktas iš *Accord*, ir oksaliplatina (OxaPt, 0,1-100  $\mu\text{M}$ ), pirktas iš *Fresenius Kabi*, laikoma +4°C. 5-fluoruracilas (5-FU, 0,1-100  $\mu\text{M}$ ) pirktas iš *Accord* ir laikomas kambario temperatūroje. Gemcitabino hidrochloridas (Gm, 0,1-100  $\mu\text{M}$ ) pirktas iš *Sigma* ir laikomas -20°C arba -80°C.

EGFR slopiklis afatinibas (Afa, 1  $\mu\text{M}$ ), FGFR slopiklis BGJ398 (BG, 1  $\mu\text{M}$ ), ferrotozės induktorių erastinas (Era, 0,4-20  $\mu\text{M}$ ), ferrotozės slopiklis ferostatinas (Ferr-1, 1  $\mu\text{M}$ ), mTORC1 ir mTORC2 slopiklis INK128 (INK, 0,125 nM), Src slopiklis saracatinibas (Sar, 2  $\mu\text{M}$ ), ERK slopiklis SCH772984 (SCH, 1  $\mu\text{M}$ ), Raf-1 ir B-Raf slopiklis sorafenibas (Sor, 1  $\mu\text{M}$ ), YAP antagonistas Super-TDU (TDU, 0,2  $\mu\text{M}$ ), FAK slopiklis PF573228 (PF, 2  $\mu\text{M}$ ), GSK-3 slopiklis tideglusibas (TDG, 5  $\mu\text{M}$ ), IKK kinazės slopiklis TPCA-1 (TPCA, 5  $\mu\text{M}$ ), MST 1/2 slopiklis XMU-MP-1 (XMU, 5  $\mu\text{M}$ ) pirkti iš *Selleck Chemicals*. Akt slopiklis VIII (VIII, 1 nM), c-Raf slopiklis GW5074 (GW, 1  $\mu\text{M}$ ), ULK-1 slopiklis SBI-0206965 (SBI, 1  $\mu\text{M}$ ), JNK slopiklis SP600125 (SP6, 5  $\mu\text{M}$ ), tankirazių slopiklis XAV939 (XAV, 5  $\mu\text{M}$ ) pirkti iš *Sigma*. mTORC1 slopiklis rapamicinas (Rap, 0,25 nM) pirktas iš *Santa Cruz Biotechnology*. Kaspazių slopiklis Z-VAD-FMK (ZVAD, 1  $\mu\text{M}$ ) pirktas iš *R&D Systems*. RIPK1 slopiklis nekrostatinas-1 (Nec-1, 1  $\mu\text{M}$ ) pirktas iš *Alfa Aesar*. Slopikliai ištirpinti DMSO ir laikomi -20°C.

Citotoksiniai preparatai ir slopikliai iki reikiamos koncentracijos skiedžiami ląstelių augimo terpe be priedų prieš pat naudojimą. Eksperimentuose, kuriuose buvo naudoti DMSO tirpinti junginiai, kontrolinės (vaistais neveiktos) ląstelės buvo veikiamos atitinkamu tūriu DMSO.

#### 2.1.2. Rekombinantiniai baltymai

IGF, EGF ir bFGF (100 ng/ml) pirkti iš *Invitrogen*, tirpinti pagal gamintojo rekomendacijas ir laikomi -20°C.

### 2.1.3. Ląstelių linijos

Darbe naudotos šios žmogaus kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijos:

**Miapaca2**, išvesta A. Yunis *et al.* 1977 m. iš pirminio kasos naviko (Yunis *et al.*, 1977). Turimos mutacijos: *KRAS* (p.Gly12Cys), *TP53* (p.Arg248Trp), *CDKN2A* (delecija).

**Panc-1**, išvesta M. Lieber *et al.* 1975 m. iš pirminio kasos naviko (Lieber *et al.*, 1975). Turimos mutacijos: *KRAS* (p.Gly12Asp), *TP53* (p.Arg273His), *CDKN2A* (delecija).

**Su.86.86**, išvesta B. J. Drucker 1988 m. iš kasos vėžio metastazių kepenyse (Drucker *et al.*, 1988). Turimos mutacijos: *KRAS* (p.Gly12Asp), *TP53* (p.Gly245Ser).

**T3M4**, išvesta T. Okabe *et al.* 1983 m. iš kasos vėžio metastazių limfmazgiuose (Okabe *et al.*, 1983). Turimos mutacijos: *KRAS* (p.Gln61His), *TP53* (p.Tyr220Cys).

**Capan-26**, išvesta 2021 m. iš kasos vėžio pirminio naviko (Zalyte *et al.*, 2021). Turimos mutacijos: *KRAS* (trečiojo egzono delecija), *TP53* (p.Val172Phe).

Miapaca2 ląsteles padovanojo dr. V. Karabanovas (Nacionalinis vėžio institutas, Biomedicininės fizikos laboratorija), o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių linijos yra dr. A. Kanopkos (Biotechnologijos institutas, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyrius) dovana.

### 2.1.4. Tirpalai ir kitos medžiagos *Western Blot* analizei

EB++ buferis: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM Tris bazės, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% tritono X-100, 5 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (*Sigma*), išskaitinto 100°C temperatūroje 5 min, 1 mM PMSF; pH 7,2-7,4;

3X pavyzdžio buferis: 188 mM Tris-HCl/NDS, pH 6,8, 30% glicerolio, 12% NDS, 6% 2-merkaptetanolio, 0,01% bromfenolio mėlynojo;

N<sup>7</sup>-tetrametiletildiaminas (TEMED);

Amonio peroksosulfatas (10%) (*Sigma*);

Akrilamidas/bisakrilamidas: 30% akrilamido, 0,8% bisakrilamido;

4x Tris-NDS: 1,5 M Tris-HCl, 0,4% NDS, pH 8,8;

4x Tris-NDS: 0,5 M Tris-HCl, 0,4% NDS, pH 6,8;

Elektroforezės buferis: 25 mM Tris bazės, 192 mM glicino, 0,1% NDS, pH 8,3;

Baltymų molekulinės masės standartas Pierce<sup>TM</sup> Prestained Protein MW Marker (26612) (*Thermo Fisher Scientific*);  
Pernašos buferis: 25 mM Tris bazės, 192 mM glicino, 0,1% NDS, 20% metanolio (*Sigma*);  
Blokavimo (Blott'o) buferis: 1% pieno miltelių, 0,05% Tween-20, 0,02% NaN<sub>3</sub> Western Rinse buferyje (154 mM NaCl, 8 mM Tris-HCl, 2 mM Tris-bazės);  
PBS-T: PBS su 0,1% Tween-20.

## 2.1.5. Darbo su bakterijomis reagentai

Ampicilino natrio druska (*Sigma Aldrich*);  
LB terpė (10 g/l triptono (*Oxoid*), 5 g/l mielių ekstrakto (*Oxoid*), 10 g/l NaCl, pH 7,0);  
Agarizuota LB terpė (LB terpė su 1,5% agaru (*Oxoid*), Gliukozė (*Sigma Aldrich*);  
Restrikcijos endonukleazės restrikcinei analizei: BglII, EcoRI, XhoI (*Thermo Fisher Scientific*);  
TBE buferis: 0,13 M Tris-bazės (pH 7,6), 45 mM boro rūgšties, 2,5 mM EDTA;  
Etidžio bromidas (*Invitrogen*);  
Mėginių užnešimo dažas 6x MassRuler Loading Dye Solution (*Thermo Fisher Scientific*);  
DNR molekulinės masės standartas GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix, (SM0333) (*Thermo Fisher Scientific*);  
Agarozė TopVision (*Thermo Fisher Scientific*).

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Ląstelių kultivavimas

Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 linijų ląstelės kultivuojamos DMEM (*Gibco*) terpėje, o Capan-26 – IMDM (*Gibco*) terpėje su 10% FBS ir penicilinu/streptomicinu (*Gibco*). Persėjimui ląstelės praplaunamos PBS tirpalu ir atkeliamos nuo augimo paviršiaus 0,25% tripsino/EDTA tirpalu (*Gibco*). Jeigu nenurodyta kitaip, eksperimentams naudoti šie ląstelių sėjimo tankiai: Miapaca2 – 80 000 ląst./ml, Panc-1 ir Su.86.86 – 70 000 ląst./ml, T3M4 – 90 000 ląst./ml. Capan-26 ląstelės eksperimentams skiedžiamos 3-4 kartus. Ląstelių sėjimo tankiai pasirinkti taip, kad poveikio ir matavimo dieną

ląstelės būtų eksponentinėje augimo fazėje. Ląstelės auginamos 37°C temperatūroje ir 5% CO<sub>2</sub> bei 95% drėgmės atmosferoje.

Aminorūgščių badui sukelti ląstelės kultivuojamos DMEM terpėje, neturinčioje L-glutamino, L-lizino ir L-arginino (*Gibco*), papildytoje penicilinu/streptomycinu (*Gibco*).

## 2.2.2. Ląstelių gyvybingumo testai

### 2.2.2.1. MTT metodas

Metodas pagrįstas MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio bromido) redukcija iki violetinės spalvos produkto 1-(4,5-dimetiltiazol)-3,5-difenilformazano. Nuo ląstelių nusiurbus terpę, užpilama 0,5 mg/ml MTT tirpalo, inkubuojama 1 val. 37°C temperatūroje. Nusiurbus MTT tirpalą, dėl gyvybingų ląstelių oksidoreduktazių veiklos susidaręs violetinės spalvos dažas ekstrahuojamas DMSO ir spektrofotometru Varioskan Flash (*Thermo Fisher Scientific*) matuojama sugertis, esant 560 nm bangos ilgiui.

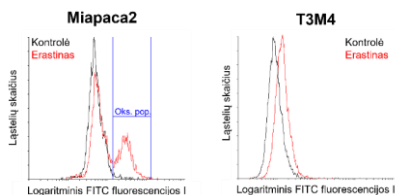
### 2.2.2.2. Ląstelių dažymas propidžio jodidu

Metodas parentas skirtingu raudonai fluorescuojančio dažo propidžio jodido patekimu į gyvas ir žuvusias ląsteles. Surinktos iš terpės ir atkeltos nuo augimo pagrindo ląstelės nucentrifuguojamos 600×g 3 min, suspenduojamos PBS, nudažomos propidžio jodidu (0,5 µg/ml, 5-10 min, kambario temperatūroje) ir analizuojamos tėkmės citometru Guava easyCyte 8HT (*Merck-Millipore*). Propidžio jodidas patenka tik į kiaurą membraną turinčias ląsteles, taip atskiriamos gyvų ir žuvusių ląstelių populiacijos. Kai kuriuose eksperimentuose kartu vertinta ir apoptuojančių ląstelių populiacijos dalis, turinti aktyvią kaspazę 3/7. Tuomet eksperimento pradžioje ląstelės papildomai dažytos žaliai fluorescuojančiu CellEvent Caspase-3/7 Green Detection reagentu (0,5 µM, 30 min, 37°C) (*Invitrogen*). Duomenų analizė atlikta naudojant Flowing Software 2.5.1 (Turku universitetas) programinę įrangą.

### 2.2.3. Oksiduotų lipidų nustatymas tėkmės citometrijos metodu

Oksiduotų lipidų kiekiui įvertinti ląstelės 30 min 37 °C temperatūroje dažomos 0,5 µM C11 BODIPY 581/591 fluorescencinio dažo (*Invitrogen*), atkeliamos nuo augimo pagrindo 0,25% tripsino/EDTA tirpalu ir

centrifuguojamos  $600\times g$ , 3 min. Ląstelių nuosėdos suspenduojamos PBS ir analizuojamos tėkmės citometru Guava easyCyte 8HT (*Merck-Millipore*). C11 BODIPY 581/591 lipidų sensorius lokalizuojasi ląstelės plazminėje membranoje. Oksiduojantis membranos lipidams, junginys pereina iš redukuotos į oksiduotą formą, o jo fluorescencija keičiasi iš raudonos į žalią. Žalios fluorescencijos (FITC) intensyvumo didėjimas registruojamas tėkmės citometru. Duomenų analizė atlikta naudojant Flowing Software 2.5.1 (Turku universitetas) programinę įrangą. Kadangi po erastino poveikio Miapaca2 ir Panc-1 ląstelių populiacijose buvo oksiduotos tik dalies ląstelių membranos, kiekybiškai vertinant tėkmės citometrijos rezultatus procentaliai įvertinta oksiduotos ląstelių populiacijos dalis. Su.86.86, T3M4 ir Capan-26 ląstelių populiacija neišsiskaidė į stipriau ir silpniau oksiduotą, todėl šiuo atveju buvo vertintas bendras fluorescencijos intensyvumo padidėjimas (2.1 pav.).



**2.1 pav.** Miapaca2 ir T3M4 ląstelių tėkmės citometrijos histogramų pavyzdžiai. FITC, fluoresceino izotiocianatas; I, intensyvumas; Oks. pop. – stipriau oksiduota ląstelių populiacija.

#### 2.2.4. Redukuoto glutationo (GSH) kiekio nustatymas

GSH kiekio nustatymui ląstelėse naudojamas Ellman'o reagentas DTNB (5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoinė rūgštis) (*Sigma*). GSH reaguojant su DTNB susidaro geltonos spalvos produktas. Atkeltos nuo augimo pagrindo ląstelės centrifuguojamos  $400\times g$  4 min ir suspenduojamos PBS. 10  $\mu$ l suspensijos paimama ląstelių skaičiavimui tėkmės citometru. Likusios ląstelės nusodinamos centrifuguojant ir suspenduojamos 20  $\mu$ l darbinio buferio (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Baltymų nusodinimui į tirpalą pridedama 20  $\mu$ l 5% trichloracto rūgšties, mėgintuvėliai inkubuojami ant ledo 15 min. Rūgštis neutralizuojama 5  $\mu$ l Tris bazės (2 M). Mėginiai centrifuguojami  $12\ 000\times g$  5 min. Supernatantas dažomas 1,5 mM DTNB ir spektrofotometru Varioskan Flash (*Thermo Fisher Scientific*) matuojama sugertis, esant 412 nm bangos ilgiui. GSH kiekis apskaičiuojamas pagal gryno GSH kalibracinę kreivę ir normuojamas pagal pradiniam mėginyje buvusių ląstelių skaičių.



## 2.2.5. Genų raiškos RNR lygmeniu tyrimas

Genų raiškos tyrimui RNR skiriama naudojant rinkinį GeneJET RNA Purification Kit (*Thermo Fisher Scientific*), vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Išskirtos RNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometru NanoDrop (*Implen*) matuojant sugertį, esant 260 ir 280 nm bangos ilgiui. kDNR sintezei naudojamas rinkinys RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*). kDNR sintetinama termocikleryje Mastercycler Eppendorf (*Eppendorf*) naudojant atsitiktinius heksamerinius pradmenis ir vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. Kiekybinė PGR vykdoma 96 šulinėlių plokštelėse (*Thermo Fisher Scientific*) aparatu MasterCycler RealPlex4 RT-PCR system (*Eppendorf*). Vienai 10 μl tūrio PGR reakcijai naudotas kDNR kiekis, susintetintas iš 50 ng RNR, 2 μM atitinkamų pradmenų mišinio (2.1 lentelė) ir reikiamas tūris fluorescuojančio reagento Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*). PGR sąlygos: 2 min 50°C, 10 min 95°C; 15 s 95°C, 30 s 60°C, 30 s 72°C, kartojama 40 kartų; 15 s 95°C, 15 s 60°C, 15 s 95°C.

### 2.1 lentelė. Kiekybinei PGR naudoti pradmenys.

Genas	Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo
<i>OCT2</i>	5'-AATCTCTACCCGCCTCCCTT-3'	5'-CACAGAGCTGCTCGTGAACCAGT-3'
<i>OCT4</i>	5'-CCTCCTGAGTAGCTGGGATT-3'	5'-GCTGAATACCTTCCCAAATAGAA-3'
<i>ZEB1</i>	5'-CGCAATAACGCTGTTTAAGG-3'	5'-GTGCAGGAGGGACCTCTTTA-3'
<i>NANOG</i>	5'-CAGCTACAAACAGGTGAAGACC-3'	5'-CATCCCTGGTGGTAGGAAGA-3'
<i>TBP</i>	5'-CCACTCACAGACTCTACAAC-3'	5'-CTGCGGTACAATCCCAGAACT-3'

Tiriamų genų raiška normuojama pagal atskaitos geno *TBP* raišką. Genų raiškos pokyčiai vertinami  $\Delta\Delta C_T$  metodu. Santykinis transkripto kiekis, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, apskaičiuojamas pagal formulę

$$2^{-((C_T(\text{tiriamo geno}) - C_T(\text{atskaitos geno}))_{\text{Poveikis}} - (C_T(\text{tiriamo geno}) - C_T(\text{atskaitos geno}))_{\text{Kontrolė}})}$$

Čia  $C_T$  – ciklas, kuriame amplifikacijos kreivė kerta slenkstinę vertę (kai reakcijos metu registruojama fluorescencija viršija foninę fluorescenciją).

## 2.2.6. Western Blot analizė

Ląstelės 2 kartus praplaunamos kambario temperatūros PBS ir lizuojamos šaltu EB++ buferiu. Lizatas centrifuguojamas 20 000×g 15 min 4°C, supernatantas sumaišomas su 3x pavyzdžio buferiu ir iškaitinamas 100°C temperatūroje 3 min.

Baltymai frakcionuojami 12% NDS poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis baltymų elektroforezės aparate SE400 (*Pharmacia Biotech*). Skirstomojo ir koncentruojamojo gelių sudėtis pateikta 2.2 lentelėje. Elektroforezė vykdoma 16-20 val., esant 4-6 mA srovės stiprumui.

### 2.2 lentelė. Baltymų elektroforezės gelių sudėtis.

Skirstomasis gelis	
Akrlamidas/bisakrlamidas	9 ml
Tris-NDS, pH 8,8	5,6 ml
dH <sub>2</sub> O	7,9 ml
10% amonio peroksosulfatas	225 µl
TEMED	35 µl
Koncentruojamasis gelis	
Akrlamidas/bisakrlamidas	0,97 ml
Tris-NDS, pH 6,8	1,9 ml
dH <sub>2</sub> O	4,6 ml
10% amonio peroksosulfatas	75 µl
TEMED	15 µl

Baltymai pernešami ant PVDF (*Bio-Rad*) arba nitroceliuliozinės (*Amersham*) membranos, naudojant pusiau sausos pernašos aparatą TE 77 PWR (*Amersham*). Pernešimas vykdomas 1 val., esant 0,8 mA/cm<sup>2</sup> membranos ploto nuolatinei srovei. Po pernašos membrana 45 min blokuojama Blott'o buferiu, 1,5 val. inkubuojama su pirminiu antikūnu, 4 kartus plaunama PBS-T buferiu, 30 min inkubuojama su antriniu antikūnu, vėl 4 kartus plaunama PBS-T buferiu, 2 kartus plaunama PBS ir skanuojama skaneriu Odyssey® Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*). Santykinis baltymų kiekis įvertinamas densitometriškai, naudojant ImageJ 1.52v (*National Institutes of Health, JAV*) programą. Baltymų kiekio pokytis apskaičiuojamas normalizuotą pagal atskaitos baltymą GAPDH mėginio baltymo juostelės tankį dalinant iš normalizuoto kontrolės baltymo juostelės tankio.

### 2.3 lentelė. Western blot analizei naudotų antikūnų informacija.

Taikinys	Antikūnas	Skiedimas
Vimentinas	550513, <i>BD Pharmingen</i>	1:2000

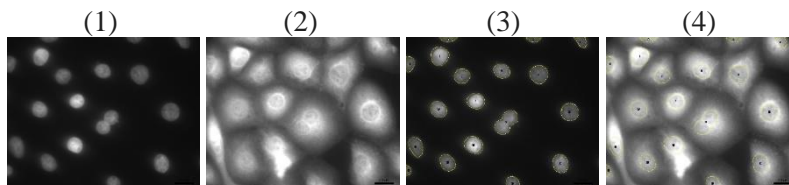
YAPI	63.7, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:500
Citokeratinas 5/6/18	0.N.345, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:1000
p-Akt S473	D9E, <i>Cell Signaling technology</i>	1:1000
GAPDH	6C5, <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:1000
$\alpha$ -tubulinas	T5168, <i>Sigma</i>	1:2000
Pelės pirminiai antikūnai	926-32210, IRDye® 800CW, <i>LI-COR Biosciences</i>	1:10 000
Triušio pirminiai antikūnai	926-68071, IRDye® 680RD, <i>LI-COR Biosciences</i>	1:10 000

## 2.2.7. Fluorescencinė/konfokalinė mikroskopija

Imunofluorescencijos eksperimentams ląstelės sėjamos 24 šulinėlių plokštelėje ant dengiamųjų stikliukų. Eksperimento dieną ląstelės praplaunamos PBS ir 15 min fiksuojamos 4% paraformaldehido tirpalu. Po to ląstelės 3 kartus po 2 min plaunamos 1% jaučio serumo albumino (angl. *bovine serum albumin*, BSA) tirpalu. Ląstelių membrana suardoma 15 min inkubuojant su 0,2% tritono X-100. Po analogiško anksčiau aprašytam plovimo preparatai 30 min blokuojami 1% BSA. Ant 24 šulinėlių plokštelės dangtelio išstempama parafilmo juostelė, dedami 20  $\mu$ l pirminio antikūno lašai ir ant jų ląstelėmis žemyn uždedami stikliukai. Dangtelis įstatomas į vandens vonelę ir laikomas 37°C temperatūroje 1 val. Tuomet stikliukai perkeliama atgal į 24 šulinėlių plokštelę ir 5 kartus plaunami 1% BSA. Analogiškai preparatai 30 min inkubuojami su antriniu antikūnu ir vėl 5 kartus praplaunami 1% BSA. Ląstelių branduoliai dažomi DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo) tirpalu (2  $\mu$ g/ml, *Invitrogen*). Porą kartų mėginius praplovus PBS, preparatai uždedami ant objektinių stikliukų, padengtų Prolong Gold Antifade dengimo terpe (*Molecular Probes, Invitrogen*) ir per naktį laikomi tamsoje, kambario temperatūroje. Ilgesniam saugojimui preparatai perkeliama į +4°C. Mėginiai analizuojami konfokaliniu mikroskopu Eclipse TE-2000-S (*Nicon Corporation*). Mikroskopijos vaizdai apdorojami naudojant Imaris 9.6.0 (*Bitplane, Oxford Instruments*) programinę įrangą.

ERK1/2 fluorescencijos intensyvumo kiekybiniam vertinimui (2.2 pav.) fiksuojama DAPI (mėlynas kanalas) ir ERK1/2 (raudonas kanalas) fluorescencija. Gaunami atitinkamai (1) ir (2) vaizdai. Tuomet ImageJ 1.52v (*National Institutes of Health, JAV*) programa pažymimos branduolių vietos (3). Žymės perklojamos ant (2) vaizdo, gaunant (4) vaizdą. ERK1/2 fluorescencijos intensyvumas ląstelių branduoliuose vertinamas pagal formulę:

ERK1/2 fluorescencijos intensyvumas branduolyje (angl. *Corrected total fluorescence of ERK1/2*) = Integruotas tankis branduolio plote (angl. *Integrated density in the area*) – branduolio plotas (angl. *area of the selection*)



2.2 pav. ERK1/2 fluorescencijos intensyvumo kiekybiniam vertinimui naudotų vaizdų pavyzdžiai.

Imunofluorescencinei analizei naudotų antikūnų informacija pateikta 2.4 lentelėje.

#### 2.4 lentelė. Imunofluorescencinei analizei naudotų antikūnų informacija.

Taikinys	Antikūnas	Skiedimas
CEACAM6	9A6, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:400
CA19-9	116-NS-19-9, <i>Invitrogen</i>	1:50
CD44	8E2, <i>Cell Signaling Technology</i>	1:100
Ki-67	MIB-1, <i>Agilent</i>	1:100
E-kadherinas	ECCD-2, <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:400
Citokeratinas 5/6/18	0.N.345, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:25
Vimentinas	550513, <i>BD Pharmingen</i>	1:200
ERK1/2	Pagamintas Proteomikos centre	1:100
p-JNK	pTPpY, <i>Promega</i>	1:400
Pelės pirminiai antikūnai	Alexa Fluor™ 488 Goat anti-Mouse (H+L), <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:250
Pelės pirminiai antikūnai	Alexa Fluor™ 594 Goat anti-Mouse (H+L), <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:250
Triušio pirminiai antikūnai	Alexa Fluor™ 594 Goat anti-Rabbit (H+L), <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:250
Žiurkės pirminiai antikūnai	Alexa Fluor™ 594 Goat anti-Rat (H+L), <i>Thermo Fisher Scientific</i>	1:250

Oksiduotų membranos lipidų detekcijai mikroskopijos metodu ant dengiamųjų stikliukų užsėtos Capan-26 ląstelės dažomos 10  $\mu$ M C11 BODIPY 581/591 reagento (30 min, 37°C). Mėginius praplovus PBS, preparatai uždedami ant objektinių stikliukų, padengtų Prolong Gold Antifade dengimo terpe (*Molecular Probes, Invitrogen*) ir iškart analizuojami konfokaliniu mikroskopu Eclipse TE-2000-S (*Nicon Corporation*). Mikroskopijos vaizdai apdorojami naudojant Imaris 9.6.0 (*Bitplane, Oxford Instruments*) programinę įrangą.

Capan-26 ląstelių, esančių S ciklo fazėje, detekcijai naudotas rinkinys Click-iT Edu Cell Proliferation Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Ląstelės dažytos 10  $\mu$ M Edu 2 val. 37°C temperatūroje, po to preparatai imunofluorescencijai ruošti kaip aprašyta anksčiau. S fazėje esančios ląstelės į DNR įjungia modifikuotą timidino analogą Edu, kurio fluorescencija detekuojama konfokaliu mikroskopu Eclipse TE-2000-S (*Nicon Corporation*). Mikroskopijos vaizdai apdoroti naudojant Imaris 9.6.0 (*Bitplane, Oxford Instruments*) programinę įrangą.

#### 2.2.8. „Žaizdos gijimo“ testas

Metodas naudojamas ląstelių judrumui įvertinti. Ląstelių judrumas įvertinamas pagal tai, kokią monosluoksnyje padarytos „žaizdos“ dalį jos spėjo padengti per tam tikrą laiką. „Žaizdos gijimo“ testui ląstelės sėjamos 24 šulinėlių plokštelėje. Vienoje tiriamoje grupėje susiformavęs ląstelių monosluoksnis perrėžiamas steriliu 20  $\mu$ l pipetės antgaliu, praplaunamas PBS ir užpilama terpė be FBS. Kitoje grupėje ląstelės kultivuojamos be FBS 4 dienas ir tada padaroma „žaida“. Abiem atvejais mikroskopu Eclipse TE-2000-S (*Nicon Corporation*) užfiksuojamas „žaizdos“ vaizdas praėjus 0 ir 48 val. po monosluoksnių įbrėžimo. „Žaizdos gijimas“ kiekybiškai vertinamas ImageJ 1.52v programos papildiniu MRI Wound Healing Tool (*National Institutes of Health, JAV*).

#### 2.2.9. Capan-26 linijos išvedimas ir charakterizavimas

##### 2.2.9.1. Linijos išvedimas

Capan-26 linija buvo išvesta iš 65 metų lietuvių kilmės pacientės naviko pooperacinės medžiagos. Linija buvo išvesta eksplanto metodu (Ruckert *et al.*, 2012). Pacientei diagnozuota kasos duktalinė adenokarcinoma (T2N0M0 stadija, G3 diferenciacijos laipsnis). Anksčiau pacientė nėra turėjusi susirgimų, galėjusių turėti įtakos kasos vėžio atsiradimui. Po operacijos pacientei buvo taikoma adjuvantinė FOLFIRINOX chemoterapija. Praėjus 3 metams po operacijos vėžinis susirgimas neatsinaujino, pacientės būklė yra stabili. Pacientė perskaitė ir pasirašė sutikimą dalyvauti tyrime. Sutikimą patvirtino Vilniaus regioninis Biomedicininis tyrimų etikos komitetas, protokolo numeris PancCa001-3.

Linijos išvedimui naviko audinys buvo tris kartus praplautas PBS ir homogenizuotas pipetuoju. Audinio fragmentai buvo perkelti į plastikinę

lėkštelę su IMDM terpe (*Gibco*), 15% FBS (*Gibco*) ir penicilino/streptomicino mišiniu (*Gibco*). Praėjus dviems dienoms, lėkštelėje buvo pastebėtos epitelinių ląstelių salelės. Toliau augimo terpė buvo keičiama kas 3 dienas, o ląstelės kultivuotos pagal standartinį protokolą. Po pusės metų FBS koncentracija terpėje sumažinta iki 10%. Ankstyvų pasažų ląstelės buvo užšaldytos DMEM terpėje su 25% FBS ir 8% DMSO, po atšildymo ląstelės sėkmingai atsigauna ir pradeda dalintis. *In vitro* sistemoje ląstelės buvo persėtos daugiau nei 80 kartų. Dėl morfologinio panašumo su pastoviomis (kataloginėmis) linijomis Capan-1 ir Capan-2 naujai išvesta linija buvo pavadinta Capan-26 (*Cancer Pancreatic*, 26 buvo mėginio/bandymo numeris).

#### 2.2.9.2. Ląstelių augimo greičio nustatymas

Ciklo trukmės nustatymui Capan-26 ląstelės buvo sėjamos į 48 šulinėlių plokštelę. 5 dienas iš eilės 24 val. intervalais gyvos (prikibusios prie augimo pagrindo) ląstelės buvo surenkamos ir skaičiuojamos tėkmės citometru Guava easyCyte 8HT (*Merck-Millipore*). Ląstelių augimo greitis buvo apskaičiuotas pagal formulę  $v = \lg N / \lg N_0 / \lg 2 \cdot 120$ , kur dalijimosi trukmė =  $1/v$ , N – ląstelių skaičius 5-ąją dieną,  $N_0$  – ląstelių skaičius 1-ąją dieną.

#### 2.2.9.3. Minkštojo agarų metodas

Metodas pagrįstas vėžinių ląstelių gebėjimu formuoti kolonijas nesąveikaujant su augimo pagrindu. 6 šulinėlių plokštelės šulinėlis buvo padengtas 0,5% TopVision Low Melting Point agaraze (*Thermo Fisher Scientific*) IMDM terpėje. 5000 Capan-26 ląstelių suspenduota 0,3% agarozės tirpale IMDM terpėje, turinčioje 1% insulino-transferino-seleno (ITS, *Life Technologies*), ir užpilta ant sustingusio apatinio agarozės sluoksnio. Po dviejų savaitų susiformavusios kolonijos dažytos MTT dažu ir skaičiuotos. Kolonijų formavimo efektyvumas išreikštas kaip kolonijų ir užsėtų ląstelių skaičiaus santykis.

#### 2.2.9.4. Mutacijų analizė

Capan-26 ląstelėse buvo analizuotas pilno ilgio *KRAS* genas ir *TP53* geno 5-9 egzono seka, koduojanti baltymo sąveikos su DNR domeną. Pirmiausiai vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis iš ląstelių buvo išskirta RNR, tam naudotas rinkinys GeneJET RNA Purification Kit (*Thermo Fisher Scientific*). Išskirtos RNR kiekis ir grynumas nustatytas spektrofotometru NanoDrop

(*Implen*) matuojant sugertį, esant 260 ir 280 nm bangos ilgiui. kDNR sintezei naudotas rinkinys RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*). kDNR sintetinta termocikleryje Mastercycler Eppendorf (*Eppendorf*) naudojant atsitiktinius heksamerinius pradmenis ir vadovaujantis gamintojo rekomendacijomis. kDNR buvo padauginta naudojant Phusion™ High-Fidelity DNR polimerazę (2 U/μL), 5x Phusion HF buferį, 200 μM dNTP (*Thermo Fisher Scientific*) ir po 0,5 μM pradmenų, kurių sekos pateiktos 2.5 lentelėje. PGR sąlygos parinktos pagal gamintojo rekomendacijas. Analitinės elektroforezės metu neaptikus nespecifinių produktų, PGR fragmentas įklonuotas į pJET1.2 vektorių, tam naudotas CloneJET PCR Cloning Kit rinkinys (*Thermo Fisher Scientific*). Plazmidė transformacijos būdu (Chung ir Miller, 1993) perkelta į *E. Coli* DH5α kamieną. Pavienės bakterijų kolonijos padaugintos skystoje LB terpėje, iš dalies biomasės klasikiniu chloroformo ekstrakcijos metodu išskirtos plazmidės ir atlikta jų restrikcinė analizė. Plazmidės, į kurias sėkmingai įsistatė tikslinis fragmentas, iš likusios bakterijų biomasės grynintos sekvenavimui. Tam naudotas QIAquick Gel Extraction Kit rinkinys (*Qiagen*). Spektrofotometru nustačius išskirtos plazmidinės DNR koncentraciją ir analitinės elektroforezės metu patvirtinus grynumą, produktai siųsti sekvenuoti į Macrogen sekvenavimo įmonę (Seulas, Korėjos Respublika). Sekvenavimo rezultatai analizuoti naudojant internetinę bioinformatinę platformą Benchling (<https://benchling.com>).

**2.5 lentelė.** Pradmenų, naudotų sekvenavimo mėginių ruošimui, sekos.

Genas	Tiesioginis pradmuo	Atvirkštinis pradmuo
<i>KRAS</i>	5'- ATGACTGAATATAAACTGTGGTAGTT GGA-3'	5'- GGTAAAAGCTAACAGTCTGCATG GAG-3'
<i>TP53</i>	5'-ATGGAGGAGCCGAGTCAGAT-3'	5'-CTCACGCCACGGATCTGAAG-3'

#### 2.2.9.5. Kariotipavimas

Chromosomų aberacijos tirtos kaip aprašyta anksčiau (Kundrotas *et al.*, 2016).

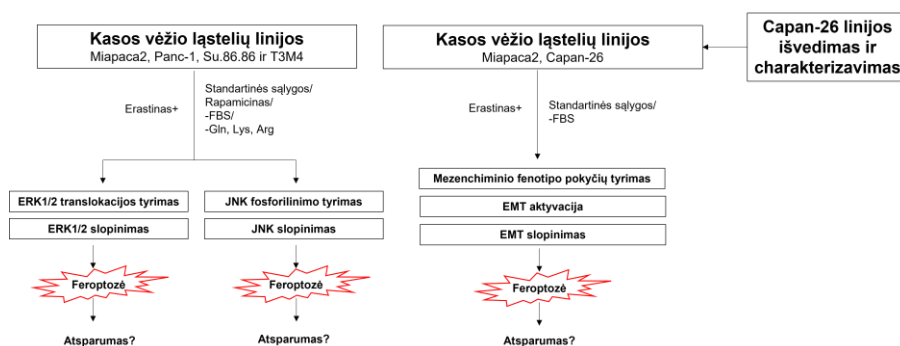
Kiti Capan-26 ląstelių linijos charakterizavimui naudoti metodai (imunofluorescencija, kiekybinė PGR, ląstelių gyvybingumo testai) aprašyti ankstesniuose metodų dalies skyriuose.

## 2.2.10. Rezultatų statistinė analizė

Grafikuose pateikiami matavimų vidurkiai  $\pm$  standartinis nuokrypis (SN), gauti iš  $\geq 3$  nepriklausomų biologinių eksperimentų, kiekvienam eksperimentiniam taškui daryti  $\geq 2$  techniniai pakartojimai. Duomenų statistiniam patikimumui įvertinti naudotas neporinis Stjudento t testas arba vienkryptė ANOVA ir Tukey *post hoc* testas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

## 2.2.11. Disertacijos eksperimentų planas

2.3 pav. pateikta disertacijos eksperimentinio darbo schema. Kasos vėžio ląstelių linijos Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4, augančios skirtingoms sąlygoms – standartinėmis (DMEM+10% FBS), paveiktos mTORC1 slopikliu rapamicinu, augančios be FBS ir be mTORC1 aktyvacijai reikalingų aminorūgščių glutamino, lizino ir arginino – buvo veikiamos ferroptozės induktoriais erastinu. Ląstelėse vertinti kinazių ERK1/2 ir JNK aktyvacijos požymiai (atitinkamai pernaša į branduolį ir fosforilinimas), o kinazių įtaka ląstelių atsparumui ferroptozei parodyta kinazes slopinant joms specifiniais slopikliais. Kartu buvo tirtas ir kitas ferroptozę kasos vėžio ląstelėse valdantis mechanizmas – mezenchiminio fenotipo pokyčiai ląstelėms patiriant augimo veiksnį badą, kurie labiausiai išryškėjo dviejose ląstelių linijose, Miapaca2 ir Capan-26. Pastaroji linija buvo išvesta ir charakterizuota disertacijos darbų metu. Pastebėjus ląstelių mezenchiminio fenotipo sąsajas su jų jautrumu erastinui, Miapaca2 ir Capan-26 ląstelės veiktos EMT aktyvinančiais ir slopinančiais junginiais, taip siekiant įvertinti, ar EMT moduliacija gali valdyti ląstelių atsparumą ferroptozei.



2.3 pav. Schema, apibendrinanti disertacijoje atliktus eksperimentus.



### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirta, kaip nepalankios augimo sąlygos – augimo veiksmų, aminorūgščių trūkumas ir mTOR slopiklių sukeltas pseudobadavimas – reguliuoja kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių jautrumą feroptozei. Panašius reiškinius valdantys molekuliniai mechanizmai kol kas plačiai nenagrinėti. Esminė publikacija buvo išspausdinta 2020 m., kurioje H. Lee *et al.* parodė, kad gliukozės trūkumas didina vėžinių ląstelių atsparumą įvairiems feroptozę sukeliantiems poveikiams AMPK kinazės valdomu mechanizmu, kurio metu aktyvinama acetil-koA karboksilazė – fermentas, dalyvaujantis riebalų rūgščių biosintezėje (Lee *et al.*, 2020). Kiti įdomūs duomenys pateikti E. Z. White *et al.* darbe, kuriame nustatyta, kad augdamos be serumo prostatos vėžio ląstelės pereina į nesidalinančių (*quiescent*) ląstelių būseną ir aktyvina transkripcijos veiksnį NF-κB, taip sustiprinamos savo antioksidacinį atsaką. Tiesa, šiame darbe oksidaciniam stresui sukelti autoriai nenaudojo specifinių feroptozės induktorių (White *et al.*, 2020). Kita vertus, kiek anksčiau parodyta, kad patirdamos badą gimdos kaklelio vėžio ląstelės gali kaupti ROS ir tapti jautresnės oksidacinį stresą sukeliančioms terapijoms (Wu *et al.*, 2013). Taigi, mokslininkų gauti rezultatai nėra vienareikšmiai.

Eukariotuose pagrindinis užląstelinų aplinkos sąlygų „sensorius“ yra serino/treonino kinazė mTOR (Saxton ir Sabatini, 2017). Kai metabolitų užląstelinėje aplinkoje pakanka, ląstelėse sėkmingai vyksta mTOR signalinio kelio valdoma baltymų sintezė. Ląstelėms badaujant, mTOR kinazės aktyvumas slopinamas, o daug energijos reikalaujanti transliacija stabdoma. Taip ląstelės taupo energiją ir lengviau išgyvena metabolitų trūkumą. Taip pat yra žinoma, kad mTOR padeda ląstelei prisitaikyti ir prie kitokio pobūdžio streso, pavyzdžiui, oksidacinio (Heberle *et al.*, 2015), o feroptozė yra nuo ROS priklausoma ląstelės žūtis (Dixon ir Stockwell, 2019). Tai paskatino paieškoti sąsajų tarp ląstelių gebėjimo išgyventi farmakologinio mTOR slopinimo ir oksidacinio streso sąlygomis.

#### 3.1. Badavimo įtakos ląstelių jautrumui feroptozei įvertinimas

Disertacijos eksperimentuose ląstelių badavimas buvo sukeltas skirtingais būdais, bet visais atvejais vyko farmakologinis mTOR kompleksų slopinimas: 1) standartinėje terpėje, turinčioje 10% FBS, augančias ląsteles veikiant mTOR kompleksų slopikliais, kitaip tariant, ląstelėse sukiant pseudobadavimą. Nors šiuo atveju ląstelių augimo aplinkoje maisto medžiagų

yra pakankamai, užslopinus mTOR gaunamas signalas, kad patiriamas badas. Darbe naudoti du mTOR slopinantys junginiai: pirmos kartos slopiklis rapamicinas, kuris sąveikauja su FKBP12 baltymu ir slopina mTORC1 kompleksą, ir su ATP konkuruojantis (angl. *ATP-competitive*) antros kartos slopiklis INK128, slopinantis abu mTOR kompleksus (žr. 1.2.2.3 skyrių) (Zhou ir Huang, 2012); 2) ląsteles auginant terpėje be serumo. Šiuo atveju ląstelės negauna augimo veiksmų. Tokiose ląstelėse slopinami abu mTOR kompleksai mTORC1 ir mTORC2, tačiau yra manoma, kad atsaką į augimo veiksmų badą daugiausiai reguliuoja mTORC2 (Saxton ir Sabatini, 2017); 3) ląsteles auginant su serumu, bet be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino (komercinėje DMEM terpėje, neturinčioje šių aminorūgščių). L-glutaminas, L-lizinas ir L-argininas būtini mTORC1 aktyvacijai (Rabanal-Ruiz *et al.*, 2017).

Kasos vėžys itin sparčiai metastazuoja ir tai laikoma pagrindine mažo pacientų išgyvenamumo priežastimi (Das ir Batra, 2015). Todėl eksperimentams pasirinktos keturios kasos duktalinės adenokarcinomos ląstelių linijos, reprezentuojančios skirtingas kasos naviko metastazavimo stadijas: Miapaca2 – mezenchiminio tipo ląstelės, išvestos iš pirminio kasos naviko, Panc-1 – epitelinio-mezenchiminio tipo ląstelės, taip pat išvestos iš pirminio kasos naviko, Su.86.86 – epitelinio-mezenchiminio tipo ląstelės, išvestos iš kasos naviko metastazių kepenyse, ir T3M4 – epitelinio tipo ląstelės, išvestos iš kasos vėžio metastazių limfmazgiuose.

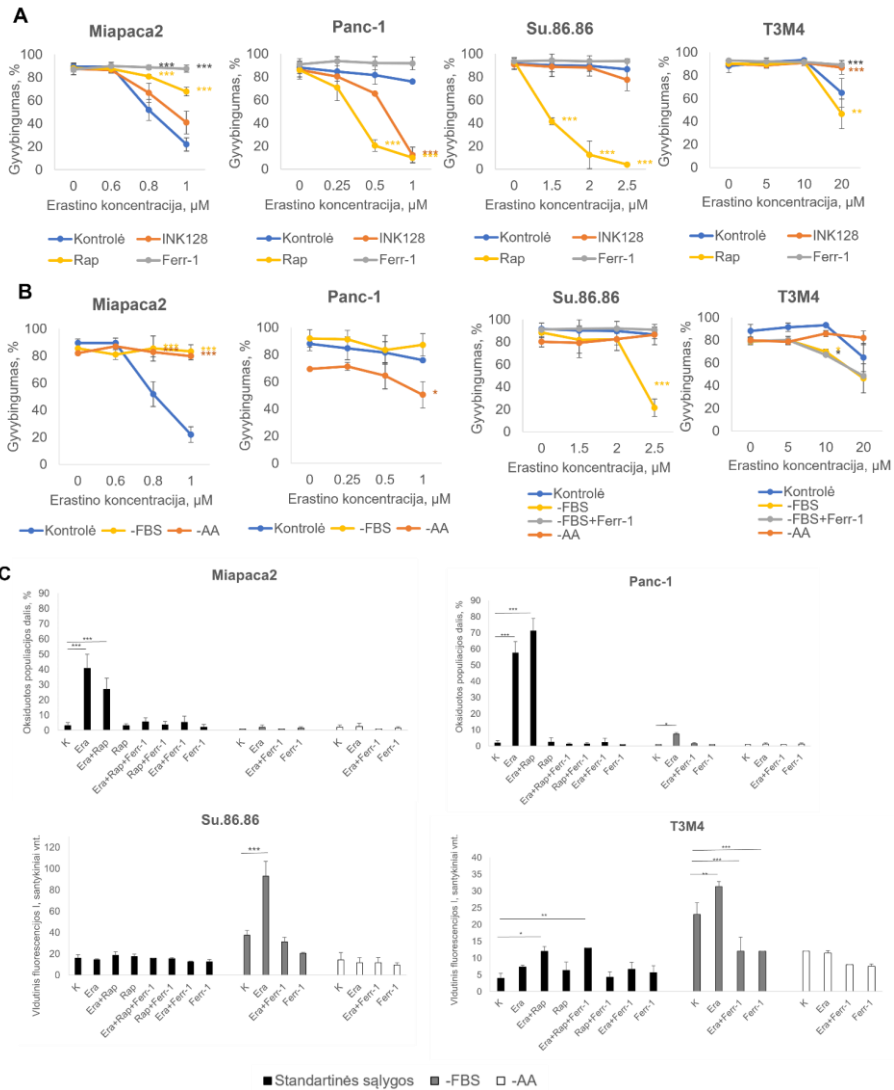
Badaujančias kasos vėžio ląsteles paveikus feroptozės induktoriumi erastinu, ląstelės dažytos propidžio jodidu ir tėkmės citometrijos metodu vertintas ląstelių gyvybingumas, t.y., ląstelių, turinčių intaktinę („nepradurtą“) membraną, dalis. Kadangi plazminės membranos integralumo praradimas yra būdingas ir kitiems ląstelės žūties tipams (pavyzdžiui, nekrozei, nekroptozei, piroptozei), siekiant įsitikinti, kad ląstelės žuvo tikrai feroptozės būdu, greta erastino ląstelės buvo veikiamos ir specifiniu feroptozės slopikliu, lipofiliniu antioksidatoriumi ferostatinu-1, kuris neutralizuoja erastino citotoksiškumą ir atstato ląstelių gyvybingumą iki kontrolinio lygio. Be to, feroptozę taip pat parodo ląstelės membranos lipidų oksidacija, jai įvertinti ląstelės dažytos fluorescuojančiu oksiduotų lipidų sensoriumi C11 BODIPY 581/591 ir analizuotos tėkmės citometru.

Propidžio jodido testas parodė, kad badavimas skirtingų kasos vėžio linijų ląsteles veikia nevienodai: dvi paras (pseudo)badaujančios Miapaca2 ląstelės tapo atsparesnės erastinui, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 – daugeliu atvejų jautresnės (3.1 pav. A-B). Rapamicino poveikis, augimo veiksmų ir aminorūgščių badas padidino Miapaca2 ląstelių atsparumą erastinui nuo 1,5

iki 4 kartų, tuo tarpu Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse minėti poveikiai sukėlė priešingą efektą arba efekto neturėjo. Panc-1 ląstelių gyvybingumui didžiausią įtaką turėjo rapamicinas, kuris sustiprino erastino citotoksiškumą 4-5 kartus. Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse gyvybingumo skirtumai buvo ryškiausi po rapamicino ir augimo veiksnių bado poveikio: esant aukštesnėms naudotoms erastino koncentracijoms Su.86.86 ląstelių gyvybingumas sumažėjo net iki 8 kartų, o T3M4 ląstelių – apie 1,5 karto. Įdomu tai, kad poveikis mTOR slopikliu INK128 nebuvo analogiškas rapamicino poveikiui: INK128 ženkliai nekeitė jautrumo erastinui Miapaca2, Panc-1 (išskyrus aukščiausią naudotą erastino koncentraciją) ir Su.86.86 ląstelių linijose, o T3M4 ląstelėms INK128 poveikis buvo priešingas nei rapamicino ir suteikė atsparumą erastinui.

Rezultatai buvo patvirtinti ir kitu metodu – dažant ląsteles fluorescuojančiu dažu C11 BODIPY 581/591, kuris leidžia registruoti ląstelių membranos lipidų oksidaciją (3.1 pav. C). Kaip ir ląstelių gyvybingumo eksperimentuose, greta erastino ląstelės buvo veikiamos ir ferostatinu-1, taip įsitikinant, kad C11 BODIPY 581/591 rodoma membranos lipidų oksidacija yra ferroptozės pasekmė. Miapaca2 ląstelių membranose rapamicinas sumažino oksiduotų lipidų kiekį apie 1,5 karto, o be augimo veiksnių ir be aminorūgščių augančiose ląstelėse lipidų oksidacija po erastino poveikio buvo visiškai nuslopinta. Panc-1 ląstelėse efektai nebuvo tokie drastiški, tačiau rapamicinas nežymiai sustiprino erastino sukeltą plazminės membranos lipidų oksidaciją lyginant su standartinėmis sąlygomis augančiomis ląstelėmis. Oksiduotų lipidų kiekis taip pat maždaug dvigubai padidėjo ir erastinu paveiktose Su.86.86 ląstelėse, augančiose be augimo veiksnių.

Įdomu tai, kad be serumo auginamų T3M4 ląstelių membranos lipidų oksidacija po erastino poveikio sustiprėjo, nors ferroptozės slopiklis ferostatinas neatstatė ląstelių gyvybingumo iki kontrolinių ląstelių lygio. Kadangi ferostatinas nebuvo toksiškas T3M4 ląstelėms, peršasi išvada, kad ląstelėse vyksta lipidų oksidacija, tačiau jos žūsta ne ferroptozės būdu. Apoptozės, nekrotozės ir autofagijos slopinimas atitinkamai kaspazių slopikliu ZVAD-FMK, nekrostatinu-1 ir ULK-1 slopikliu SBI-0206965 neatstatė erastinu veiktų T3M4 ląstelių gyvybingumo iki kontrolinio lygio, ląstelėse taip pat nedetektuota aktyvi kaspazė 3/7 (1 P pav. A-B). Taigi, po erastino poveikio T3M4 ląstelės nežūsta nė vienu iš šių reguliuojamų klasikinių žūties būdų. Galima spėti, kad greičiausiai įvyksta nekrozė.



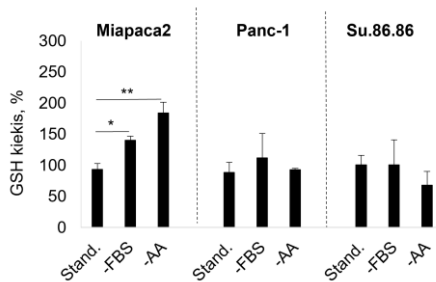
**3.1 pav.** (Pseudo)badavimas nevienodai veikia skirtingų kasos vėžio ląstelių linijų jautrumą ferroptozei. A. Ląstelių jautrumo erastinui vertinimas po mTOR slopiklių rapamicino (0,25 nM) ir INK128 (0,125 nM) poveikio. Kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. B. Ląstelių jautrumo erastinui vertinimas augimo veiksnių ir aminorūgščių stygių patiriančiose ląstelėse. Kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. C. Oksiduotų membranų lipidų kiekio vertinimas skirtingomis (pseudo)badavimo sąlygomis. Ląstelės veiktos 0,25 nM rapamicino. K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės.

Visais atvejais ferroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatino-1 (1  $\mu\text{M}$ ). Lipidų oksidacijos tyrimui Miapaca2 ir Panc-1 ląstelės veiktos 1  $\mu\text{M}$  erastino, Su.86.86 ląstelės – 2,5  $\mu\text{M}$  erastino, o T3M4 ląstelės – 20  $\mu\text{M}$  erastino. A dalyje mTOR slopiklių ir ferostatino-1 poveikis darytas 1 val. prieš erastino poveikį. B dalyje ląstelės inkubuotos terpėje be augimo veiksnių arba be aminorūgščių 1 val. prieš paveikiant erastinu. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio. Oksiduotų lipidų kiekis vertintas praėjus 18 val. po poveikio (Miapaca2 linijos) ir 48 val. po poveikio (Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 linijų).

-AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; I, intensyvumas; Rap, rapamicinas. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, lyginant su atitinkama kontrole.

Ląstelių jautrumą ferroptozei taip pat galima prognozuoti nustatant jose esančio antioksidanto GPX4 kofaktoriaus GSH kiekį. Tam naudojamas DTNB (Ellman'o reagentas), su GSH sudarantis geltonos spalvos produktą, kurio sugertis įvertinama spektrofotometriškai. Šio eksperimento rezultatai parodė, kad be augimo veiksmių ir be aminorūgščių auginamiose Miapaca2 ląstelėse GSH kiekis padidėja 1,5-2 kartus, priešingai nei Panc-1 ir Su.86.86 linijose, kuriose jis reikšmingai nekinta (3.2 pav). Taigi, patirdamos augimo veiksmių ir aminorūgščių, reikalingų mTORC1 aktyvacijai, trūkumą, Miapaca2 ląstelės tampa labiau prisitaikiusios prie oksidacinio streso.

Apibendrinant aptartus rezultatus, galima teigti, kad dvi paras badaujančios Miapaca2 ląstelės įgyja atsparumą ferroptozės induktoriui erastinui, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 tampa jam jautresnės.

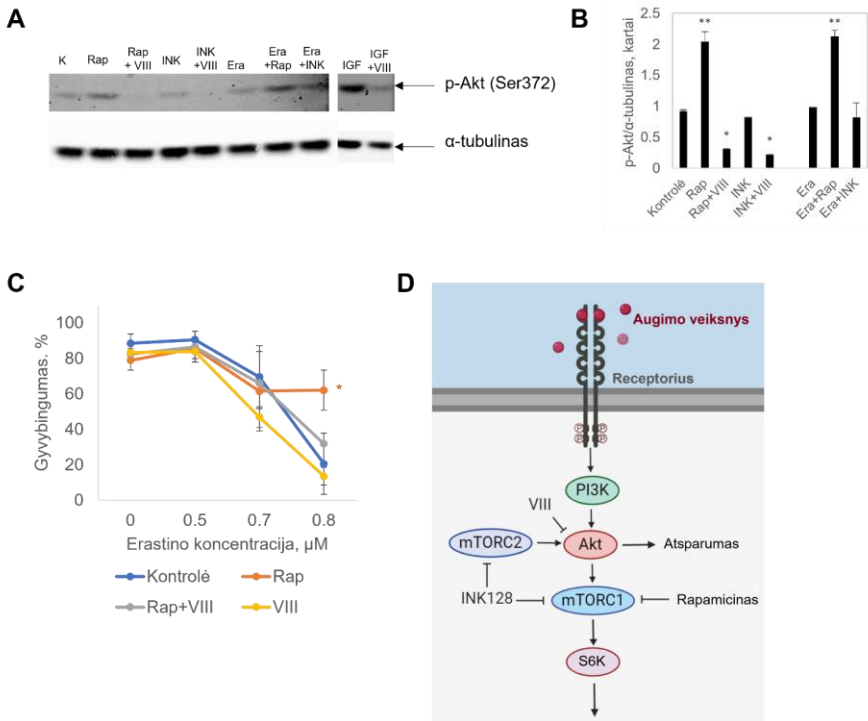


**3.2 pav.** Badavimas padidina GSH kiekį Miapaca2, bet ne Panc-1 ir Su.86.86 ląstelėse. GSH kiekis vertintas praėjus 20 val. po ląstelių inkubacijos terpėje be augimo veiksmių arba be aminorūgščių. -AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; GSH – redukuotas glutationas; Stand. – standartinėmis sąlygomis auginamos ląstelės (DMEM+10% FBS). Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, lyginant su atitinkama kontrole.

Kaip jau minėta, poveikį ląstelių jautrumui turėjo tik specifinis mTORC1 komplekso slopinimas rapamicinu, bet ne abiejų mTOR kompleksų slopinimas junginiu INK128. Tai rodo, kad mTORC1 kompleksas nėra pagrindinis jautrumo ferroptozei reguliatorius. Yra žinoma, kad ląsteles inkubuojant su rapamicinu gali būti aktyvinamas mTORC2 kompleksas (Formisano *et al.*, 2020). Vienas iš mTORC1 taikinių, S6K kinazė, fosforilina ir slopina Rictor baltymą, įeinantį į mTORC2. Kai mTORC1 slopinamas rapamicinu, kartu slopinama ir S6K kinazė, o Rictor ir mTORC2 aktyvinami. Tai žinant, buvo iškelta hipotezė, kad jautrumas ferroptozei kasos vėžio ląstelėse reguliuojamas grįžamojo ryšio principu per mTORC2 kompleksą.

### 3.2. Akt kinazės reikšmė ląstelių jautrumui feroproteizei

Viena iš geriausiai ištirtų rapamicino aktyvinamų grįžtamojo ryšio grandinių yra Akt kinazės aktyvacija (Wan *et al.*, 2007). Kadangi Akt yra tiesioginis mTORC2 taikiny, šis mechanizmas paaiškintų, kodėl jautrumo erastinui nekeičia bendras mTORC1 ir mTORC2 slopiklis INK128. *Western blot* analizė parodė, kad Miapaca2 ląstelėse rapamicinas išties aktyvina (fosforilina) Akt kinazę (fosforilinto baltymo kiekis padidėja apie porą kartų) ir šią aktyvaciją sėkmingai nuslopina INK128 (3.3 pav. A-B). Be to, Akt slopiklis VIII neutralizuoja rapamicino suteikiamą atsparumą erastinui (3.3 pav. C). Taigi, rapamicino aktyvinamas Akt signalo perdavimas valdo Miapaca2 ląstelių atsparumą erastinui (3.3 pav. D).



**3.3 pav.** Miapaca2 ląstelių atsparumą erastinui reguliuoja mTORC2 ir Akt. A. Fosfo-Akt (p-Akt (Ser372)) *Western blot* analizė. Ląstelės 3 val. veiktos rapamicinu (1 nM), INK128 (0,5 nM), Akt slopikliu VIII (1 nM) ir erastinu (2,5  $\mu$ M); poveikis IGF (100 ng/ml) naudotas kaip teigiama kontrolė. B. A dalies kiekybinis vertinimas. C. Miapaca2 ląstelių gyvybingumas po erastino poveikio, kartu slopinant mTORC1 ir/arba Akt. Ląstelės veiktos 0,25 nM rapamicino ir/arba 1 nM Akt slopiklio VIII. Rapamicino ir Akt slopiklio VIII poveikis darytas 1 val. prieš erastino poveikį. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio. D. Akt-mTOR signalinio kelio schema. VIII, Akt kinazės slopiklis VIII; Era, erastinas; IGF – insulino augimo veiksnys (angl. *Insulin Growth Factor*); INK, INK128; Rap, rapamicinas; K, kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, lyginant su kontrolė; C dalyje lygintas ląstelių gyvybingumas tarp rapamicinu ir rapamicinu bei Akt slopikliu VIII veikto ląstelių.

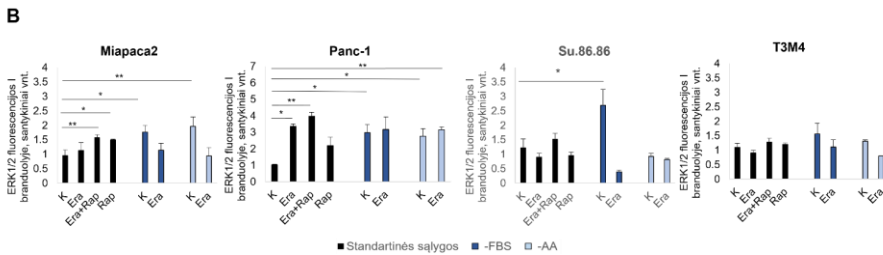
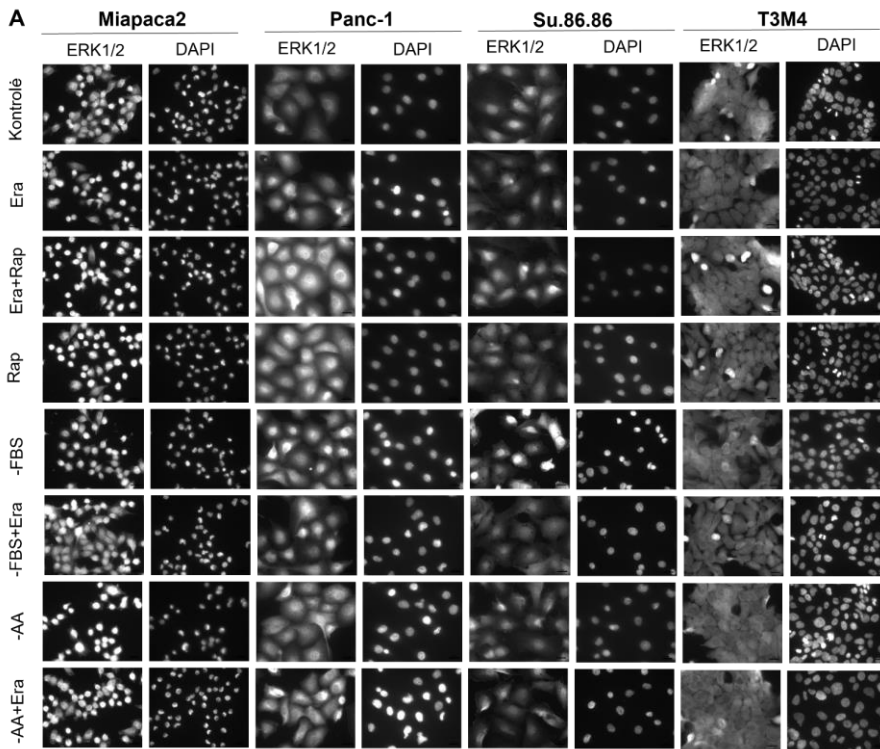
Prieš porą metų *Nature* žurnale buvo išspausdinta Yi *et al.* publikacija, kurioje aprašytas labai panašaus signalinio tinklo mechanizmas vėžinėse ląstelėse (Yi *et al.*, 2020). Autoriai nustatė, kad rapamicino aktyvinamas PI3K-Akt-mTOR kelias atsparumą ferroptozei suteikia paskatindamas SREBP valdomą lipidų sintezę. Todėl tolimesniuose disertacijos darbuose ieškota kitų rapamicino valdomų atsparumo ferroptozei mechanizmų.

### 3.3. ERK1/2 kinazės reikšmė ląstelių jautrumui ferroptozei

Kita kinazė, kurią rapamicinas galėtų aktyvinti grįžtamojo ryšio principu, yra ERK1/2. ERK1/2 aktyvacija po rapamicino poveikio parodyta įvairių tipų vėžio ląstelėse (Carracedo *et al.*, 2008, Chou *et al.*, 2020), bet ne kasos vėžio, kuriame netgi buvo paneigta (Soares *et al.*, 2013). Nepaisant to, nuspręsta patikrinti ją šioje disertacijoje naudojamose *in vitro* sistemose. Tam fluorescencinės mikroskopijos metodu vertinta ERK1/2 lokalizacija (pseudo)badu sąlygomis augančiose kasos vėžio ląstelėse. Imunofluorescencinė analizė parodė, kad vienas iš ERK1/2 aktyvacijos požymių – baltymo pernaša iš citozolio į ląstelės branduolį – yra stebimas tirtose kasos vėžio ląstelių linijose po rapamicino, augimo veiksmų bado ir aminorūgščių bado poveikio. Rapamicinas paskatino ERK1/2 pernašą į ląstelių branduolį Miapaca2 ir Panc-1 ląstelėse, Panc-1 linijos atveju efektą dar labiau sustiprina erastino poveikis. Nežymi erastino ir rapamicino sinergija stebima ir Miapaca2 bei Su.86.86 ląstelėse. Augimo veiksmų trūkumas stipriausiai, apie 3 kartus, ERK1/2 pernašą į branduolį sustiprina Su.86.86 linijoje, tačiau nei bado, nei standartinėmis sąlygomis po erastino poveikio ERK1/2 translokacijos, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, pokyčių nėra. Gali būti, kad erastinu paveiktose ląstelėse ERK1/2 yra aktyvinama anksčiau nei kontrolinėse, todėl tuomet, kai stebima pernaša į branduolį erastinu neveiktose ląstelėse, erastinu paveiktose ląstelėse pokyčiai jau nestebimi. Augimas be aminorūgščių ERK1/2 pernašą į Miapaca2 ir Panc-1 ląstelių branduolius sustiprina 2-3 kartus, tačiau sinerginio poveikio kartu su erastinu taip pat neturi. Reikšmingų ERK1/2 pernašos į branduolį pokyčių bado sąlygomis T3M4 ląstelių linijoje nepastebėta.

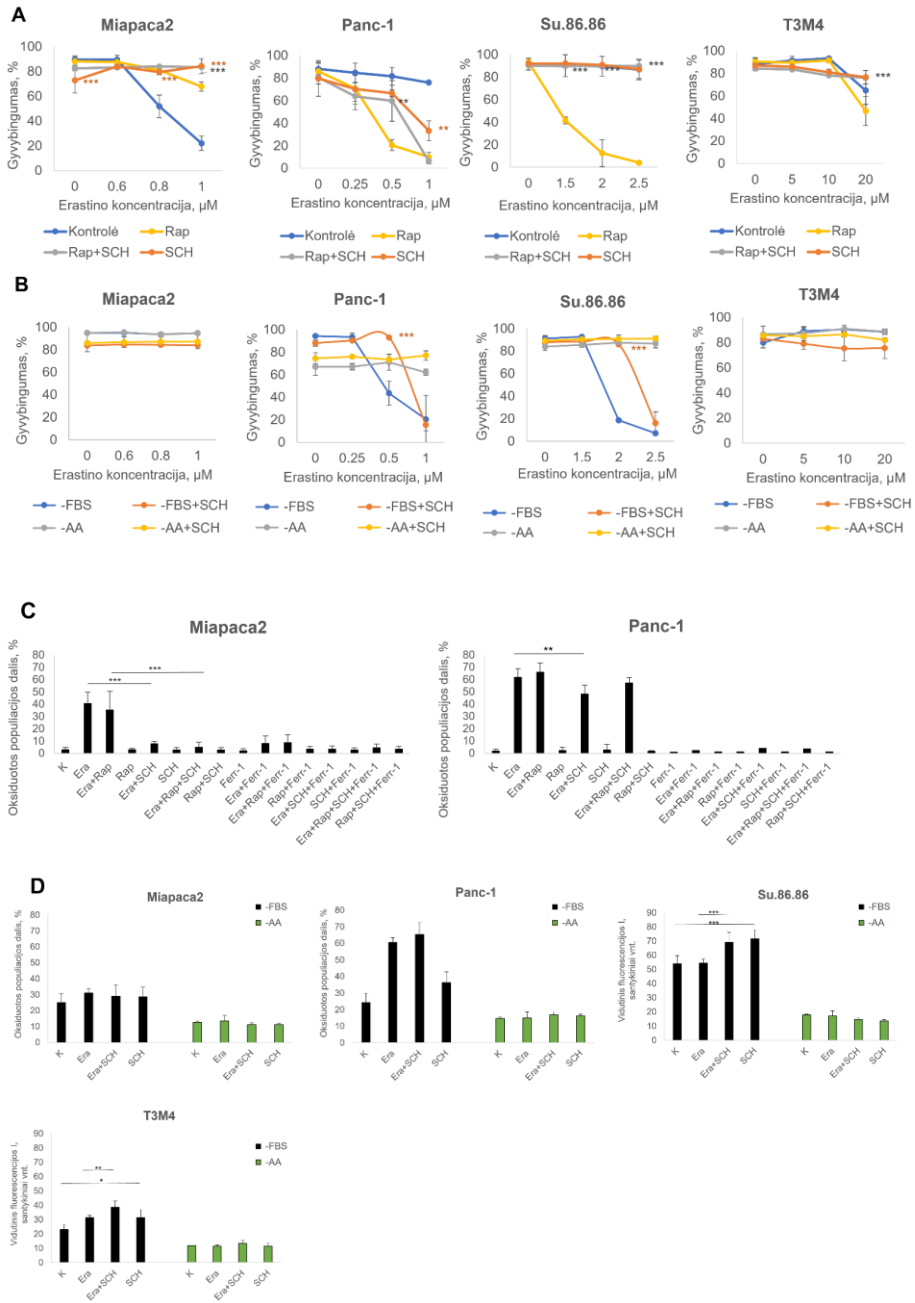
Siekiant įvertinti ERK1/2 reikšmę ferroptozei, tirta, kaip keičiasi badaujančių kasos vėžio ląstelių jautrumas erastinui ląsteles paveikus specifiniu ERK1/2 slopikliu SCH772984 (3.5 pav. A-B). ERK1/2 slopinimas 2-4 kartus padidino rapamicinu veiktų ir be augimo veiksmų auginamų Panc-1 ir Su.86.86 ląstelių gyvybingumą, taip pat rapamicinu veiktų T3M4 ląstelių gyvybingumą. Daugeliu atvejų (išskyrus rapamicinu veiktas Miapaca2 ir

T3M4 ląstelės) efektas išryškėjo esant vidutinei naudotai erastino koncentracijai.



**3.4 pav.** ERK1/2 kinazė pernešama į badujančių kasos vėžio ląstelių branduolį. A. ERK1/2 imunofluorescencinė analizė (pseudo)badujančiose ir erastinu veiktose bei neveiktose Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse. Mastelio juosta, 20 μm, ×20 padidėjimas. Rapamicino ir/ar erastino poveikis skirtingų linijų ląstelėse truko 1 val., augimo veiksnių ir aminorūgščių bado poveikis Miapaca2 ląstelėse atitinkamai truko 4 ir 3 val., Panc-1 ląstelėse – 4 ir 5 val., Su.86.86 ląstelėse – po 5 val., T3M4 ląstelėse – po 3 val. Ląstelės veiktos 0,25 nM rapamicino; Miapaca2 ir Panc-1 ląstelės veiktos 2 μM erastino, Su.86.86 ląstelės – 5 μM erastino, T3M4 ląstelės – 40 μM erastino. Ląstelių branduoliai dažyti DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolu). K – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) augančios ir vaistais neveiktos ląstelės. B. A dalies kiekybinis vertinimas. ERK1/2 fluorescencijos intensyvumas ląstelių branduolyje kiekybiškai vertintas ImageJ 1.52v (*National Institutes of Health, JAV*) programa. -AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; I, intensyvumas; K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės; Rap, rapamicinas. Paklaidos: ±SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, lyginant su standartinėmis sąlygomis augančiomis vaistais neveiktomis ląstelėmis.





**3.5 pav.** Badavimas valdo ferroptozę per ERK1/2. A-B. Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių, veiktu rapamicinu (0,25 nM), auginamų be FBS arba be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino, gyvybingumas po ERK1/2 slopiklio SCH772984 (1 µM) poveikio. Kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. C. Oksiduotų lipido kiekio tyrimas kasos vėžio ląstelėse po rapamicinu (0,25 nM) ir SCH772984 (1 µM) poveikio. D. Oksiduotų lipido kiekio tyrimas be FBS ir be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino auginamos kasos vėžio ląstelėse po SCH772984 (1 µM) poveikio. K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės.

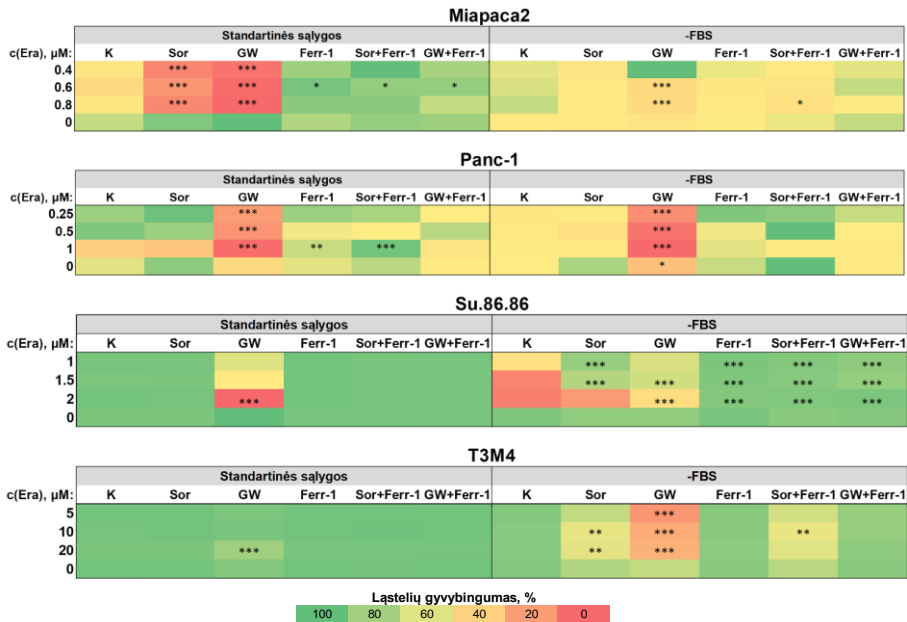
Visais atvejais feroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatinu-1 (1  $\mu$ M). Lipidų oksidacijos tyrimui Miapaca2 ląstelės veiktos 0,8  $\mu$ M erastino, Panc-1 ląstelės – 0,5  $\mu$ M erastino, Su.86.86 ląstelės – 2  $\mu$ M erastino, o T3M4 ląstelės – 10  $\mu$ M erastino. A dalyje rapamicino ir ERK1/2 slopiklio poveikis darytas 1 val. prieš erastino poveikį. B dalyje ląstelės inkubuotos terpėje be augimo veiksnių arba be aminorūgščių ir veiktos ERK1/2 slopikliu 1 val. prieš paveikiant erastinu. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio. Oksiduotų lipidų kiekis membranoje vertintas praėjus 18 val. po poveikio (Miapaca2 linijos) ir 48 val. po poveikio (Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 linijų).

-AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; I, intensyvumas; Rap, rapamicinas; SCH, SCH772984. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, lyginant tokius pačius poveikius gavusias ir tomis pačiomis sąlygomis augančias ląsteles, veiktas ir neveiktas SCH772984.

Įdomu tai, kad standartinėmis sąlygomis ERK1/2 slopinimas apie 3 kartus padidino Panc-1 ląstelių jautrumą erastinui. Ląstelių, patiriančių aminorūgščių stygių, jautrumo erastinui SCH772984 poveikis nekeitė. Be to, SCH772984 sumažino lipidų oksidaciją standartinėmis sąlygomis augančiose Miapaca2 ir Panc-1 ląstelėse, Miapaca2 linijoje netgi apie 4 kartus (3.5 pav. C). Panc-1 atveju galima įtarti ląstelės žūties tipo pasikeitimą, kadangi po erastino ir SCH772984 kombinuoto poveikio Panc-1 ląstelės tapo erastinui jautresnės, nors membranos lipidų oksidacija sumažėjo. Rapamicinu ir ERK1/2 slopikliu paveiktose Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse reikšmingų lipidų oksidacijos pokyčių neaptikta (2 P pav.). Be augimo veiksnių augančiose Panc-1 ir Su.86.86 ląstelėse užslopinus ERK1/2 lipidų oksidacija buvo sustiprinta (3.5 pav. D), tai koreliuoja su ląstelių gyvybingumo eksperimentų duomenimis. Reikia pastebėti, kad, nors be mTORC1 aktyvacijai reikalingų aminorūgščių auginamose Miapaca2 ir Panc-1 ląstelėse ERK1/2 pernaša į branduolį suaktyvėjo, tačiau ERK1/2 slopinimas lipidų oksidacijai, kaip ir ląstelių gyvybingumui po erastino poveikio, reikšmingo poveikio neturėjo. Kitomis (pseudo)badavimo sąlygomis ERK1/2 pernaša į branduolį koreliavo su kasos vėžio ląstelių jautrumo erastinui pokyčiais. Apibendrinant, galima teigti kad ERK1/2 valdo erastino indukuojamą feroptozę badaujančiose (be augimo veiksnių augančiose arba rapamicinu paveiktose) Panc-1, Su.86.86 ir T3M4, bet ne Miapaca2 ląstelėse.

Augimo veiksnių receptoriais perduodamas signalas ERK1/2 paprastai aktyvina per MAP kinazių kaskadą Ras-Raf-MEK-ERK (Roberts ir Der, 2007). Siekiant nustatyti, ar tai vyksta ir disertacijoje naudojamose sistemose, buvo vertintas dviejų Raf slopikliu, GW5074 ir sorafenibo, poveikis badaujančių kasos vėžio ląstelių gyvybingumui po erastino poveikio. Kaip ir ankstesniuose eksperimentuose, ląstelių gyvybingumas tirtas tėkmės citometrijos metodu, ląsteles prieš tai nudažius propidžio jodidu. GW5074 yra selektyvus c-Raf slopiklis, o sorafenibas yra platesnio spektro Raf-1, B-Raf ir kitų kinazių slopiklis. Rezultatai parodė, kad Raf slopinimas GW5074 ir

sorafenibu apsauginio efekto neturi ir neapsaugo ląstelių nuo feroptozės nei standartinėmis, nei bado sąlygomis, išskyrus be serumo auginamas Su.86.86 ląsteles. Tai rodo, kad be augimo veiksnių auginčiose Miapaca2, Panc-1 ir T3M4 ląstelėse ERK1/2 aktyvinama ne kanoniniu, o mTORC2 valdomu keliu.

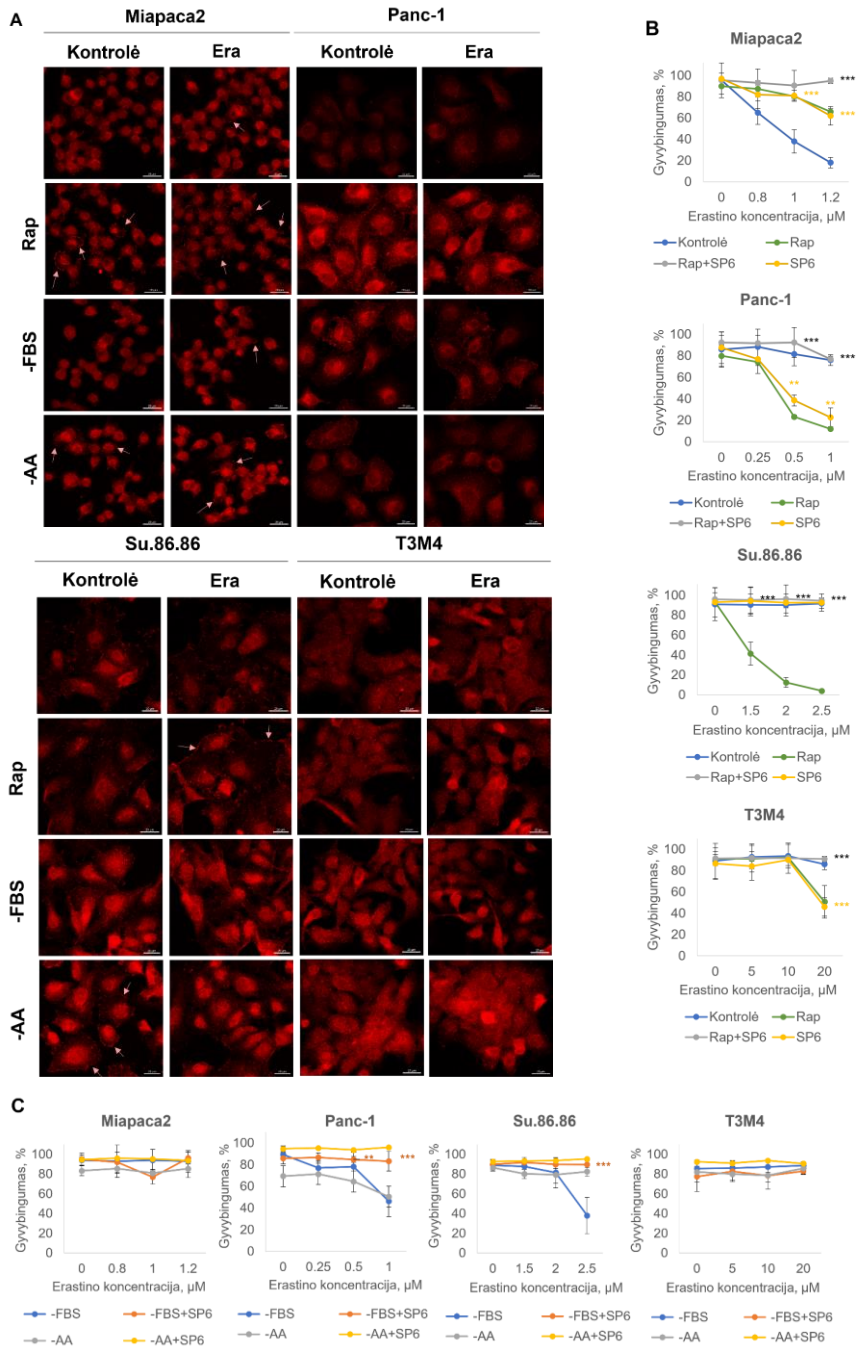


**3.6 pav.** Raf slopinimas nepadidina kasos vėžio ląstelių atsparumo feroptozei. Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių jautrumo erastinui analizė po Raf slopiklių GW5074 (1 μM) ir sorafenibo (1 μM) poveikio. Feroptozė indukuota erastinu, o slopinta ferostatiniu-1 (1 μM). Visi poveikiai daryti 1 val. prieš paveikiant ląsteles erastinu. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio. Era, erastinas; -FBS, ląstelės auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; GW, GW5074; K, kontrolė – Raf slopikliais neveiktos ląstelės; Sor, sorafenibas. n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, lyginant su atitinkama kontrole.

### 3.4. JNK kinazės reikšmė ląstelių jautrumui feroptozei

Vienas iš pagrindinių ląstelės oksidacinio streso atsako reguliatorių yra AP-1 transkripcijos veiksnys. AP-1 yra dimeras, sudarytas iš FOS ir/arba JUN subvienetų. Ląstelėms patiriant oksidacinį stresą arba veikiant augimo veiksnių receptorių perduodamam signalui, AP-1 transkripcijos veiksnį fosforilina ir aktyvina kinazės ERK1/2, p38 ir JNK (Eferl ir Wagner, 2003). Kadangi ERK1/2 vaidmuo jau buvo tirtas, nuspręsta įvertinti JNK aktyvumą ir reikšmę feroptozei kasos vėžio ląstelėse skirtingomis bado sąlygomis.

Fosfo-JNK (p-JNK) imunofluorescencinė analizė (3.7 pav. A) parodė, kad JNK yra aktyvinama (fosforilinama) kasos vėžio ląsteles auginant be augimo veiksnių, mTORC1 aktyvacijai reikalingų aminorūgščių arba veikiant rapamicinu, tačiau išryškėjo skirtumai tarp ląstelių linijų atsako



**3.7 pav.** Badavimas valdo feroptozę per JNK. A. Fosfo-JNK imunofluorescencinė analizė (pseudo)badaujančiose Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse, veiktose arba neveiktose erastinu. Rodyklės rodo fosfo-JNK sankaupas. (Pseudo)badavimo ir/arba erastino poveikis skirtingų linijų ląstelėse truko 1-5 val. Mastelio juosta, 20  $\mu\text{m}$ . Kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. B-C. Kasos vėžio ląstelių, veiktų rapamicinu (0,25 nM), auginamų be FBS arba be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino, gyvybingumo tyrimas po JNK slopiklio SP600125 (5  $\mu\text{M}$ ) poveikio.

Visais atvejais ferroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatinu-1 (1  $\mu\text{M}$ ). A dalyje Miapaca2 ir Panc-1 ląstelės veiktos 2  $\mu\text{M}$  erastino, Su.86.86 ląstelės – 5  $\mu\text{M}$  erastino, T3M4 ląstelės – 40  $\mu\text{M}$  erastino. B dalyje rapamicino ir SP600125 poveikis darytas 1 val. prieš erastino poveikį. C dalyje ląstelės inkubuotos terpėje be augimo veiksmių arba be aminorūgščių ir veiktos SP600125 1 val. prieš paveikiant erastinu. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio.

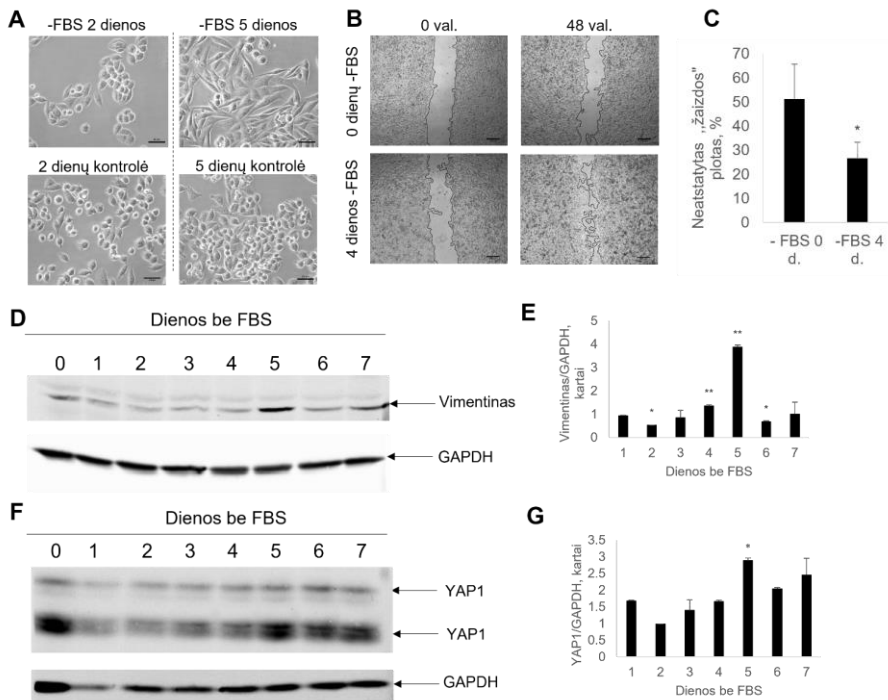
-AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; Rap, rapamicinas; SP6, SP600125. Paklaidos:  $\pm\text{SN}$ ,  $n=3$ . \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , lyginant tokius pačius poveikius gavusias ir tomis pačiomis sąlygomis augančias ląsteles, veiktas ir neveiktas SP600125.

Miapaca2 ląstelėse JNK fosforilinimas ryškiausiai buvo stebimas po rapamicino poveikio, Panc-1 ląstelėse – po rapamicino ir augimo veiksmių bado poveikio, Su.86.86 ląstelėse – po augimo veiksmių ir aminorūgščių bado poveikio, o T3M4 linijoje silpnas fosforilinimas stebėtas ląsteles auginant be aminorūgščių. Beveik visais atvejais JNK slopinimas specifiniu slopikliu SP600125 suteikė atsparumą erastinui (pseudo)badavimo sąlygomis (3.7 pav. B-C), tačiau standartinėmis sąlygomis augančių Panc-1 ir T3M4 ląstelių jautrumas erastinui sustiprėjo 2-4 kartus. Šį rezultatą patvirtino ir oksiduotų lipidų kiekio analizė (3 P pav.). Tai atitinka supratimą, kad JNK ir jos aktyvinami signaliniai keliai bei transkripcijos veiksniai apsaugo ląsteles nuo oksidacinio streso. Kita vertus, JNK aktyvacija po erastino poveikio Panc-1 ląstelėse standartinėmis sąlygomis nestebima, galimai yra uždelsto veikimo ir pasireiškia po ilgesnio laiko. Įdomiausias yra JNK slopinimas, suteikiantis atsparumą oksidaciniam stresui. Šie duomenys išryškina naują, proferoptotini JNK vaidmenį badaujančiose kasos vėžio ląstelėse.

### 3.5. Augimo veiksmių trūkumo įtakos ląstelių mezenchiminiam fenotipui įvertinimas

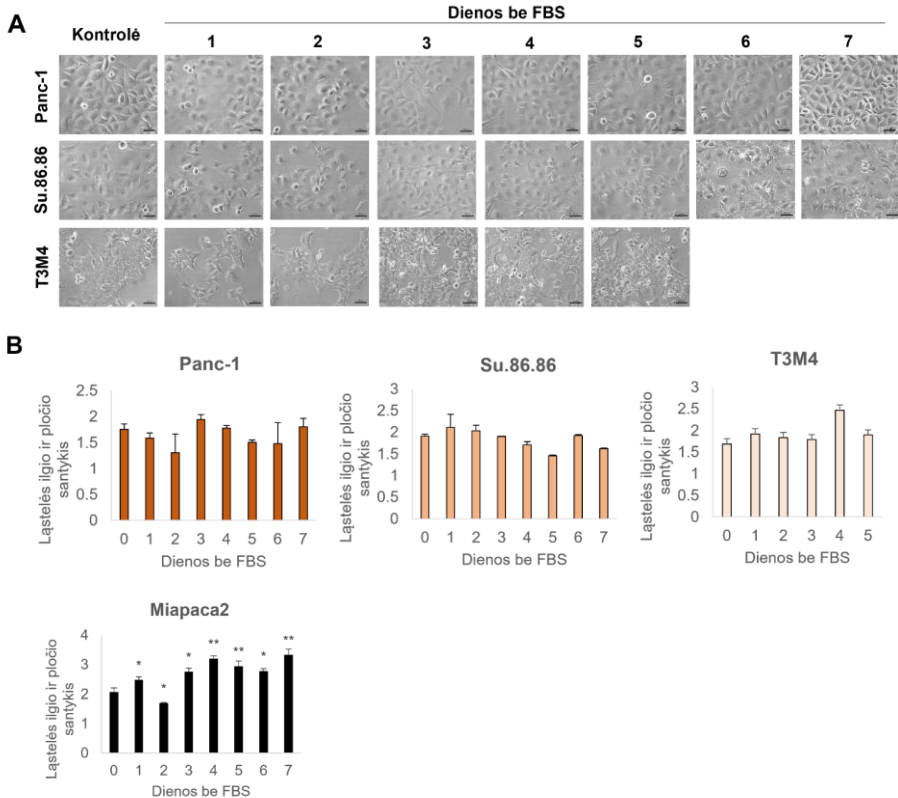
Akivaizdu, kad Miapaca2 ląstelių atsakas į erastino poveikį skiriasi nuo kitų tirtų linijų Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 atsako: dvi paras badaujančios Miapaca2 ląstelės įgyja atsparumą erastinui, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelės tampa jautresnės. Įdomu tai, kad augimo veiksmių badas keičia Miapaca2 ląstelių morfologiją: be serumo auginamos 2 paras, mezenchiminio tipo Miapaca2 ląstelės pradeda formuoti epitelinėms ląstelėms būdingas saleles, o po 5 parų be augimo veiksmių įgyja fibroblastišką verpstės formą (3.8 pav. A). Iškelta hipotezė, kad tokie morfologiniai pokyčiai rodo perėjimą tarp epitelinės ir mezenchiminės būsenų. Šiai hipotezei patvirtinti ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčiai įvertinti kiekybiškai, panaudojant „žaidos gijimo“ testą, kuris parodo ląstelių judrumo pokyčius (3.8 pav. B-C). Išties, per pirmąsias augimo be serumo dienas Miapaca2 ląstelės tapo maždaug

dvigubai mažiau jūdrios nei 4-6 kultivavimo be FBS dieną. Taip pat *Western blot* analizės metodu tirtas mezenchiminių žymenų vimentino ir YAP1 kiekis (3.8 pav. D-G). Išryškėjo vimentino ir YAP1 kiekio dinamika: antrąją augimo be FBS dieną vimentino ir YAP1 santykinis kiekis sumažėjo maždaug dvigubai lyginant su standartinėmis sąlygomis augančiomis ląstelėmis, bet nuo ketvirtosios dienos pradėjo didėti ir penktąją kultivavimo be FBS dieną pasiekė maksimumą. Vimentino santykinis kiekis badaujančiose ląstelėse viršijo standartinėmis sąlygomis kultivuojamų ląstelių turimą kiekį keturis kartus, YAP1 kiekis padidėjo dvigubai. Koreliaciją tarp vimentino ir YAP1 lygio paaiškina faktas, jog vimentinas yra YAP1 transkripcinis taikynys (Yuan *et al.*, 2016).



**3.8 pav.** Augimo veiksnį badas keičia Miapaca2 ląstelių mezenchiminių fenotipą. A. Reprerentaciniai Miapaca2 ląstelių, augintų be FBS 2 ir 5 paras, šviesinės mikroskopijos vaizdai. Kontrolė – standartinėje terpėje atitinkamą laikotarpį auginamos ląstelės. B. Šviesinės mikroskopijos Miapaca2 ląstelių vaizdai, reprezentuojantys „žaizdos gijimo“ testą. Prieš „žaizdos“ padarymą ląstelės auginamos standartinėmis sąlygomis („-FBS 0 d.“) arba be FBS 4 paras („-FBS 4 d.“). Po monosluksnio įbrėžimo ląstelės fotografuotos iškart („0 val.“) arba po 2 parų („48 val.“). Mastelio juosta – 200  $\mu$ m. C. B dalies kiekybinis vertinimas. D. Vimentino kiekio tyrimas *Western blot* metodu, ląsteles auginant be FBS 0-7 dienas. E. D dalies kiekybinis vertinimas. F. YAP1 kiekio tyrimas *Western blot* metodu, ląsteles auginant be FBS 0-7 dienas. G. F dalies kiekybinis vertinimas. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, lyginant su 0 dienų be FBS auginomis ląstelėmis (C dalyje) ir su 1 dieną be FBS auginomis ląstelėmis (E ir G dalyse).

Kitose tirtose kasos vėžio ląstelių linijose Panc-1, Su.86.86 ir T3M4, artimesnėse epiteliniam tipui, morfologiniai pokyčiai auginant be FBS nestebėti, o ląstelių ilgio ir pločio santykis (angl. *cell aspect ratio*) reikšmingai nesikeitė (3.9 pav. A-B). T3M4 linijos ląstelės be serumo buvo auginamos daugiausiai 5 paras, kadangi kultivuojant ilgiau ženkliai mažėjo ląstelių gyvybingumas.

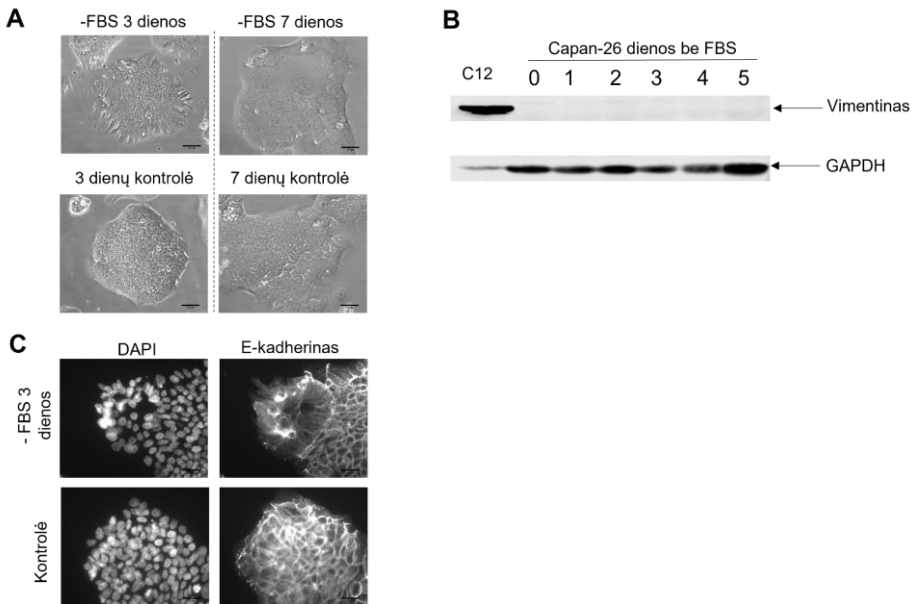


**3.9 pav.** Kultivavimas be serumo nekeičia Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių morfologijos. A. Reprezentaciniai šviesinės mikroskopijos ląstelių vaizdai, ląsteles auginant be FBS nurodytą laikotarpį. Kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės. B. Ląstelių ilgio ir pločio santykio (angl. *cell aspect ratio*) įvertinimas. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, lyginant su 0 dienų be FBS auginomomis ląstelėmis

Be Miapaca2, plastiškumo pokyčiai bado sąlygomis išryškėjo ir unikaloje Capan-26 ląstelių linijoje, išvestoje doktorantūros studijų metu iš pirminio naviko. Po 3 parų auginimo be serumo Capan-26 ląstelių salelių pakraščiuose esančios ląstelės pakeitė morfologiją į mezenchiminę, tačiau kultivuojant be augimo veiksnį ilgesnį laiką šie požymiai pranyko (3.10 pav. A). Morfologijos pokyčiai taip pat pranykdavo pakeitus ląstelių kultivavimo terpę, kas sufleruoja, jog mezenchiminis fenotipas kultūroje reguliuojamas humoraliniu būdu. Kadangi keitėsi tik dalis populiacijos ląstelių, *Western blot*

analizė neparodė vimentino kiekio skirtumų standartinėmis sąlygomis ir be serumo augančiose Capan-26 ląstelėse (3.10 pav. B), tačiau konfokalinio mikroskopu pavyko identifikuoti E-kadherino lokalizacijos pakitimus: augančiose be serumo ląstelėse, esančiose sausių pakraščiuose, membraninis E-kadherinas tapo viduląstelininiu (3.10 pav. C). Taigi, galima teigti, kad augimo veiksmų trūkumas paskatina Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčius ir tranziciją tarp epitelinės ir mezenchiminės būsenų.

Šioje vietoje reikėtų pristatyti unikalios Capan-26 ląstelių linijos išvedimą ir charakterizavimą.



**3.10 pav.** Augimo veiksmų badas keičia Capan-26 ląstelių mezenchiminį fenotipą. A. Reprerentaciniai šviesinės mikroskopijos Capan-26 ląstelių, auginamų be FBS 3 ir 7 paras, vaizdai. Kontrolė – standartinėje terpėje (IMDM+10% FBS) atitinkamą laiką auginamos ląstelės. Mastelio juosta – 50 μm. B. Vimentino *Western blot* analizė ląsteles kultivuojant be FBS 0-7 dienas. C12 – stromos ląstelės, išvestos iš kasos naviko pooperacinės medžiagos, naudotos kaip teigiama kontrolė. C. E-kadherino imunofluorescencinė analizė. Ląstelės kultivuotos be serumo 3 paras. Ląstelių branduoliai dažyti DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolu). Kontrolė – standartinėje terpėje (IMDM+10% FBS) auginamos ląstelės. Mastelio juosta – 50 μm.

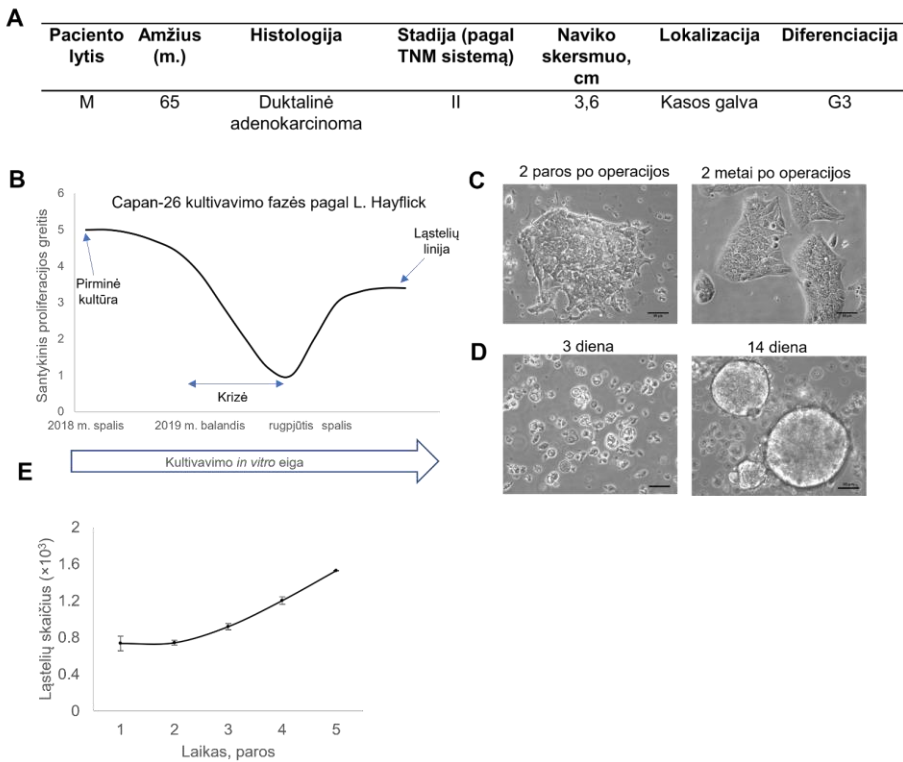
### 3.6. Capan-26 ląstelių linijos išvedimas ir charakterizavimas

#### 3.6.1. Linijos išvedimo procesas ir augimo charakteristikos

Capan-26 ląstelių linija buvo išvesta iš 65 metų lietuvių kilmės moters kasos naviko pooperacinės medžiagos (3.11 pav. A). Pacientei buvo



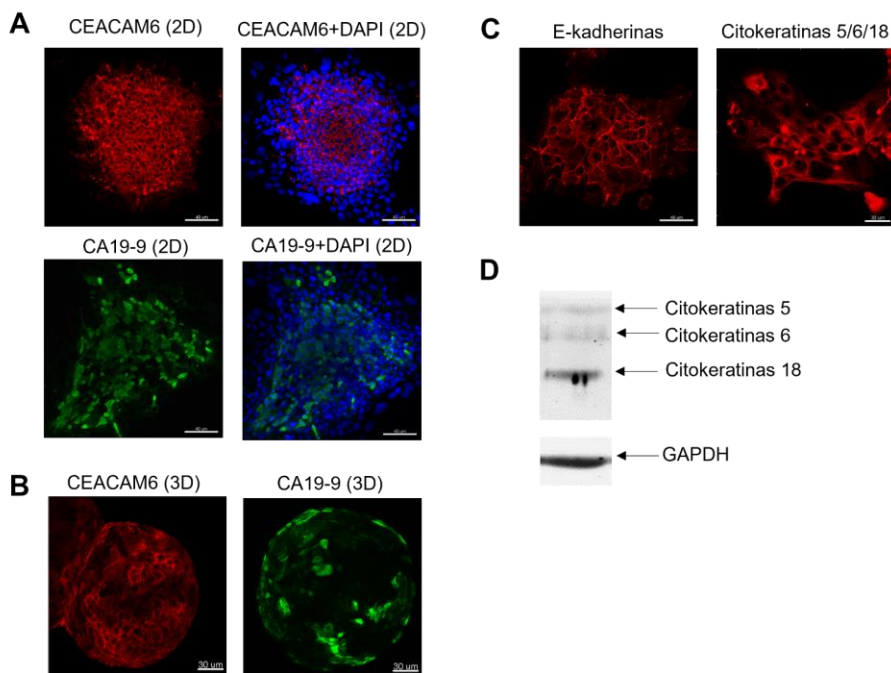
diagnozuota II stadijos (G3 diferenciacijos laipsnio) kasos duktalinė adenokarcinoma, 3,6 cm skersmens navikas buvo lokalizuotas kasos galvoje. Linija buvo išvesta eksplanto metodu (Ruckert *et al.*, 2012). Linijos išvedimo procesas užtruko apie metus (2018-2019 m.) ir perėjo klasikines L. Hayflick (Hayflick ir Moorhead, 1961) aprašytas fazes (3.11 B): pradinėje pirminėje kultūroje ląstelės dalijosi greitai, praėjus pusmečiui pasiekė krizę, kurios metu didžioji dalis kultūros žuvo, o išgyvenusios ląstelės tapo linija, kuri šiuo metu jau yra perėjusi daugiau kaip 80 pasažų (peržengusi Hayflick' o limitą). Išvesta linija gali būti sėkmingai kultivuojama tiek dvimatėje, tiek trimatėje sistemoje (3.11 C-D). Monosluoksniu augdamos ląstelės formuoja epitelinems ląstelėms būdingas saleles, o užsėtos ant neadhezivaus paviršiaus – netaisyklingos formos agregatus. Ląstelių ciklo trukmė yra ilga –  $74 \pm 1$  val. (3.11 pav. E).



**3.11 pav.** Capan-26 ląstelių išvedimas ir augimo charakteristikos. A. Klinikopatologiniai pacientės, iš kurios naviko buvo išvesta Capan-26 ląstelių linija, duomenys. B. Capan-26 ląstelių išvedimo procesas. C. Reprezentaciniai šviesinės mikroskopijos ląstelių vaizdai, rodantys ląstelių morfologiją kultivavimo eigoje. Mastelio juosta – 50  $\mu$ m. D. Ląstelių morfologija trimatėje sistemoje (ant neadhezivaus paviršiaus). Mastelio juosta – 50  $\mu$ m. E. Capan-26 ląstelių augimo kreivė. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3.

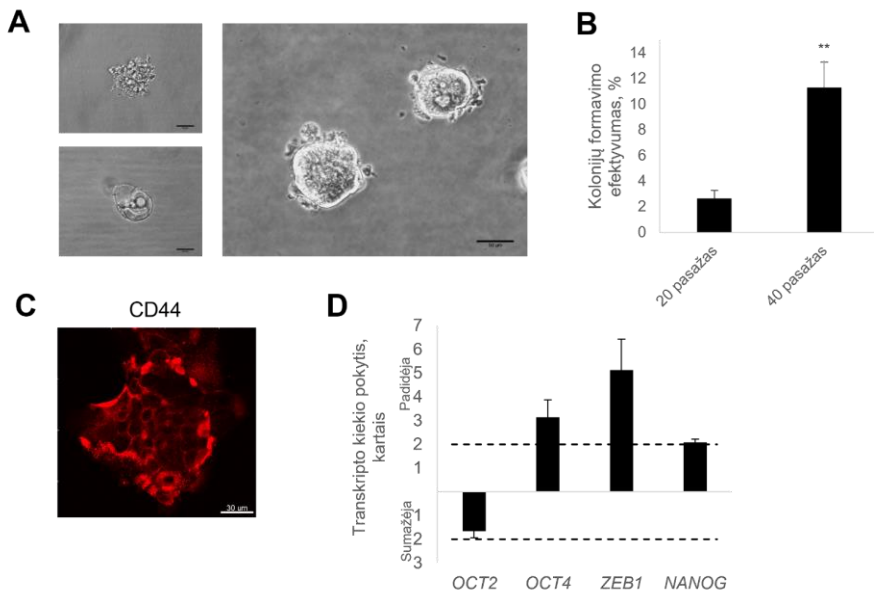
### 3.6.2. Vėžio žymenų detekcija ir kamieniškumas

Vienas iš vėžiškumo ir kamieniškumo patvirtinimo metodų naujai išvestoje ląstelių linijoje yra žymenų raiškos tyrimas. Tai gali būti atliekama mikroskopiškai, *Western blot* arba kiekybinės PGR metodais. Konfokalinės mikroskopijos metodu nustatyta, kad Capan-26 ląstelės ekspresuoja kasos vėžinio audinio žymenis CEACAM6 (Duxbury *et al.*, 2005) ir CA19-9 (Magnani *et al.*, 1982). Įdomu tai, kad šių baltymai detektuojami tik monosluoksnyje agregatus formuojančiose arba trimatėje sistemoje augančiose ląstelėse (3.12 A-B). Imunofluorescencinė analizė parodė abiejų žymenų lokalizaciją ląstelių membranose, tačiau gali būti ir taip, kad mikroskopu detektuojama ne tik membraninių, bet ir iš ląstelių išskirtų ir iš trimačio agregato nespėjusių difunduoti baltymų fluorescencija. Taip pat konfokaliniu mikroskopu Capan-26 ląstelėse aptikti epiteliniai žymenys E-kadherinas ir citokeratinai 5/6/18 (3.12 pav. C). *Western blot* analizė parodė, kad daugiausiai šiose ląstelėse ekspresuojama citokeratino 18 (3.12 pav. D).



**3.12 pav.** Capan-26 ląstelės ekspresuoja kasos vėžio ir epitelinių ląstelių žymenis. A. CEACAM6 ir CA19-9 imunofluorescencinė analizė dvimatėje (2D) ląstelių kultūroje. Ląstelių branduoliai dažyti DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolu). Mastelio juosta – 40  $\mu$ m. B. CEACAM6 ir CA19-9 imunofluorescencinė analizė trimatėje (3D) ląstelių kultūroje. Mastelio juosta – 30  $\mu$ m. C. E-kadherino ir citokeratinų 5/6/18 imunofluorescencinė analizė. Mastelio juosta atitinkamai 40 ir 30  $\mu$ m. D. Citokeratinų nustatymas Capan-26 ląstelėse *Western blot* metodu. 2D, dvimatė ląstelių kultūra (monosluoksnis); 3D, trimatė ląstelių kultūra (sferoidas).

Capan-26 ląstelių kamieniškumo įvertinimui naudotas minkštojo agaru testas. Rezultatai parodė, kad anoikiui atspari ląstelių populiacija vėlyvesniuose pasažuose išauga apie tris kartus (3.13 pav. A-B). Įdomu tai, kad ankstyvesniuose pasažuose nedidelė dalis kolonijų pasižymi tipine mucinus sekretuojančioms ląstelėms būdinga cistos (Hamburger ir Salmon, 1977) arba agregato morfologija, bet vėlyvesniuose pasažuose daugumos ląstelių formuojamos sferos yra kompaktiškos. Be to, Capan-26 ląstelės ekspresuoja kamieninių ląstelių žymenį CD44 (3.13 C), o kiekybinės PGR metodu palyginus kamieniškumo žymenų transkriptų kiekį monosluoksniu ir trimatėje sistemoje augančiose ląstelėse nustatyta, kad trimatėje kultūroje *OCT4* ir *ZEB1* raiška reikšmingai padidėja (3.13 pav. D).



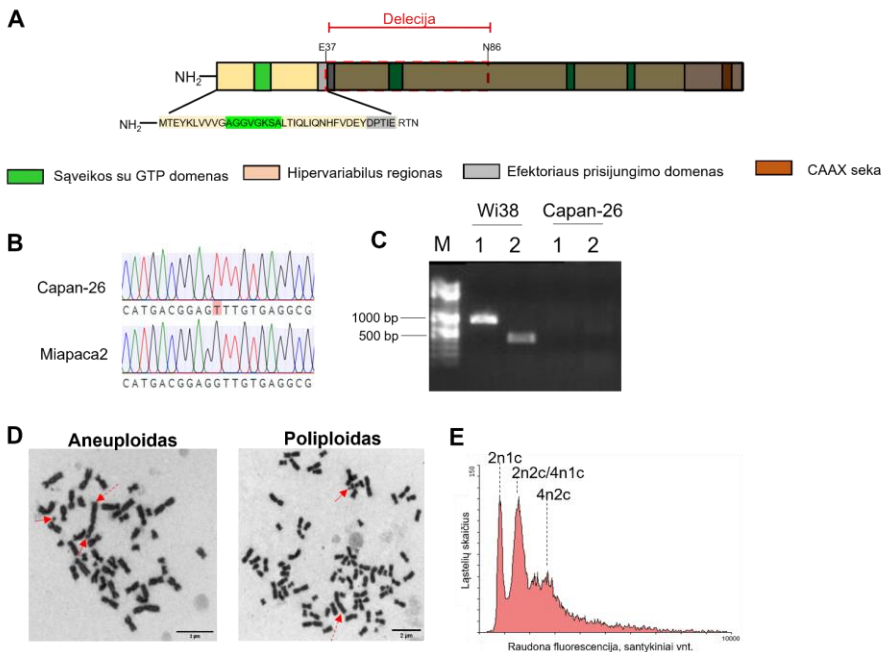
**3.13 pav.** Capan-26 ląstelės pasižymi kamieninių ląstelių savybėmis. A. Minkštojo agaru testo metu susiformuojančios trijų skirtingų morfologijų ląstelių kolonijos: agregato (kairėje pusėje, viršuje), cistos (kairėje pusėje, apačioje) ir kompaktiškos sferos (dešinėje). Mastelio juosta – 50  $\mu$ m. B. Kolonijų formavimo efektyvumo palyginimas ankstyvesniame (20-ajame) ir vėlyvesniame (40-ajame) ląstelių pasaže. C. CD44 imunofluorescencinė analizė Capan-26 ląstelėse. Mastelio juosta – 30  $\mu$ m. D. Kamieniškumo žymenų raiška trimatėje Capan-26 ląstelių kultūrose. Reikšmingu laikytas didesnis nei 2 kartų geno raiškos pokytis. Genų raiška normuota pagal atskaitos geno *TBP* ir atitinkamų genų raišką monosluoksniu augančiose ląstelėse. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*\*P<0,01, lyginant su 20-ojo pasažo ląstelėmis.

### 3.6.3. Mutacijų paieška ir kariotipavimas

Dažniausiai kasos vėžio ląstelėse aptinkamos *KRAS* (77% atvejų), *TP53* (63%), *SMAD4* (22%) ir *CDKN2A* (16%) genų mutacijos (Hu *et al.*, 2021). *KRAS* geno sekvenavimas parodė, kad šeštadalis Capan-26 ląstelių (3 iš 18

tirtų klonų) turi *KRAS* geno trečiojo egzono deleciją. Tai nestandartinė *KRAS* mutacija, nes šiam onkogenui paprastai būdingos taškinės mutacijos (Galie, 2019). Įvykus delecijai, lieka transkribuojamas tik 40-ies aminorūgščių peptidas, kurio gebėjimas atlikti K-RAS baltymo funkcijas būtų abejotinas (3.14 pav. A). Be *KRAS*, buvo ieškota ir vėžio supresoriaus *TP53* mutacijų. Tam buvo sekvenuoti *TP53* geno regionai, koduojantys sąveikos su DNR domeną, nes jame dažniausiai aptinkamos mutacijos vėžio atveju (Silva *et al.*, 2018). *TP53* 5-ame egzone rasta taškinė mutacija V172F (G→T) (3.14 pav. B). Duomenų bazės COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) duomenimis, ši mutacija yra nustatyta storosios žarnos, plaučių, stemplės, tulžies latakų ir kepenų vėžio audiniuose, tačiau apie kasos vėžį literatūrinių duomenų nėra. Neaptikus onkogeno *SMAD4* raiškos Capan-26 ląstelėse (3.14 pav. C), jo mutacijos netirtos.

Capan-26 ląstelių kariotipinė analizė parodė, kad linija yra mišri populiacija, sudaryta iš aneuploidų (vidutiniškai 44 chromosomos, 50% populiacijos) ir pseudotetraploidų (vidutiniškai 77 chromosomos, 50% populiacijos) (3.14 pav. D). Visose analizuotose metafazinėse plokštelėse buvo nustatyta viena translokacija ir 1-2 markerinės chromosomos. Poliploidiškas patvirtintas ir atlikus ląstelių analizę tėkmės citometru (3.14 pav. E).



**3.14 pav.** Capan-26 ląstelės turi su vėžiu siejamų genų mutacijas ir pasižymi chromosomų nestabilumu. A. Schematinė *KRAS* geno delecijos reprezentacija. Paveikslėlyje pavaizduoti geno koduojami baltymo domenai, apačioje parodytas po delecijos likęs transkribuojamas peptidas. B. *TP53* geno sekvenavimo histrogramos, parodančios ląstelių turimą taškinę mutaciją. Miapaca2 ląstelės naudotos kaip neigiama

kontrolė. C. *SMAD4* raiškos tyrimas DNR elektroforezės metodu. Teigiamos raiškos atveju tikėtasi 891 bp (1 takelis) ir 398 bp (2 takelis) produktų. M takelis – markeris. Wi38 ląstelės naudotos kaip teigiama kontrolė. D. Capan-26 aneuploidinių ir pseudotetraploidinių ląstelių metafazinių plokštelių reprezentaciniai vaizdai. Punktyrinė rodyklė žymi translokaciją, ištisinė – markerines chromosomas. Mastelio juosta – 2 μm. E. Capan-26 ląstelių pasiskirstymas pagal DNR kiekį, rodantis skirtingo ploidiškumo populiacijas. Ląstelės fiksuotos etanoliu ir dažytos PI, tėkmės citometru registruota prie DNR prisijungusio PI fluorescencija (raudonas kanalas).

#### 3.6.4. Jautrumo chemoterapiniams preparatams įvertinimas

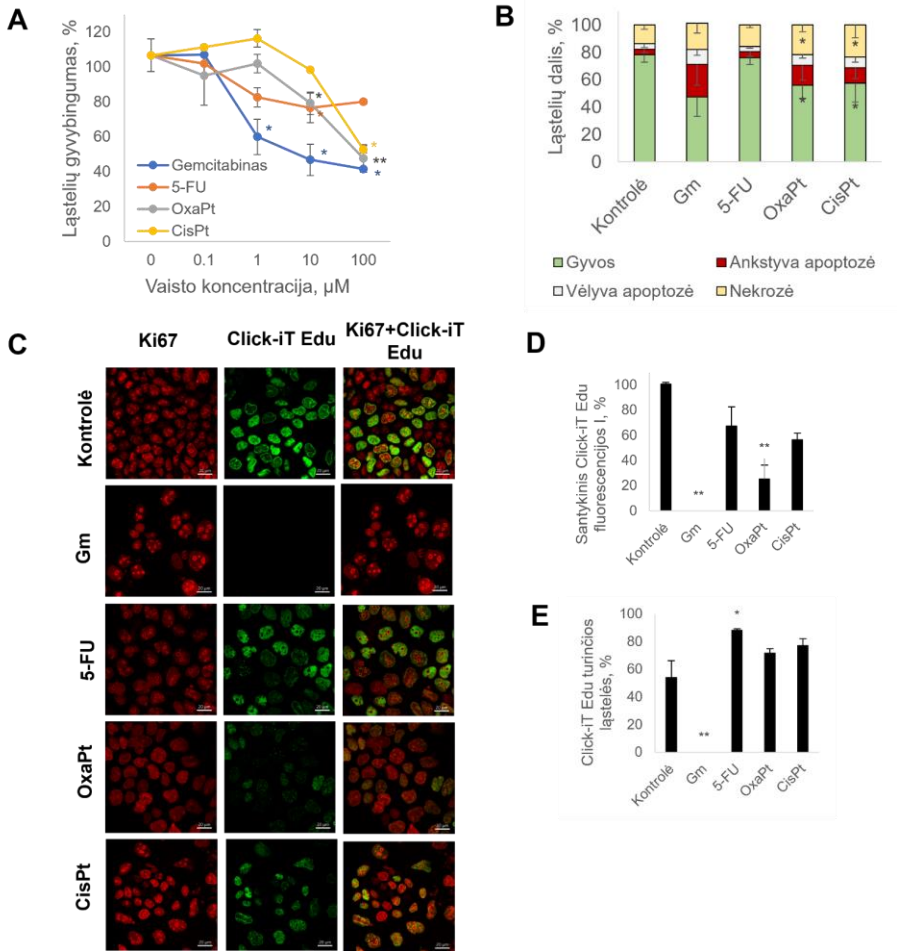
Capan-26 ląstelių jautrumas kasos vėžiui gydyti klinikoje naudojamiems vaistams tirtas MTT testu (3.15 pav. A) ir tėkmės citometrijos metodu nustatant gyvų, apoptozinių ir nekrozių ląstelių populiacijas (3.15 pav. B). Kadangi tradicinė tėkmės citometrija Capan-26 ląstelių ciklo analizei netiko (3.14 E pav. matome, kad aneuploidinių G2/M fazėje esančių ląstelių nebūtų galima atskirti nuo pseudotetraploidinių ląstelių, esančių G0/G1 fazėje), buvo pasirinktas kitas metodas: ląstelės buvo inkubuotos su fluorescuojančiu modifikuotu timidino analogu Edu, o vėliau konfokaliniu mikroskopu buvo vertinama ląstelių, esančių S ciklo fazėje ir įjungusių Edu į DNR, dalis (3.15 pav. C-E). Eksperimentuose naudoti vaistai gemcitabinas (Gm), 5-fluoruracilas (5-FU), oksaliplatinas (OxaPt) ir cisplatinas (CisPt). Jautriausiai Capan-26 ląstelės reagavo į gemcitabiną, kuris jose sukėlė apoptozę ir kardinaliai sumažino ląstelių S ciklo fazėje dalį. Nors *TP53* geno V172F mutacija kiaušidžių vėžio ląstelėms suteikia atsparumą CisPt (X. Xie *et al.*, 2016), Capan-26 ląstelės buvo vidutiniškai jautrios šiam vaistui ir jo analogui OxaPt, šie vaistai taip pat sėkmingai sukėlė apoptozę ir sumažino Edu inkorporavimo į DNR efektyvumą. 5-FU Capan-26 ląstelės buvo atsparios, todėl labai įdomu tai, kad po operacijos pacientei buvo paskirta FOLFIRINOX adjuvantinė chemoterapija, kurios vienas iš komponentų yra 5-FU.

Apibendrinant, iš naviko pooperacinės medžiagos išvesta ląstelių linija Capan-26 yra vėžinė ląstelių linija, turinti kamieninių ląstelių savybių ir išsiskirianti unikaliu genetiniu profiliu.

#### 3.7. Ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčių įtakos jautrumui ferroptizei įvertinimas

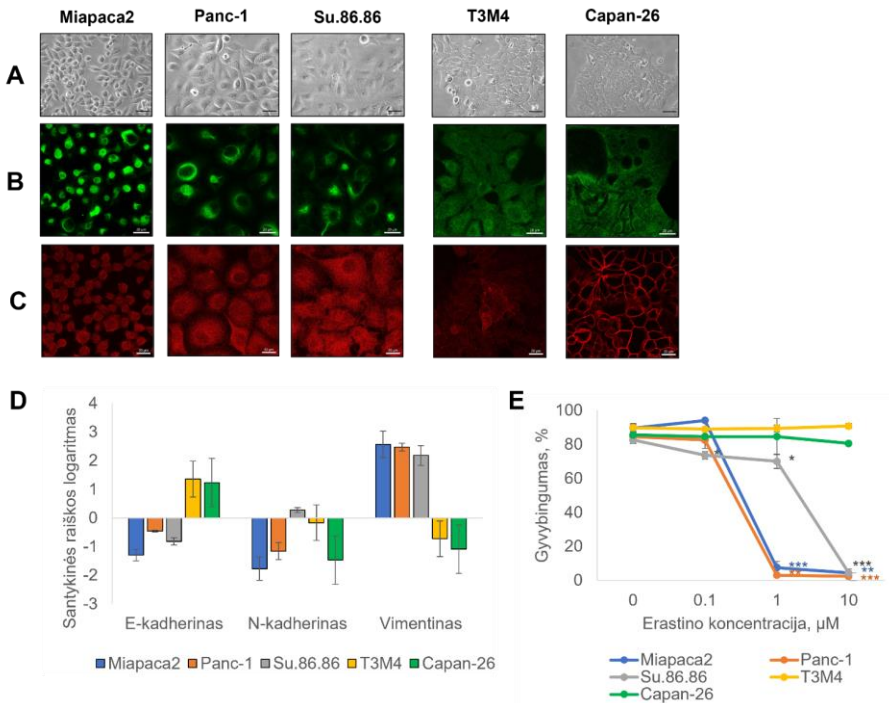
Kaip jau minėta, augimo veiksnių trūkumas didžiausią įtaką turėjo dviejų ląstelių linijų – Miapaca2 ir Capan-26 – mezenchiminiam fenotipui. Jeigu palygintume mezenchiminį fenotipą visose disertacijoje tirtose ląstelių linijose, pamatytume, kad standartinėmis sąlygomis Miapaca2 ląstelėse mezenchiminė morfologija yra išreikšta stipriausiai ir mezenchimininių ląstelių žymens vimentino kiekis yra didžiausias, o Capan-26 ląstelės, priešingai,

pasizymi epiteline morfologija bei aukštu epitelinių ląstelių žymens E-kadherino lygiu. Panc-1 ir Su.86.86 ląstelės užima tarpinę būseną, o T3M4 linija artimesnė epiteliniam tipui (3.16 pav. A-D). Su mezenchiminio fenotipo laipsniu koreliuoja ir ląstelių jautrumas feroptozės induktoriui erastinui: mezenchimiškesnės linijos yra jautresnės (3.16 pav. E). Atsižvelgiant į tai kilo idėja, kad ląsteles auginant be serumo ir stiprėjant jų mezenchiminiam fenotipui turėtų keistis ir jautrumas erastinui.



**3.15 pav.** Capan-26 ląstelės pasižymi skirtingu jautrumu standartiniams kasos vėžiui gydyti naudojamiems vaistams. A. Ląstelių gyvybingumas po Gm, 5-FU, OxaPt ir CisPt 48 val. poveikio, nustatytas MTT metodu. B. Ląstelių pasiskirstymas pagal žūties kelią praėjus 48 val. po 100  $\mu\text{M}$  vaistų poveikio, vertintas tėkmės citometrijos metodu. Gyvų ląstelių membrana nelaidi PI ir jose nedetektuojama aktyvi kaspazė 3/7, vykstant ankstyvosios apoptozės stadijoms ląstelėse aptinkama aktyvi kaspazė 3/7, bet ląstelių membrana yra nelaidi PI, vėlyvosiose apoptozės stadijose ląstelėse detektuojama ir aktyvi kaspazė 3/7, ir PI, o nekroziųjų ląstelių membranos pralaidžios tik PI. C. Ląstelių dalies S ciklo fazėje tyrimas imunofluorescencijos metodu po 100  $\mu\text{M}$  vaistų poveikio. Ki67 ekspresuojančios ląstelės (raudona fluorescencija) yra cikle, o Click-iT Edu (žalia fluorescencija) įjungiamas į ląstelių DNR tik S ciklo fazėje.

Mastelio juosta – 20  $\mu\text{m}$ . D-E. C dalies kiekybinis vertinimas: D dalyje išreikštas Edu įjungimo į DNR efektyvumas, E dalyje – S fazėje esančių ląstelių populiacijos dalis. Kiekybinis vertinimas atliktas naudojant ImageJ 1.52v (*National Institutes of Health, JAV*) programą. 5-FU, 5-fluoruracilas; CisPt, cisplatina; Edu, 5-etilil-2'-deoksiuridinas; Gm, gemcitabinas; I, intensyvumas; OxaPt, oksaliplatina. Paklaidos:  $\pm\text{SN}$ ,  $n=3$ . \* $P<0,01$ , \*\* $P<0,01$ , lyginant su vaistais neveiktomis ląstelėmis.



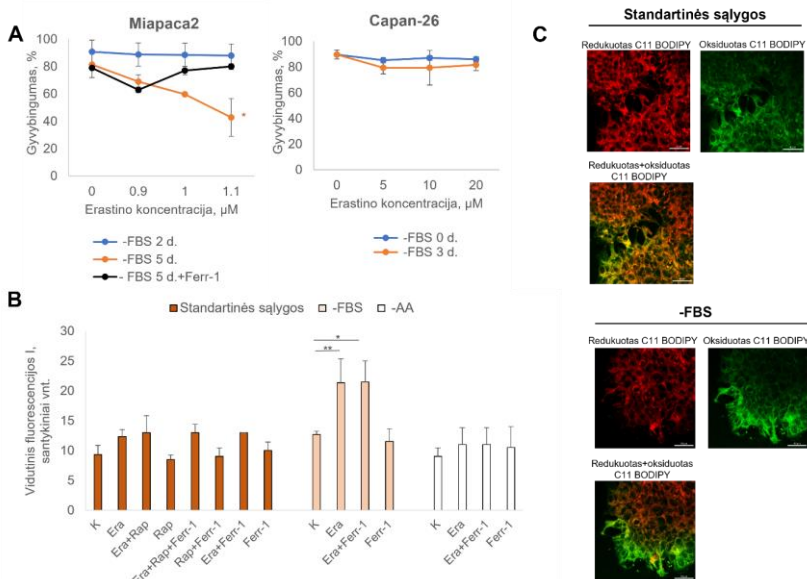
**3.16 pav.** Disertacijoje naudotos kasos vėžio ląstelių linijos pasižymi skirtingu mezenchimiškumo laipsniu ir jautrumui ferroptozės induktoriui erastinui. A. Rezentaciniai kasos vėžio ląstelių šviesinės mikroskopijos vaizdai. Mastelio juosta – 50  $\mu\text{m}$ . B. Vimentino imunofluorescencinė analizė kasos vėžio ląstelėse. Mastelio juosta – 20  $\mu\text{m}$ . C. E-kadherino imunofluorescencinė analizė kasos vėžio ląstelėse. Mastelio juosta – 20  $\mu\text{m}$ . D. Epitelininių ir mezenchimiinių ląstelių žymenų raiška RNR lygmeniu, nustatyta kiekybinės PGR metodu. Genų raiška normuota pagal atskaitos geno *TBP* raišką. E. Kasos vėžio ląstelių gyvybingumas po erastino poveikio. Gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio. Paklaidos:  $\pm\text{SN}$ ,  $n=3$ . \* $P<0,01$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  lyginant su erastinu neveiktomis ląstelėmis.

Siekiant įvertinti mezenchiminio fenotipo pokyčių įtaką kasos vėžio ląstelių jautrumui erastinui, buvo atlikti metabolinio perprogramavimo eksperimentai. Tam buvo išvestos Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių sublinijos, Miapaca2 ląsteles kultivuojant be serumo 2 ir 5 paras, o Capan-26 ląsteles – 3 paras (3.17 pav. A). Laiko taškai buvo pasirinkti pagal ląstelių didžiausio „epiteliškumo“ ir/ar „mezenchimiškumo“ būsenas. Po to ląstelės buvo užsėjamos į įprastą terpę su serumu ir veikiamos erastinu pagal standartinį kituose eksperimentuose naudotą biologinio eksperimento planą. Rezultatai parodė, kad 5 paras augintos be augimo veiksmų Miapaca2 ląstelės tapo 1,5-2 kartus jautresnės erastinui nei kultivuotos be serumo 2 paras. Capan-26



ląstelės tirtuose laiko taškuose buvo erastinui atsparios tiek standartinėmis, tiek badavimo sąlygomis, bet 3 paras be serumo kultivuotas Capan-26 ląsteles paveikus erastinu tėkmės citometrijos metodu nustatytas maždaug dvigubas oksiduotų membranų lipidų kiekio padidėjimas (3.17 pav. B). Tiesa, panašiai kaip ir T3M4 ląstelėse, erastino sukelta lipidų oksidacija nebuvo neutralizuota ferostatino-1. Kaip jau buvo pastebėta anksčiau, mezenchiminę morfologiją įgijo tik tos Capan-26 ląstelės, kurios buvo lokalizuotos augimo salelių pakraščiuose. Todėl nuspręsta atlikti imunofluorescencinę oksiduotų lipidų analizę, kuri leistų tiksliau įvertinti oksiduotų lipidų pasiskirstymą skirtingose salelių vietose augančiose ląstelėse. Oksiduotų lipidų sensoriaus C11 BODIPY 581/591 mikroskopija parodė, kad augimo veiksnio bado sąlygomis salelių pakraščiuose augančių Capan-26 ląstelių membranose vyrauja oksiduoti lipidai, priešingai nei ląstelėse, lokalizuotose toliau nuo salelių kraštų (3.17 pav. C).

Taigi, augimo veiksnio trūkumo paskatinti Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčiai koreliuoja su ląstelių jautrumu ferroptozei: mezenchiminės būsenos ląstelės įgyja jautrumą, o epitelinės būsenos ląstelės – atsparumą erastinui.



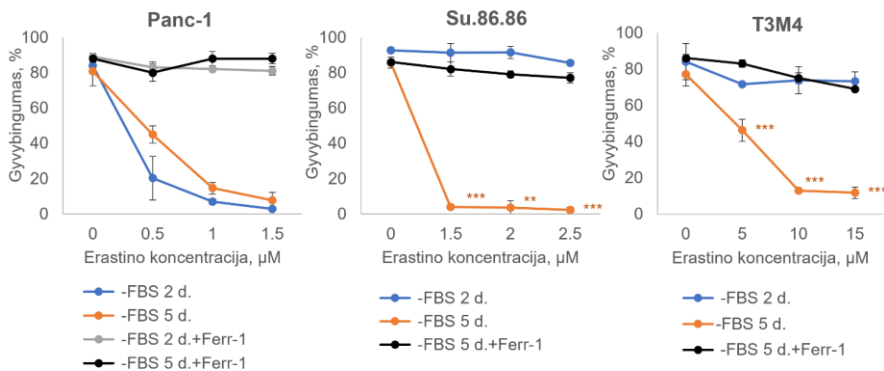
**3.17 pav.** Metabolinis perprogramavimas keičia Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių jautrumą erastinui. A. Erastino poveikis Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių sublinijų, išvestų ląsteles auginant be FBS 2 ir 5 paras, gyvybingumui. B. Badavimo sukelti oksiduotų lipidų kiekio pokyčiai Capan-26 ląstelėse, nustatyti tėkmės citometrijos metodu. C. Oksiduotų ir reduktuotų lipidų pasiskirstymas be augimo veiksnio augančių Capan-26 ląstelių populiacijoje, nustatytas mikroskopijos metodu.



Visais atvejais feroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatiniu-1 (1  $\mu\text{M}$ ). Lipidų oksidacijos tyrimui Capan-26 ląstelės veiktos 20  $\mu\text{M}$  erastino. A ir B dalyse ląstelės veiktos ferostatiniu-1 ir/ar rapamicinu (0,25 nM) 1 val. prieš erastino poveikį. Ląstelių gyvybingumas ir oksiduotų lipidų kiekis membranoje vertintas praėjus 48 val. po poveikio.

-AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; I, intensyvumas; K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės; Rap, rapamicinas. Paklaidos:  $\pm\text{SN}$ ,  $n=3$ . \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , lyginant su 2 arba 0 parų be FBS auginomis ląstelėmis (A dalyje) arba su atitinkamomis kontrolinėmis ląstelėmis (B dalyje).

Nors Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelės, augdamos be augimo veiksnių, nepasižymėjo morfologiniais pokyčiais (3.9 pav), buvo išvestos ir jų analogiškos sublinijos (3.18 pav.). Panc-1 ląstelių, kultivuočių be augimo veiksnių 2 ir 5 paras, jautrumas erastinui stipriai nesiskyrė. Su.86.86 ląstelės po dviejų parų badavimo neįgijo jautrumo erastinui, tačiau kultivuojamos be serumo 5 paras tapo erastinui jautrios. Po 5 parų auginimo be serumo T3M4 ląstelės taip pat įgavo jautrumą erastinui. Įdomiausia, kad erastinas jose sukėlė feroptozę, nors ankstesni duomenys parodė, kad trumpesnis erastino poveikis šiose ląstelėse feroptozės nesukelia.

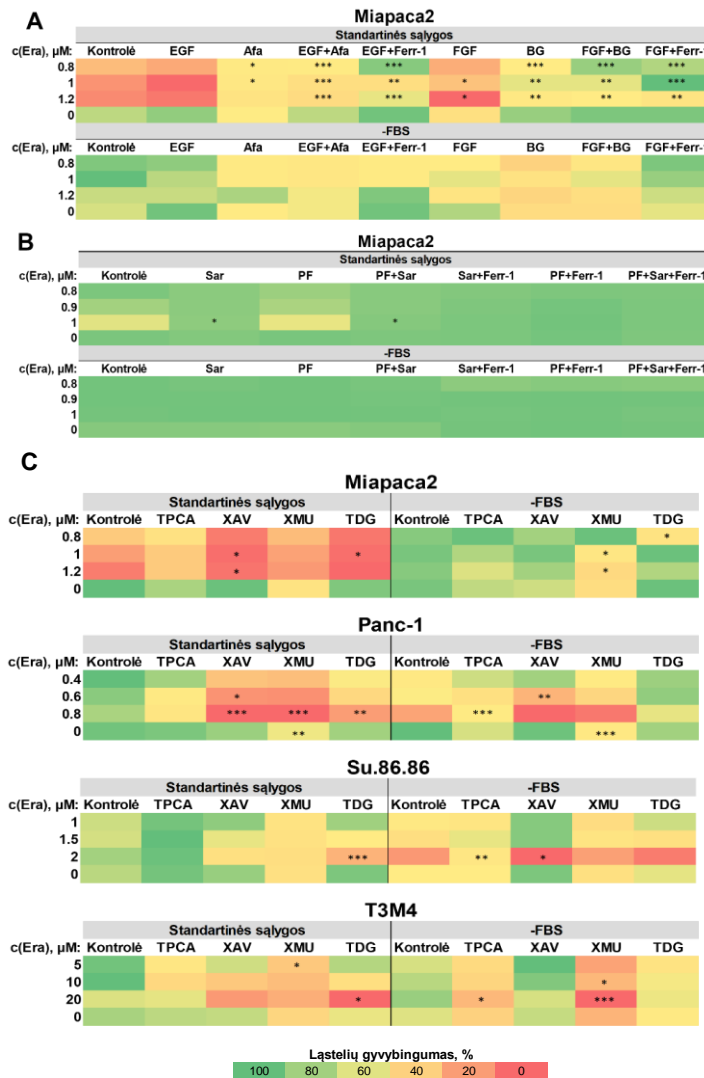


**3.18 pav.** Metabolinis perprogramavimas keičia Su.86.86 ir T3M4, bet ne Panc-1 ląstelių jautrumą erastinui. Erastino poveikis Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių sublinijų, išvestų ląsteles auginant be FBS 2 ir 5 paras, gyvybingumui. -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1. Paklaidos:  $\pm\text{SN}$ ,  $n=3$ . \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ , lyginant dvi ir penkias paras be FBS auginamas ląsteles.

### 3.8. Epitelio-mezenchimos virsmą reguliuojančių junginių poveikis kasos vėžio ląstelių atsparumui feroptozei

Pastarieji duomenys paskatino atlikti epitelio-mezenchimos virsmą (EMT) reguliuojančių priešvėžinių preparatų ir erastino poveikio ląstelių gyvybingumui kombinatorinę analizę. Ląstelių gyvybingumas buvo vertintas dažant ląsteles propidžio jodidu ir tėkmės citometrijos metodu vertinant integralią membraną turinčių ląstelių dalį (gyvybingumą). Kaip ir tikėtasi, EMT sukiantys epidermio augimo veiksnys (EGF) ir fibroblastų augimo

veiksny (FGF) (Gonzalez ir Medici, 2014) padidino Miapaca2 ląstelių jautrumą erastinui standartinėmis sąlygomis, bet neturėjo įtakos ląstelių, augančių be serumo, gyvybingumui (ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po vaistų poveikio – tiek laiko be serumo kultivuotos Miapaca2 ląstelės yra įgijusios fenotipą, artimiausią epiteliniam) (3.19 pav. A).



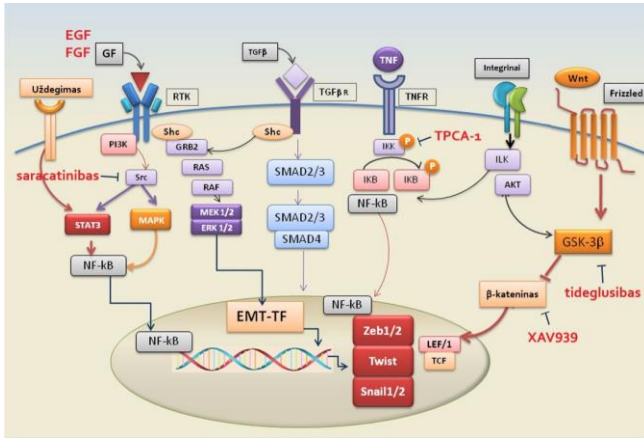
**3.19 pav.** EMT reguliuojantys junginiai gali būti panaudojami erastino citotoksiškumui sustiprinti. A. EMT sukeliančių augimo veiksmų EGF ir FGF poveikis Miapaca2 ląstelių jautrumui erastinui standartinėmis (DMEM+10% FBS) ir augimo veiksmų bado sąlygomis. Afatinibas ir BGJ398 yra atitinkamai EGFR ir FGFR slopikliai. B. EMT slopinančių junginių saracatinibo ir PF573228 poveikis Miapaca2 ląstelių jautrumui erastinui standartinėmis (DMEM+10% FBS) ir augimo veiksmų bado sąlygomis. C. Į EMT procesą nutaikytų priešvėžinių preparatų ir erastino poveikio kasos vėžio ląstelių gyvybingumui kombinatorinė analizė.

Visais atvejais feroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatinu-1 (1  $\mu$ M). Slopikliais ląstelės veiktos 1 val. prieš erastino poveikį. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val. po poveikio.

Afa, afatinibas; BG, BGJ398; EGF, epidermio augimo veiksnys; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; FGF, fibroblastų augimo veiksnys; Ferr-1, ferostatinas-1; PF, PF573228; Sar, saracatinibas; TDG, tideglusibas; TPCA, TPCA-1; XAV, XAV939; XMU, XMU-MP-1; Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, lyginant su atitinkama erastino koncentracija paveiktomis ląstelėmis.

EGF ir FGF sukeltas efektas buvo panaikintas ląsteles paveikus šių augimo veiksnių receptorių slopikliais, atitinkamai afatinibu ir BGJ398. EMT slopinimui buvo pasirinkti du junginiai: klasikinis EMT blokuojantis vaistas Src slopiklis saracatinibas ir jam funkciškai artimas FAK kinazės slopiklis PF573228 (Bolos *et al.*, 2010). Saracatinibas sumažino erastino citotoksiškumą, tačiau PF573228 analogiško poveikio neturėjo, efektyvi buvo tik jo kombinacija su saracatinibu (3.19 pav. B). Galiausiai buvo pasirinkta keletas junginių, kurie nėra klasikiniai anti-EMT junginiai, tačiau slopina tam tikrus signalinius kelius, dalyvaujančius mezenchiminio fenotipo įgijime: NF $\kappa$ B (Huber *et al.*, 2004) signalinio kelio slopiklis TPCA-1, Wnt (Gasior *et al.*, 2017) signalinį kelią moduliuojantys junginiai XAV939 ir tideglusibas bei Hippo (Diepenbruck *et al.*, 2014) signalinio kelio slopiklis XMU-MP-1. Wnt ir Hippo signalinių kelių slopikliai sustiprino erastino poveikį, tačiau kai kuriais atvejais buvo stebimas bifazinis slopiklio veikimas, pavyzdžiui, esant silpnam erastino poveikiui be serumo augančiose Panc-1, Su.86.86 ląstelėse XAV939 suteikia atsparumą, o paveikus aukštesnėmis erastino koncentracijomis prasideda junginių sinergija ir ląstelių gyvybingumas mažėja. Išskirti reikėtų tideglusibo ir erastino kombinaciją, kuri pasižymėjo stipriu citotoksiniu poveikiu standartinėmis sąlygomis visose tirtose linijose, netgi epitelinio tipo T3M4 ląstelėse, kurios iš principo erastinui yra atsparios.

Apibendrinant, galima teigti, kad kasos vėžio ląstelių jautrumas feroptozei gali būti valdomas ir padidinamas panaudojant EMT procesą reguliuojančius junginius. Eksperimentuose naudotų junginių vaidmuo EMT proceso signaliniuose keliuose pavaizduotas 3.20 pav.



3.20 pav. EMT valdantys signaliniai keliai. EMT moduliacijos eksperimentuose naudoti junginiai parašyti raudonu šriftu. Pagal (Sisto *et al.*, 2018).

## DISKUSIJA

Oksidacinis stresas glūdi kasos vėžio prigimtyje, kadangi pagrindiniai kasos vėžio sukėlėjai – rūkymas, alkoholio vartojimas ir pankreatitas – generuoja ROS, kurios paskatina piktybinių kasos pažaidų atsiradimą (Liou *et al.*, 2016, Palmieri *et al.*, 2007). Yra du būdai nužudyti ląsteles, prisitaikiusias prie pastovaus oksidacinio streso: sutrikdyti įprastą ląstelių metabolizmą staigiai sumažinant jose esantį ROS kiekį arba priešingai – ROS kiekį didinti, tikintis peržengti toleruojamą ribą. Kitaip tariant, egzistuoja antioksidacinės ir prooksidacinės vėžio terapijos (Wang ir Yi, 2008). Nors abi šios strategijos išbandytos kasos vėžio gydyme (Martinez-Useros *et al.*, 2017), disertacijoje gilintasi į antrąją – ROS kiekio ląstelėse didinimą. Šiame darbe siūloma kasos vėžį gydyti ląstelėse sukeltant neseniai atrastą žūties formą – ferroptozę. Ferroptozės metu ląstelės žūsta nuo membranos lipidų oksidacijos, kurią lemia sutrikusi geležies apykaita ir glutationo peroksidazės 4 (GPX4) neveiklumas. Ferroptozė yra unikali ląstelės žūtis, kuri morfologiškai ir biochemiškai skiriasi nuo klasikinių ląstelės žūties būdų – apoptozės, nekrozės ar autofagijos. Nuo pat atradimo 2012 m. ferroptozė sulaukė nemažai mokslinės bendruomenės dėmesio, ji tirta tiek vėžio, tiek širdies ir neurodegeneracinių ligų kontekste (Y. Xie *et al.*, 2016). Vienas iš svarbiausių pastarųjų metų atradimų yra tas, kad ferroptozė gali padėti įveikti kasos vėžio atsparumą gemcitabinui, standartiniam kasos vėžiui gydyti klinikoje naudojamam vaistui (Zhu *et al.*, 2017).

Ląstelių jautrumas ferroptozei priklauso nuo jų metabolinio perprogramavimo, kurį kasos vėžio atveju gražiai iliustruoja „priklausomybės“ nuo gliukozės ir glutamino (angl. *glucose and glutamine addiction*) pavyzdys. Cistino-glutamato antiporteris  $x_c^-$  vykdo cistino ir glutamato mainus: į ląstelę įnešdamas vieną cistino molekulę, jis kartu iš ląstelės išneša vieną glutamato molekulę. Ląstelėje cistinas greitai redukuojamas iki cisteino ir naudojamas glutationo biosintzei. Cistino redukcijai reikalingas NADPH, kuris yra sintetinamas iš gliukozės (gliukozės 6-fosfato) pentozų fosfato kelio metu. NADPH taip pat naudojamas oksiduoto glutationo redukcijai. Ląstelės, kuriose yra padidėjusi  $x_c^-$  komponento SLC7A11 raiška, pasižymi didesniu atsparumu ferroptozei dėl aukštesnio redukuoto glutationo lygio ir didesnio GPX4 aktyvumo. Tačiau atsparumas ferroptozei turi savo kainą: tam, kad patenkintų energijos poreikį ir pateiktų pakankamai glutamato trikarboksirūgščių ciklui, ląstelės turi suaktyvinti glutamato įnašą. Dažniausiai į ląstelę glutamatas patenka glutamino pavidalu. Tokiu būdu atsparumas ferroptozei tampa neišvengiamai

susietas su priklausomybe nuo gliukozės ir glutamino (Koppula *et al.*, 2021). Kasos vėžys yra nuo glutamino priklausomas (angl. *glutamine-addicted*) vėžio tipas, nors kasos vėžio ląstelės naudoja netipinius fermentus glutamino metabolizmui, galimai dėl K-RAS valdomo perprogramavimo (Son *et al.*, 2013). Iš šių pastebėjimų kilo idėja, kad priverstinis metabolitų (nebūtinai gliukozės ar glutamino) „badas“ gali turėti įtakos kasos vėžio ląstelių jautrumui ferroptozės induktoriui erastinui.

Šiame darbe gauti rezultatai parodė, kad poveikiai, kurie sukelia arba imituoja badą (augimo veiksmų, mTORC1 aktyvacijai būtinų aminorūgščių L-glutamino, L-lizino ir L-arginino trūkumas augimo terpėje arba mTORC1 slopiklio rapamicino poveikis) nevienodai veikia skirtingų kasos vėžio ląstelių ląsteles: dvi paras badaujančios Miapaca2 ląstelės tampa atsparios ferroptozei, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių jautrumas erastinui padidėja. Kokiais molekuliniais mechanizmais badavimas galėtų valdyti vėžinių ląstelių jautrumą erastinui, nėra tiksliai žinoma. Yra duomenų, kad augimo veiksmų trūkumas sukelia prostatos vėžio ląstelių perėjimą į nesidalijančių (angl. *quiescent*) ląstelių būseną ir padidina antioksidacinį atsaką valdančio transkripcijos veiksnio NF-κB aktyvaciją, taip apsaugant ląsteles nuo oksidacinio streso, bet ne specifiskai ferroptozės (White *et al.*, 2020). Tuo tarpu Lee *et al.* parodė, kad energinis stresas slopina ferroptozę vėžinėse ląstelėse aktyvindamas AMPK kinazę ir riebalų rūgščių metabolizmą (Lee *et al.*, 2020). Tiesa, kai kurių rūšių ląstelėse, augančiose be augimo veiksmų, AMPK aktyvacijai būtinas palaipsnis ROS kaupimasis (Wu *et al.*, 2013). Šioje disertacijoje buvo pastebėta, kad, skirtingai nei Panc-1 ir Su.86.86, Miapaca2 ląstelių linijoje augimo veiksmų ir mTORC1 aktyvacijai būtinų aminorūgščių trūkumas padidina GSH kiekį. Vadinasi, Panc-1 ir Su.86.86 ląstelių antioksidacinis atsakas yra silpnesnis, o tai paaiškina jautrumo ferroptozei skirtumus. Be to, Sato *et al.* yra parodę, kad lizino, arginino ir kitų aminorūgščių trūkumas padidina cistino įnašą į ląstelę ir  $x_c^-$  antiporterinės sistemos komponentų raišką (Sato *et al.*, 2004). Šie duomenys paremia disertacijos rezultatus, rodančius, jog aminorūgščių trūkumas padidina Miapaca2 ląstelių atsparumą erastinui. Didžiausią įtaką Panc-1 ir Su.86.86 ląstelių gyvybingumui po erastino poveikio turėjo ir labiausiai ląstelių jautrumą padidino pseudobadavimas – mTORC1 slopiklio rapamicino poveikis. Nei šiose, nei Miapaca2 ląstelių linijoje abiejų mTOR kompleksų slopiklis INK128 analogiško rapamicinui efekto neturėjo. Tai pasufleravo, kad rapamicinas ląstelių jautrumą valdo ne tiesiogiai, o grįžtamojo ryšio principu per mTORC2, kuomet po rapamicino poveikio slopinama S6K ir taip netiesiogiai aktyvinamas jos taikinyš Rictor bei mTORC2 (Formisano *et al.*,

2020). Gu *et al.* yra parodę, kad aktyvus mTORC2 slopina cistino įnašą (Gu *et al.*, 2017). Tuo būtų galima paaiškinti, kodėl rapamicinas padidino Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelių jautrumą erastinui. Be to, vienas iš mTORC2 perduodamo signalo tolimesnių tarpininkų yra kinazė ERK1/2 (Carracedo *et al.*, 2008). Disertacijoje buvo parodyta, kad, priešingai anksčiau gautiems duomenims (Soares *et al.*, 2013), ERK1/2 išties yra pernešama į badaujančių Miapaca2, Panc-1 ir Su.86.86 ląstelių branduolį, o farmakologinis ERK1/2 slopinimas apsaugo kasos vėžio ląsteles nuo erastino sukeltos ferroptozės. Be to, šio darbo rezultatai atskleidė, kad badavimo sukeltus atsparumo erastinui pokyčius kasos vėžio ląstelėse valdo ir kita kinazė – JNK, kuri taip pat yra aktyvinama (fosforilinama) (pseudo)badaujančiose kasos vėžio ląstelėse. Eksperimentų rezultatai parodė, kad oksidacinį stresą patiriančiose kasos vėžio ląstelėse JNK gali veikti dvejopai: standartinėje terpėje augančiose Panc-1 ląstelėse JNK slopinimas sustiprino ferroptozę, o bado sąlygomis JNK slopinimas apsaugojo ląsteles nuo erastino citotoksiškumo. Antioksidacinės JNK slopiklio SP600125 savybės taip pat pasireiškė ir Miapaca2 ląstelėse. Prooksidacinis JNK veikimas buvo pastebėtas ir anksčiau, tačiau daugiausiai ne vėžinėse, o sveiko audinio ląstelėse vykstant apoptozei (Hanawa *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009, Win *et al.*, 2015). Ferroptozės kontekste yra parodyta, kad P38 ir JNK aktyvacija padidina NOX4 raišką ir sukelia kasos salelių ląstelių (angl. *pancreatic islet cells*) žūtį (Li ir Leung, 2020). Taip pat neseniai buvo nustatyta, kad JNK ferroptozę gali paskatinti ir slopindama GPX4 (Y. Yang *et al.*, 2021). Visgi, nė vienas iš šių mechanizmų nebuvo tiesiogiai susietas su ląstelių badavimu, kaip tai buvo padaryta šioje disertacijoje.

Svarbu paminėti, kad disertacijos darbuose buvo naudotos ne tik pastovios (kataloginės) kasos vėžio ląstelių linijos, bet ir unikali doktorantūros metu išvesta kasos vėžio ląstelių linija Capan-26, geriau reprezentuojanti pirminį kasos naviką. Capan-26 yra pirmoji kasos vėžio ląstelių linija, išvesta iš Lietuvos pilietės kasos naviko pooperacinės medžiagos. Linijos išvedimo procesas nebuvo lengvas, o jo efektyvumas siekė 4%. Bendrame kontekste tai nėra neįprasta: literatūriniais duomenimis, kasos vėžio ląstelių linijų išvedimo procesą retai lydi didesnė nei 10% sėkmė (Kim *et al.*, 2017, Ruckert *et al.*, 2012). Ląstelių linijos išvedimo sėkmingumas kritiškai priklauso nuo to, kaip lengvai pavyksta suardyti naviko audinį ir išskirti ląsteles, o kasos navikai yra vieni sunkiausiai suardomų. Be to, yra žinoma, kad naviko stromos ląstelės, pavyzdžiui, su vėžiu asocijuoti (angl. *cancer-associated*) fibroblastai, daug lengviau prisitaiko prie *in vitro* aplinkos (Miserocchi *et al.*, 2017), todėl greitai pradeda dominuoti ląstelių kultūroje ir užgožia vėžines ląsteles. Šis reiškinys,

dar žinomas kaip „fibroblastų praaugimas“ (angl. *fibroblast outgrowth*), buvo viena pagrindinių problemų išvedinėjant kasos vėžio ląstelių linijas, ypač turint omenyje tai, kad kasos navikuose stromos ląstelės sudaro didžiąją dalį ląstelių populiacijos (Waghray *et al.*, 2013).

Capan-26 ląstelės buvo pilnai charakterizuotos *in vitro*: nustatyta jų ciklo trukmė, vėžinių ir kamieninių ląstelių žymenų raiška, kolonijų formavimo efektyvumas, su vėžiu siejamų genų *KRAS* ir *TP53* mutacijos, ląstelių kariotipas ir jautrumas chemoterapiniams kasos vėžiui gydyti naudojamiems preparatams. Įdomu buvo tai, kad kasos vėžio žymenis CEACAM6 ir CA-19-9 ekspresavo tik trimatėje sistemoje augančios Capan-26 ląstelės. Yra žinoma, kad padidėjusi CEACAM6 raiška kasos vėžio ląstelėms suteikia atsparumą anoikiui (Duxbury *et al.*, 2004) ir sukelia EMT (Chen *et al.*, 2013), kas paaiškintų jo aptikimą trimatėse kultūrose. Tokiose ląstelėse taip pat yra padidėjusi ZEB1 OCT4, klasikinių EMT ir kamieniškumo žymenų, raiška (Krebs *et al.*, 2017, Mohiuddin *et al.*, 2020). Kamieninėmis savybėmis pasižyminčių ir anoikiui atsparių ląstelių populiacija vėlyvesniuose pasažuose išaugo. Taip pat nustatyta, kad Capan-26 ląstelės yra aneuploidų ir poliploidų mišinys. Poliploidija nėra retas reiškinys kasos vėžio ląstelių linijose: Miapaca2, Capan-2, Panc-1 ląstelėse vidutiniškai randama 60-70 chromosomų. Visgi, Capan-26 ląstelės yra itin unikalios pagal kitą genetinę charakteristiką – mutantinį statusą. Ląstelėse rasta onkogeno *KRAS* 3 egzono delecija ir vėžio supresoriaus *TP53* taškinė mutacija V172F, nė viena iš šių mutacijų kasos vėžio kontekste (arba apskritai, *KRAS* delecijos atveju) nebuvo aprašyta mokslinėje literatūroje anksčiau.

Augimo veiksnų badas imituoja sąlygas, su kuriomis vėžinės ląstelės susiduria didesniuose navikuose prieš susiformuojant kraujagyslių tinklui. Prastas metabolitų pralaidumas ir ribotas maisto medžiagų patekimas į gilesnius naviko sluoksnius yra būdinga kasos navikų savybė (Kamphorst *et al.*, 2015). Yra žinoma, kad augimo veiksnų trūkumas gali paskatinti naviko metastazavimą (Chen *et al.*, 2010, Conacci-Sorrell *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2013, Tong *et al.*, 2019). Auginimas be serumo išties sustiprino dviejų kasos vėžio ląstelių linijų Miapaca2 ir Capan-26 mezenchiminį fenotipą: ląstelės įgijo fibroblastišką morfologiją, padidino mezenchiminių arba sumažino epitelinių žymenų lygį, taip pat padidėjo Miapaca2 ląstelių judrumas *in vitro* sistemoje. Badaujančios Miapaca2 ląstelės iš mezenchiminio tipo perėjo į epitelinį, o po to vėl grįžo į mezenchiminį. Epitelinė būseną pasižymėjo didžiausiu atsparumu erastinui, o mezenchiminė – didžiausiu jautrumu. Capan-26 ląstelių linijoje mezenchiminės savybės įgijo tik dalis populiacijos ląstelių, tačiau jose kartu su mezenchiminio fenotipo pokyčiais stipriai padidėjo ir oksiduotų



membranos lipidų kiekis. Auginimo be serumo sukelti ląstelių jautrumo erastinui pokyčiai gali būti aiškinami priklausomybės receptorių (angl. *dependence receptors*) koncepcija (Stone, 2020). Šie receptoriai įprastinėje būsenoje yra neaktyvūs, o aktyvinami tik jų ligandų koncentracijai ląstelių augimo aplinkoje peržengus tam tikrą slenkstinę vertę. Ląsteles ilgesnį laiką kultivuojant be serumo, ši slenkstinė vertė galėtų būti peržengiama dėl parakrininės arba autokrininės stimuliacijos, o receptorių perduodamas signalas sukeltų mezenchiminio fenotipo ir jautrumo erastinui pokyčius. Žvelgiant iš evoliucinės perspektyvos, galima spekuliuoti, kad stromos ląstelės, įgijusios epitelinių savybių ir sustiprinusios tarpusavio sąveikas, galėtų suformuoti „skydą“, kuris apsaugotų naviko gilumoje glūdinčias vėžio kamienines ląsteles nuo oksidacinio streso. Taip navikui liktų galimybė po tam tikro laiko atsinaujinti.

Patvirtinus ląstelių mezenchiminio fenotipo ir jautrumo erastinui koreliacijas, nuspręsta patikrinti epitelio-mezenchimos virsmą (EMT) valdančių junginių poveikį kasos vėžio ląstelių jautrumui erastinui. Kaip ir tikėtasi, nustatyta, kad EMT skatinantys augimo veiksniai EGF ir FGF padidina Miapaca2 ląstelių jautrumą erastinui, o EGFR ir FGFR slopinimas šį efektą pilnai pašalina. Klasikinis anti-EMT vaistas Src kinazės slopiklis saracatinibas apsaugo Miapaca2 ląsteles nuo feropozės. Galiausiai, parodyta, kad Wnt ir Hippo signalinių kelių reguliatoriai XAV939, tideglusibas ir XMU-MP-1 padidina ląstelių jautrumą erastinui. Kai kuriais atvejais (pavyzdžiui, XAV939) buvo stebimas bifazinis slopiklio veikimas, kuomet esant nedidelei erastino koncentracijai slopiklis suteikia atsparumą, o esant aukštesnei prasideda junginių sinergija ir ląstelių gyvybingumas mažėja. Išskirti reikėtų tideglusibo ir erastino kombinaciją, kuri pasižymėjo stipriai citotoksinu poveikiu visose tirtose kasos vėžio linijose, netgi epitelinio tipo T3M4 ląstelėse, kurios iš principo erastinui buvo atsparios. Tideglusibas slopina GSK-3, kuri slopina  $\beta$ -kateniną. Yra duomenų, kad slopindamas genų, kurių produktai dalyvauja tarpląstelių jungčių sudaryme, raišką,  $\beta$ -kateninas stiprina ląstelių mezenchiminio fenotipo raišką ir aktyvina EMT (Kim *et al.*, 2019), o po tideglusibo poveikio  $\beta$ -kateninas lieka aktyvus. Tad ląstelių jautrumas erastinui galėtų padidėti dėl potencialiai stipriau išreikšto jų mezenchiminio fenotipo.

Pastaraisiais metais badavimu pagrįstos priešvėžinės terapijos (angl. *starvation-based anticancer therapies*) sulaukė nemažai dėmesio. Gydant vėžį, naviką „badauti“ galima priversti keliais būdais: veikiant angiogenezę slopinančiais junginiais, suardant naviko kraujagyslių tinklą, tiesiogiai skaidant maisto medžiagas navike arba veikiant junginiais, sukeliančiais

pseudobadavimą, pavyzdžiui, mTOR signalinio kelio arba augimo veiksmų receptorių slopikliais (Chan *et al.*, 2017, Coppock *et al.*, 2016, Demkova ir Kucerova, 2018, Yu *et al.*, 2019). Badavimą ir oksidacinį stresą sukeliančių priešvėžinių terapijų efektyvumas buvo patvirtintas ir *in vitro*, ir *in vivo* (D'Aronzo *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2019, Ranji-Burachaloo *et al.*, 2019). Šiame darbe gauti duomenys parodo, kad kasos vėžio ląstelėse, tiek pastoviose (kataloginėse), tiek unikalioje ląstelių linijoje, badavimas valdo jautrumą ferroptozei per ERK1/2, JNK ir ląstelių mezenchiminio fenotipo pokyčius. Kartu atskleidžiamos naujos terapinės kinazių slopiklių ir ferroptozės induktorių kombinacijų perspektyvos.

## IŠVADOS

1. Naujoje kasos vėžio ląstelių linijoje Capan-26 aptinkami kasos vėžio žymenys, linija pasižymi kamieninių ląstelių savybėmis ir unikaliu genetiniu profiliu;
2. Augimo veiksnių, aminorūgščių L-glutamino, L-lizino ir L-arginino trūkumas ir mTORC1 slopinimas rapamicinu nevienodai veikia tiek pat laiko badavusių kasos vėžio ląstelių jautrumą ferroptozės induktoriui erastinui: Miapaca2 ląstelės tampa atsparesnės, o Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 – jautresnės;
3. ERK1/2 ir JNK kinazės (pseudo)badavimo sąlygomis valdo ląstelių žūtį ferroptozės būdu;
4. Augimo veiksnių trūkumas keičia Miapaca2 ir Capan-26 ląstelių mezenchiminį fenotipą, mezenchiminė būseną pasižymi didesniu jautrumu erastinui, o epitelinė – didesniu atsparumu; Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 linijose augimo veiksnių bado sąlygomis mezenchiminio fenotipo pokyčiai nestebimi;
5. Epitelio-mezenchimos virsmą valdantys junginiai stiprina erastino citotoksiškumą kasos vėžio ląstelėse.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adelman CH, Traunbauer AK, Chen B, Condon KJ, Chan SH, Kunchok T, Lewis CA, Sabatini DM. MFSD12 mediates the import of cysteine into melanosomes and lysosomes. *Nature*, 2020,588(7839):699-704.
2. Agmon E, Solon J, Bassereau P, Stockwell BR. Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci Rep*, 2018,8(1):5155.
3. Altea-Manzano P, Cuadros AM, Broadfield LA, Fendt SM. Nutrient metabolism and cancer in the in vivo context: a metabolic game of give and take. *EMBO Rep*, 2020,21(10):e50635.
4. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)*, 2017,9(11).
5. Andrzejewski S, Klimcakova E, Johnson RM, Tabaries S, Annis MG, McGuirk S, Northey JJ, Chenard V, Sriram U, Papadopoli DJ, Siegel PM, St-Pierre J. PGC-1 $\alpha$  Promotes Breast Cancer Metastasis and Confers Bioenergetic Flexibility against Metabolic Drugs. *Cell Metab*, 2017,26(5):778-87 e5.
6. Annese T, Tamma R, Ruggieri S, Ribatti D. Angiogenesis in Pancreatic Cancer: Pre-Clinical and Clinical Studies. *Cancers (Basel)*, 2019,11(3).
7. Aron AT, Loehr MO, Bogena J, Chang CJ. An Endoperoxide Reactivity-Based FRET Probe for Ratiometric Fluorescence Imaging of Labile Iron Pools in Living Cells. *J Am Chem Soc*, 2016,138(43):14338-46.
8. Avery AM, Willetts SA, Avery SV. Genetic dissection of the phospholipid hydroperoxidase activity of yeast gpx3 reveals its functional importance. *J Biol Chem*, 2004,279(45):46652-8.
9. Bai Y, Meng L, Han L, Jia Y, Zhao Y, Gao H, Kang R, Wang X, Tang D, Dai E. Lipid storage and lipophagy regulates ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019,508(4):997-1003.
10. Bannai S, Ishii T. A novel function of glutamine in cell culture: utilization of glutamine for the uptake of cystine in human fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1988,137(2):360-6.
11. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, Roberts MA, Tong B, Maimone TJ, Zoncu R, Bassik MC, Nomura DK, Dixon SJ, Olzmann JA. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, 2019,575(7784):688-92.
12. Bolos V, Gasent JM, Lopez-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther*, 2010,3:83-97.

13. Brown CW, Amante JJ, Goel HL, Mercurio AM. The alpha6beta4 integrin promotes resistance to ferroptosis. *J Cell Biol*, 2017,216(12):4287-97.
14. Capelletti MM, Manceau H, Puy H, Peoc'h K. Ferroptosis in Liver Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci*, 2020,21(14).
15. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*, 2008,118(9):3065-74.
16. Chan DLH, Segelov E, Wong RS, Smith A, Herbertson RA, Li BT, Tebbutt N, Price T, Pavlakis N. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017,6:CD007047.
17. Chang K, Liu Z, Fang X, Chen H, Men X, Yuan Y, Sun K, Zhang X, Yuan Z, Wu C. Enhanced Phototherapy by Nanoparticle-Enzyme via Generation and Photolysis of Hydrogen Peroxide. *Nano Lett*, 2017,17(7):4323-9.
18. Chaudhary N, Choudhary BS, Shah SG, Khapare N, Dwivedi N, Gaikwad A, Joshi N, Raichanna J, Basu S, Gurjar M, P KS, Saklani A, Gera P, Ramadwar M, Patil P, Thorat R, Gota V, Dhar SK, Gupta S, Das M, Dalal SN. Lipocalin 2 expression promotes tumor progression and therapy resistance by inhibiting ferroptosis in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2021,149(7):1495-511.
19. Chen D, Gao W, Zang L, Zhang X, Li Z, Zhu H, Yu X. Ferroptosis-Related lncRNAs Are Prognostic Biomarker of Overall Survival in Pancreatic Cancer Patients. *Front Cell Dev Biol*, 2022,10:819724.
20. Chen G, Guo G, Zhou X, Chen H. Potential mechanism of ferroptosis in pancreatic cancer. *Oncol Lett*, 2020,19(1):579-87.
21. Chen J, Li Q, An Y, Lv N, Xue X, Wei J, Jiang K, Wu J, Gao W, Qian Z, Dai C, Xu Z, Miao Y. CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Int J Oncol*, 2013,43(3):877-85.
22. Chen JS, Hsu YM, Chen CC, Chen LL, Lee CC, Huang TS. Secreted heat shock protein 90alpha induces colorectal cancer cell invasion through CD91/LRP-1 and NF-kappaB-mediated integrin alphaV expression. *J Biol Chem*, 2010,285(33):25458-66.
23. Chen P, Li X, Zhang R, Liu S, Xiang Y, Zhang M, Chen X, Pan T, Yan L, Feng J, Duan T, Wang D, Chen B, Jin T, Wang W, Chen L, Huang X, Zhang W, Sun Y, Li G, Kong L, Chen X, Li Y, Yang Z, Zhang Q, Zhuo L, Sui X, Xie T. Combinative treatment of beta-elemene and cetuximab is sensitive to

- KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transformation. *Theranostics*, 2020,10(11):5107-19.
24. Chen TC, Chuang JY, Ko CY, Kao TJ, Yang PY, Yu CH, Liu MS, Hu SL, Tsai YT, Chan H, Chang WC, Hsu TI. AR ubiquitination induced by the curcumin analog suppresses growth of temozolomide-resistant glioblastoma through disrupting GPX4-Mediated redox homeostasis. *Redox Biol*, 2020,30:101413.
  25. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer MC, Zeniou M. Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int*, 2016,2016:1740936.
  26. Cheng H, Jiang XY, Zheng RR, Zuo SJ, Zhao LP, Fan GL, Xie BR, Yu XY, Li SY, Zhang XZ. A biomimetic cascade nanoreactor for tumor targeted starvation therapy-amplified chemotherapy. *Biomaterials*, 2019,195:75-85.
  27. Chou PC, Rajput S, Zhao X, Patel C, Albaciete D, Oh WJ, Daguplo HQ, Patel N, Su B, Werlen G, Jacinto E. mTORC2 Is Involved in the Induction of RSK Phosphorylation by Serum or Nutrient Starvation. *Cells*, 2020,9(7).
  28. Chung CT, Miller RH. Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol*, 1993,218:621-7.
  29. Cicenias J, Zalyte E, Rimkus A, Dapkus D, Noreika R, Urbonavicius S. JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2017,10(1).
  30. Codeluppi S, Gregory EN, Kjell J, Wigerblad G, Olson L, Svensson CI. Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes. *J Neurosci Methods*, 2011,197(1):118-27.
  31. Conacci-Sorrell M, Ngouenet C, Anderson S, Brabletz T, Eisenman RN. Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev*, 2014,28(7):689-707.
  32. Cooney MM, van Heeckeren W, Bhakta S, Ortiz J, Remick SC. Drug insight: vascular disrupting agents and angiogenesis--novel approaches for drug delivery. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006,3(12):682-92.
  33. Coppock JD, Vermeer PD, Vermeer DW, Lee KM, Miskimins WK, Spanos WC, Lee JH. mTOR inhibition as an adjuvant therapy in a metastatic model of HPV+ HNSCC. *Oncotarget*, 2016,7(17):24228-41.
  34. Cosialls E, El Hage R, Dos Santos L, Gong C, Mehrpour M, Hamai A. Ferroptosis: Cancer Stem Cells Rely on Iron until "to Die for" It. *Cells*, 2021,10(11).
  35. Cruz-Bermudez A, Laza-Briviesca R, Vicente-Blanco RJ, Garcia-Grande A, Coronado MJ, Laine-Menendez S, Palacios-Zambrano S, Moreno-Villa MR, Ruiz-Valdepenas AM, Lendinez C, Romero A, Franco F, Calvo V, Alfaro C,

- Acosta PM, Salas C, Garcia JM, Provencio M. Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1 $\alpha$  in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition. *Free Radic Biol Med*, 2019,135:167-81.
36. D'Aronzo M, Vinciguerra M, Mazza T, Panebianco C, Saracino C, Pereira SP, Graziano P, Paziienza V. Fasting cycles potentiate the efficacy of gemcitabine treatment in in vitro and in vivo pancreatic cancer models. *Oncotarget*, 2015,6(21):18545-57.
  37. Dailey FE, McGraw JE, Jensen BJ, Bishop SS, Lokken JP, Dorff KJ, Ripley MP, Munro JB. The Microbiota of Freshwater Fish and Freshwater Niches Contain Omega-3 Fatty Acid-Producing *Shewanella* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2016,82(1):218-31.
  38. Dalleau S, Baradat M, Gueraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*, 2013,20(12):1615-30.
  39. Das S, Batra SK. Pancreatic cancer metastasis: are we being pre-EMT'ed? *Curr Pharm Des*, 2015,21(10):1249-55.
  40. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 2005,5(4):275-84.
  41. Demkova L, Kucerova L. Role of the HGF/c-MET tyrosine kinase inhibitors in metastatic melanoma. *Mol Cancer*, 2018,17(1):26.
  42. Diepenbruck M, Waldmeier L, Ivanek R, Berninger P, Arnold P, van Nimwegen E, Christofori G. Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*, 2014,127(Pt 7):1523-36.
  43. Dietrich C, Hofmann TG. Ferroptosis Meets Cell-Cell Contacts. *Cells*, 2021,10(9).
  44. Distefano AM, Martin MV, Cordoba JP, Bellido AM, D'Ippolito S, Colman SL, Soto D, Roldan JA, Bartoli CG, Zabaleta EJ, Fiol DF, Stockwell BR, Dixon SJ, Pagnussat GC. Heat stress induces ferroptosis-like cell death in plants. *J Cell Biol*, 2017,216(2):463-76.
  45. Dixon SJ. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev*, 2017,277(1):150-7.
  46. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012,149(5):1060-72.
  47. Dixon SJ, Patel DN, Welsch M, Skouta R, Lee ED, Hayano M, Thomas AG, Gleason CE, Tatonetti NP, Slusher BS, Stockwell BR. Pharmacological

- inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife*, 2014,3:e02523.
48. Dixon SJ, Stockwell BR. The Hallmarks of Ferroptosis. *Annual Review of Cancer Biology*, 2019,3:35-54.
  49. Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, Lee ED, Snijder B, Rebsamen M, Superti-Furga G, Stockwell BR. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chem Biol*, 2015,10(7):1604-9.
  50. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, Goya Grocin A, Xavier da Silva TN, Panzilius E, Scheel CH, Mourao A, Buday K, Sato M, Wanninger J, Vignane T, Mohana V, Rehberg M, Flatley A, Schepers A, Kurz A, White D, Sauer M, Sattler M, Tate EW, Schmitz W, Schulze A, O'Donnell V, Proneth B, Popowicz GM, Pratt DA, Angeli JPF, Conrad M. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 2019,575(7784):693-8.
  51. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*, 2003,3(3):285-96.
  52. Doyle SM, Diamond M, McCabe PF. Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures. *J Exp Bot*, 2010,61(2):473-82.
  53. Drucker BJ, Marincola FM, Siao DY, Donlon TA, Bangs CD, Holder WD, Jr. A new human pancreatic carcinoma cell line developed for adoptive immunotherapy studies with lymphokine-activated killer cells in nude mice. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988,24(12):1179-87.
  54. Drummen GP, van Liebergen LC, Op den Kamp JA, Post JA. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med*, 2002,33(4):473-90.
  55. Du J, Wang X, Li Y, Ren X, Zhou Y, Hu W, Zhou C, Jing Q, Yang C, Wang L, Li H, Fang L, Zhou Y, Tong X, Wang Y. DHA exhibits synergistic therapeutic efficacy with cisplatin to induce ferroptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma via modulation of iron metabolism. *Cell Death Dis*, 2021,12(7):705.
  56. Dupuy F, Tabaries S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, Omeroglu A, Gao D, Leung S, Amir E, Clemons M, Aguilar-Mahecha A, Basik M, Vincent EE, St-Pierre J, Jones RG, Siegel PM. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab*, 2015,22(4):577-89.



57. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 2004,23(2):465-73.
58. Duxbury MS, Matros E, Clancy T, Bailey G, Doff M, Zinner MJ, Ashley SW, Maitra A, Redston M, Whang EE. CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Ann Surg*, 2005,241(3):491-6.
59. Eagle H. The Sustained Growth of Human and Animal Cells in a Protein-Free Environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1960,46(4):427-32.
60. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003,3(11):859-68.
61. Faubert B, Solmonson A, DeBerardinis RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, 2020,368(6487).
62. Fendt SM, Frezza C, Erez A. Targeting Metabolic Plasticity and Flexibility Dynamics for Cancer Therapy. *Cancer Discov*, 2020,10(12):1797-807.
63. Feng H, Stockwell BR. Unsolved mysteries: How does lipid peroxidation cause ferroptosis? *PLoS Biol*, 2018,16(5):e2006203.
64. Feng W, Han X, Wang R, Gao X, Hu P, Yue W, Chen Y, Shi J. Nanocatalysts-Augmented and Photothermal-Enhanced Tumor-Specific Sequential Nanocatalytic Therapy in Both NIR-I and NIR-II Biowindows. *Adv Mater*, 2019,31(5):e1805919.
65. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncol*, 2016,55(9-10):1158-60.
66. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Di Domizio A, Limonta P. The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020,1873(2):188338.
67. Formisano L, Napolitano F, Rosa R, D'Amato V, Servetto A, Marciano R, De Placido P, Bianco C, Bianco R. Mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020,147:102886.
68. Fu D, Wang C, Yu L, Yu R. Induction of ferroptosis by ATF3 elevation alleviates cisplatin resistance in gastric cancer by restraining Nrf2/Keap1/xCT signaling. *Cell Mol Biol Lett*, 2021,26(1):26.
69. Fu LH, Qi C, Lin J, Huang P. Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chem Soc Rev*, 2018,47(17):6454-72.
70. Gagliardi M, Saverio V, Monzani R, Ferrari E, Piacentini M, Corazzari M. Ferroptosis: a new unexpected chance to treat metastatic melanoma? *Cell Cycle*, 2020,19(19):2411-25.
71. Galie M. RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. *Front Oncol*, 2019,9:1199.

72. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Munoz-Pinedo C, Nunez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 2015,22(1):58-73.
73. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 2007,14(7):1237-43.
74. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, Garcia-Saez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jaattela M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitsis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B,

- Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkenstin JD, Moll UM, Munoz-Pinedo C, Nagata S, Nunez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E, Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018,25(3):486-541.
75. Gao M, Yi J, Zhu J, Minikes AM, Monian P, Thompson CB, Jiang X. Role of Mitochondria in Ferroptosis. *Mol Cell*, 2019,73(2):354-63 e3.
76. Gaschler MM, Andia AA, Liu H, Csuka JM, Hurlocker B, Vaiana CA, Heindel DW, Zuckerman DS, Bos PH, Reznik E, Ye LF, Tyurina YY, Lin AJ, Shchepinov MS, Chan AY, Peguero-Pereira E, Fomich MA, Daniels JD, Bekish AV, Shmanai VV, Kagan VE, Mahal LK, Woerpel KA, Stockwell BR. FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nat Chem Biol*, 2018,14(5):507-15.
77. Gaschler MM, Hu F, Feng H, Linkermann A, Min W, Stockwell BR. Determination of the Subcellular Localization and Mechanism of Action of Ferrostatins in Suppressing Ferroptosis. *ACS Chem Biol*, 2018,13(4):1013-20.
78. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017,482(3):419-25.
79. Gasior K, Hauck M, Wilson A, Bhattacharya S. A Theoretical Model of the Wnt Signaling Pathway in the Epithelial Mesenchymal Transition. *Theor Biol Med Model*, 2017,14(1):19.
80. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal*, 2014,7(344):re8.
81. Gout PW, Buckley AR, Simms CR, Bruchovsky N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia*, 2001,15(10):1633-40.

82. Grasmann G, Mondal A, Leithner K. Flexibility and Adaptation of Cancer Cells in a Heterogenous Metabolic Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 2021,22(3).
83. Gridelli C, Rossi A, Maione P, Rossi E, Castaldo V, Sacco PC, Colantuoni G. Vascular disrupting agents: a novel mechanism of action in the battle against non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 2009,14(6):612-20.
84. Gu Y, Albuquerque CP, Braas D, Zhang W, Villa GR, Bi J, Ikegami S, Masui K, Gini B, Yang H, Gahman TC, Shiau AK, Cloughesy TF, Christofk HR, Zhou H, Guan KL, Mischel PS. mTORC2 Regulates Amino Acid Metabolism in Cancer by Phosphorylation of the Cystine-Glutamate Antiporter xCT. *Mol Cell*, 2017,67(1):128-38 e7.
85. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 2007,12(1):9-22.
86. Gzil A, Zarebska I, Bursiewicz W, Antosik P, Grzanka D, Szyllberg L. Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Mol Biol Rep*, 2019,46(6):6629-45.
87. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 1977,197(4302):461-3.
88. Han C, Liu Y, Dai R, Ismail N, Su W, Li B. Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases. *Front Pharmacol*, 2020,11:239.
89. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem*, 2008,283(20):13565-77.
90. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol*, 2020,30(6):440-51.
91. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 1961,25:585-621.
92. Heberle AM, Prentzell MT, van Eunen K, Bakker BM, Grelle SN, Thedieck K. Molecular mechanisms of mTOR regulation by stress. *Mol Cell Oncol*, 2015,2(2):e970489.
93. Henke N, Albrecht P, Bouchachia I, Ryazantseva M, Knoll K, Lewerenz J, Kaznatcheyeva E, Maher P, Methner A. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress. *Cell Death Dis*, 2013,4:e470.
94. Hill S, Lamberson CR, Xu L, To R, Tsui HS, Shmanai VV, Bekish AV, Awad AM, Marbois BN, Cantor CR, Porter NA, Clarke CF, Shchepinov MS. Small amounts of isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation. *Free Radic Biol Med*, 2012,53(4):893-906.

95. Hollebecque A, Massard C, Soria JC. Vascular disrupting agents: a delicate balance between efficacy and side effects. *Curr Opin Oncol*, 2012,24(3):305-15.
96. Hong T, Lei G, Chen X, Li H, Zhang X, Wu N, Zhao Y, Zhang Y, Wang J. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer. *Redox Biol*, 2021,42:101928.
97. Horn T, Adel S, Schumann R, Sur S, Kakularam KR, Polamarasetty A, Redanna P, Kuhn H, Heydeck D. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. *Prog Lipid Res*, 2015,57:13-39.
98. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, Zeh HJ, 3rd, Kang R, Tang D. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, 2016,12(8):1425-8.
99. Hu HF, Ye Z, Qin Y, Xu XW, Yu XJ, Zhuo QF, Ji SR. Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: molecularly targeted therapies and other clinical implications. *Acta Pharmacol Sin*, 2021.
100. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 2004,114(4):569-81.
101. Ingold I, Berndt C, Schmitt S, Doll S, Poschmann G, Buday K, Roveri A, Peng X, Porto Freitas F, Seibt T, Mehr L, Aichler M, Walch A, Lamp D, Jastroch M, Miyamoto S, Wurst W, Ursini F, Arner ESJ, Fradejas-Villar N, Schweizer U, Zischka H, Friedmann Angeli JP, Conrad M. Selenium Utilization by GPX4 Is Required to Prevent Hydroperoxide-Induced Ferroptosis. *Cell*, 2018,172(3):409-22 e21.
102. Iurlaro R, Puschel F, Leon-Annicchiarico CL, O'Connor H, Martin SJ, Palou-Gramon D, Lucendo E, Munoz-Pinedo C. Glucose Deprivation Induces ATF4-Mediated Apoptosis through TRAIL Death Receptors. *Mol Cell Biol*, 2017,37(10).
103. Jiang L, Kon N, Li T, Wang SJ, Su T, Hibshoosh H, Baer R, Gu W. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, 2015,520(7545):57-62.
104. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Zhang S, Gong Z, Li X, Cao K, Deng H, He Y, Liao Q, Xiang B, Zhou M, Guo C, Zeng Z, Li G, Li X, Xiong W. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020,39(1):204.

105. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, Anthonymuthu T, Mohammadyani D, Yang Q, Proneth B, Klein-Seetharaman J, Watkins S, Bahar I, Greenberger J, Mallampalli RK, Stockwell BR, Tyurina YY, Conrad M, Bayir H. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017,13(1):81-90.
106. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009,119(6):1420-8.
107. Kamphorst JJ, Nofal M, Commisso C, Hackett SR, Lu W, Grabocka E, Vander Heiden MG, Miller G, Drebin JA, Bar-Sagi D, Thompson CB, Rabinowitz JD. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*, 2015,75(3):544-53.
108. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*, 2017,170(6):1062-78.
109. Kim MJ, Kim MS, Kim SJ, An S, Park J, Park H, Lee JH, Song KB, Hwang DW, Chang S, Kim KP, Jeong SY, Kim SC, Hong SM. Establishment and characterization of 6 novel patient-derived primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines from Korean pancreatic cancer patients. *Cancer Cell Int*, 2017,17:47.
110. Kim SE, Zhang L, Ma K, Riegman M, Chen F, Ingold I, Conrad M, Turker MZ, Gao M, Jiang X, Monette S, Pauliah M, Gonen M, Zanzonico P, Quinn T, Wiesner U, Bradbury MS, Overholtzer M. Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat Nanotechnol*, 2016,11(11):977-85.
111. Kim WK, Kwon Y, Jang M, Park M, Kim J, Cho S, Jang DG, Lee WB, Jung SH, Choi HJ, Min BS, Il Kim T, Hong SP, Paik YK, Kim H. beta-catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers. *Sci Rep*, 2019,9(1):18440.
112. Kondo E, Iioka H, Saito K. Tumor-homing peptide and its utility for advanced cancer medicine. *Cancer Sci*, 2021,112(6):2118-25.
113. Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell*, 2021,12(8):599-620.
114. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, Boettcher M, Mouggiakakos D, Reichardt W, Bronsert P, Brunton VG, Pilarsky C, Winkler TH, Brabletz S, Stemmler MP, Brabletz T. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol*, 2017,19(5):518-29.

115. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, Liudkeviciene R. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget*, 2016,7(10):10788-802.
116. Larraufie MH, Yang WS, Jiang E, Thomas AG, Slusher BS, Stockwell BR. Incorporation of metabolically stable ketones into a small molecule probe to increase potency and water solubility. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015,25(21):4787-92.
117. Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, Meena JK, Kim J, Zhuang L, Tyagi S, Ma L, Westbrook TF, Steinberg GR, Nakada D, Stockwell BR, Gan B. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol*, 2020,22(2):225-34.
118. Lee YH, Govinda B, Kim JC, Kim TI, Lee NH, Lee JC, Yi HK, Jhee EC. Oxidative stress resistance through blocking Hsp60 translocation followed by SAPK/JNK inhibition in aged human diploid fibroblasts. *Cell Biochem Funct*, 2009,27(1):35-9.
119. Lee YS, Lee DH, Choudry HA, Bartlett DL, Lee YJ. Ferroptosis-Induced Endoplasmic Reticulum Stress: Cross-talk between Ferroptosis and Apoptosis. *Mol Cancer Res*, 2018,16(7):1073-6.
120. Li B, Yang L, Peng X, Fan Q, Wei S, Yang S, Li X, Jin H, Wu B, Huang M, Tang S, Liu J, Li H. Emerging mechanisms and applications of ferroptosis in the treatment of resistant cancers. *Biomed Pharmacother*, 2020,130:110710.
121. Li J, Li Y, Wang Y, Ke W, Chen W, Wang W, Ge Z. Polymer Prodrug-Based Nanoreactors Activated by Tumor Acidity for Orchestrated Oxidation/Chemotherapy. *Nano Lett*, 2017,17(11):6983-90.
122. Li J, Yang B, Zhou Q, Wu Y, Shang D, Guo Y, Song Z, Zheng Q, Xiong J. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. *Carcinogenesis*, 2013,34(6):1343-51.
123. Li S, Jiang Q, Liu S, Zhang Y, Tian Y, Song C, Wang J, Zou Y, Anderson GJ, Han JY, Chang Y, Liu Y, Zhang C, Chen L, Zhou G, Nie G, Yan H, Ding B, Zhao Y. A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nat Biotechnol*, 2018,36(3):258-64.
124. Li S, Xu HX, Wu CT, Wang WQ, Jin W, Gao HL, Li H, Zhang SR, Xu JZ, Qi ZH, Ni QX, Yu XJ, Liu L. Angiogenesis in pancreatic cancer: current research status and clinical implications. *Angiogenesis*, 2019,22(1):15-36.
125. Li XY, Leung PS. Erastin-induced ferroptosis is a regulator for the growth and function of human pancreatic islet-like cell clusters. *Cell Regen*, 2020,9(1):16.

126. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*, 1975,15(5):741-7.
127. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, Prokai A, Zuchtriegel G, Krombach F, Welz PS, Weinlich R, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Pasparakis M, Bleich M, Weinberg JM, Reichel CA, Brasen JH, Kunzendorf U, Anders HJ, Stockwell BR, Green DR, Krautwald S. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014,111(47):16836-41.
128. Liou GY, Doppler H, DelGiorno KE, Zhang L, Leitges M, Crawford HC, Murphy MP, Storz P. Mutant KRas-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Acinar Cells Upregulates EGFR Signaling to Drive Formation of Pancreatic Precancerous Lesions. *Cell Rep*, 2016,14(10):2325-36.
129. Liu H, Schreiber SL, Stockwell BR. Targeting Dependency on the GPX4 Lipid Peroxide Repair Pathway for Cancer Therapy. *Biochemistry*, 2018,57(14):2059-60.
130. Liu X, Olszewski K, Zhang Y, Lim EW, Shi J, Zhang X, Zhang J, Lee H, Koppula P, Lei G, Zhuang L, You MJ, Fang B, Li W, Metallo CM, Poyurovsky MV, Gan B. Cystine transporter regulation of pentose phosphate pathway dependency and disulfide stress exposes a targetable metabolic vulnerability in cancer. *Nat Cell Biol*, 2020,22(4):476-86.
131. Liu Z, Li T, Han F, Wang Y, Gan Y, Shi J, Wang T, Akhtar ML, Li Y. A cascade-reaction enabled synergistic cancer starvation/ROS-mediated/chemotherapy with an enzyme modified Fe-based MOF. *Biomater Sci*, 2019,7(9):3683-92.
132. Lorendeau D, Christen S, Rinaldi G, Fendt SM. Metabolic control of signalling pathways and metabolic auto-regulation. *Biol Cell*, 2015,107(8):251-72.
133. Louandre C, Ezzoukhry Z, Godin C, Barbare JC, Maziere JC, Chauffert B, Galmiche A. Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Int J Cancer*, 2013,133(7):1732-42.
134. Luo J. Cancer's sweet tooth for serine. *Breast Cancer Res*, 2011,13(6):317.
135. Luo L, Wang H, Tian W, Li X, Zhu Z, Huang R, Luo H. Targeting ferroptosis-based cancer therapy using nanomaterials: strategies and applications. *Theranostics*, 2021,11(20):9937-52.
136. Luo X, Gong HB, Gao HY, Wu YP, Sun WY, Li ZQ, Wang G, Liu B, Liang L, Kurihara H, Duan WJ, Li YF, He RR. Oxygenated phosphatidylethanolamine navigates phagocytosis of ferroptotic cells by interacting with TLR2. *Cell Death Differ*, 2021,28(6):1971-89.



137. Lupo G, Caporarello N, Olivieri M, Cristaldi M, Motta C, Bramanti V, Avola R, Salmeri M, Nicoletti F, Anfuso CD. Anti-angiogenic Therapy in Cancer: Downsides and New Pivots for Precision Medicine. *Front Pharmacol*, 2016,7:519.
138. Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V. A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J Biol Chem*, 1982,257(23):14365-9.
139. Magtanong L, Ko PJ, Dixon SJ. Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 2016,23(7):1099-109.
140. Maher P, Currais A, Schubert D. Using the Oxytosis/Ferroptosis Pathway to Understand and Treat Age-Associated Neurodegenerative Diseases. *Cell Chem Biol*, 2020,27(12):1456-71.
141. Mai TT, Hamai A, Hienzsch A, Caneque T, Muller S, Wicinski J, Cabaud O, Leroy C, David A, Acevedo V, Ryo A, Ginestier C, Birnbaum D, Charafe-Jauffret E, Codogno P, Mehrpour M, Rodriguez R. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat Chem*, 2017,9(10):1025-33.
142. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008,105(47):18525-30.
143. Maltese WA, Overmeyer JH. Methuosis: nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *Am J Pathol*, 2014,184(6):1630-42.
144. Mao C, Liu X, Zhang Y, Lei G, Yan Y, Lee H, Koppula P, Wu S, Zhuang L, Fang B, Poyurovsky MV, Olszewski K, Gan B. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, 2021,593(7860):586-90.
145. Markowitsch SD, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, Efferth T, Haferkamp A, Juengel E. Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis. *Cancers (Basel)*, 2020,12(11).
146. Martinez-Useros J, Li W, Cabeza-Morales M, Garcia-Foncillas J. Oxidative Stress: A New Target for Pancreatic Cancer Prognosis and Treatment. *J Clin Med*, 2017,6(3).
147. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Pathways from glutamine to apoptosis. *Front Biosci*, 2006,11:3164-80.
148. Meadows KL, Hurwitz HI. Anti-VEGF therapies in the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012,2(10).

149. Miserocchi G, Mercatali L, Liverani C, De Vita A, Spadazzi C, Pieri F, Bongiovanni A, Recine F, Amadori D, Ibrahim T. Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J Transl Med*, 2017,15(1):229.
150. Mohiuddin IS, Wei SJ, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020,1866(4):165432.
151. Moravec AR, Siv AW, Hobby CR, Lindsay EN, Norbash LV, Shults DJ, Symes SJK, Giles DK. Exogenous Polyunsaturated Fatty Acids Impact Membrane Remodeling and Affect Virulence Phenotypes among Pathogenic *Vibrio* Species. *Appl Environ Microbiol*, 2017,83(22).
152. Muir A, Danai LV, Gui DY, Waingarten CY, Lewis CA, Vander Heiden MG. Environmental cystine drives glutamine anaplerosis and sensitizes cancer cells to glutaminase inhibition. *Elife*, 2017,6.
153. Mukherjee S, Patra CR. Therapeutic application of anti-angiogenic nanomaterials in cancers. *Nanoscale*, 2016,8(25):12444-70.
154. Muller S, Sindikubwabo F, Caneque T, Lafon A, Versini A, Lombard B, Loew D, Wu TD, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Durand A, Vallot C, Baulande S, Servant N, Rodriguez R. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nat Chem*, 2020,12(10):929-38.
155. Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 1989,2(6):1547-58.
156. O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*, 2013,493(7432):346-55.
157. Okabe T, Yamaguchi N, Ohsawa N. Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer*, 1983,51(4):662-8.
158. Palmieri VO, Grattagliano I, Palasciano G. Ethanol induces secretion of oxidized proteins by pancreatic acinar cells. *Cell Biol Toxicol*, 2007,23(6):459-64.
159. Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S, Banerjee UC, Fukumura D. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor. *Oncogene*, 2016,35(38):4957-72.
160. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*, 2014,13(7):497-512.
161. Petrillo A, Pappalardo A, Calabrese F, Tirino G, Pompella L, Ventriglia J, Laterza MM, Caterino M, Sforza V, Iranzo V, Biglietto M, Orditura M, Ciardiello F, Conzo G, Molino C, De Vita F. First line nab-paclitaxel plus

- gemcitabine in elderly metastatic pancreatic patients: a good choice beyond age. *J Gastrointest Oncol*, 2019,10(5):910-7.
162. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci*, 2017,18(12).
163. Procaccini C, Garavelli S, Carbone F, Di Silvestre D, La Rocca C, Greco D, Colamatteo A, Lepore MT, Russo C, De Rosa G, Faicchia D, Prattichizzo F, Grossi S, Campomenosi P, Buttari F, Mauri P, Uccelli A, Salvetti M, Brescia Morra V, Vella D, Galgani M, Mottola M, Zuccarelli B, Lanzillo R, Maniscalco GT, Centonze D, de Candia P, Matarese G. Signals of pseudo-starvation unveil the amino acid transporter SLC7A11 as key determinant in the control of Treg cell proliferative potential. *Immunity*, 2021,54(7):1543-60 e6.
164. Qi Y, Zhang X, Wu Z, Tian M, Chen F, Guan W, Zhang S. Ferroptosis Regulation by Nutrient Signalling. *Nutr Res Rev*, 2021:1-13.
165. Rabanal-Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*, 2017,61(6):565-84.
166. Raggi C, Gammella E, Correnti M, Buratti P, Forti E, Andersen JB, Alpini G, Glaser S, Alvaro D, Invernizzi P, Cairo G, Recalcati S. Dysregulation of Iron Metabolism in Cholangiocarcinoma Stem-like Cells. *Sci Rep*, 2017,7(1):17667.
167. Ranji-Burachaloo H, Reyhani A, Gurr PA, Dunstan DE, Qiao GG. Combined Fenton and starvation therapies using hemoglobin and glucose oxidase. *Nanoscale*, 2019,11(12):5705-16.
168. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 2007,26(22):3291-310.
169. Roh JL, Kim EH, Jang HJ, Park JY, Shin D. Induction of ferroptotic cell death for overcoming cisplatin resistance of head and neck cancer. *Cancer Lett*, 2016,381(1):96-103.
170. Ruckert F, Aust D, Bohme I, Werner K, Brandt A, Diamandis EP, Krautz C, Hering S, Saeger HD, Grutzmann R, Pilarsky C. Five primary human pancreatic adenocarcinoma cell lines established by the outgrowth method. *J Surg Res*, 2012,172(1):29-39.
171. Sarabi M, Mais L, Oussaid N, Desseigne F, Guibert P, De La Fouchardiere C. Use of gemcitabine as a second-line treatment following chemotherapy with folfirinox for metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Oncol Lett*, 2017,13(6):4917-24.

172. Sato H, Nomura S, Maebara K, Sato K, Tamba M, Bannai S. Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,325(1):109-16.
173. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 2017,169(2):361-71.
174. Schonberg DL, Miller TE, Wu Q, Flavahan WA, Das NK, Hale JS, Hubert CG, Mack SC, Jarrar AM, Karl RT, Rosager AM, Nixon AM, Tesar PJ, Hamerlik P, Kristensen BW, Horbinski C, Connor JR, Fox PL, Lathia JD, Rich JN. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell*, 2015,28(4):441-55.
175. Sehm T, Fan Z, Ghoochani A, Rauh M, Engelhorn T, Minakaki G, Dorfler A, Klucken J, Buchfelder M, Eyupoglu IY, Savaskan N. Sulfasalazine impacts on ferroptotic cell death and alleviates the tumor microenvironment and glioma-induced brain edema. *Oncotarget*, 2016,7(24):36021-33.
176. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Radmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 2008,8(3):237-48.
177. Selwan EM, Finicle BT, Kim SM, Edinger AL. Attacking the supply wagons to starve cancer cells to death. *FEBS Lett*, 2016,590(7):885-907.
178. Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Cent Sci*, 2018,4(3):387-96.
179. Shi L, Guan Q, Gao X, Jin X, Xu L, Shen J, Wu C, Zhu X, Zhang C. Reaction-Based Color-Convertible Fluorescent Probe for Ferroptosis Identification. *Anal Chem*, 2018,90(15):9218-25.
180. Shimada K, Skouta R, Kaplan A, Yang WS, Hayano M, Dixon SJ, Brown LM, Valenzuela CA, Wolpaw AJ, Stockwell BR. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2016,12(7):497-503.
181. Siemann DW, Chaplin DJ, Horsman MR. Realizing the Potential of Vascular Targeted Therapy: The Rationale for Combining Vascular Disrupting Agents and Anti-Angiogenic Agents to Treat Cancer. *Cancer Invest*, 2017,35(8):519-34.
182. Siliakus MF, van der Oost J, Kengen SWM. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles*, 2017,21(4):651-70.

183. Silva JL, Cino EA, Soares IN, Ferreira VF, G APdO. Targeting the Prion-like Aggregation of Mutant p53 to Combat Cancer. *Acc Chem Res*, 2018,51(1):181-90.
184. Sisto M, Lisi S, Ribatti D. The role of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in diseases of the salivary glands. *Histochem Cell Biol*, 2018,150(2):133-47.
185. Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 2013,8(2):e57289.
186. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, Perera RM, Ferrone CR, Mullarky E, Shyh-Chang N, Kang Y, Fleming JB, Bardeesy N, Asara JM, Haigis MC, DePinho RA, Cantley LC, Kimmelman AC. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*, 2013,496(7443):101-5.
187. Song X, Wang X, Liu Z, Yu Z. Role of GPX4-Mediated Ferroptosis in the Sensitivity of Triple Negative Breast Cancer Cells to Gefitinib. *Front Oncol*, 2020,10:597434.
188. Spadi R, Brusa F, Ponzetti A, Chiappino I, Birocco N, Ciuffreda L, Satolli MA. Current therapeutic strategies for advanced pancreatic cancer: A review for clinicians. *World J Clin Oncol*, 2016,7(1):27-43.
189. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, Fulda S, Gascon S, Hatzios SK, Kagan VE, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat GC, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti FM, Torti SV, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 2017,171(2):273-85.
190. Stockwell BR, Jiang X. The Chemistry and Biology of Ferroptosis. *Cell Chem Biol*, 2020,27(4):365-75.
191. Stone TW. Dependence and Guidance Receptors-DCC and Neogenin-In Partial EMT and the Actions of Serine Proteases. *Front Oncol*, 2020,10:94.
192. Sun X, Niu X, Chen R, He W, Chen D, Kang R, Tang D. Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology*, 2016,64(2):488-500.
193. Sun Y, Qiao Y, Liu Y, Zhou J, Wang X, Zheng H, Xu Z, Zhang J, Zhou Y, Qian L, Zhang C, Lou H. ent-Kaurane diterpenoids induce apoptosis and ferroptosis through targeting redox resetting to overcome cisplatin resistance. *Redox Biol*, 2021,43:101977.

194. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021,71(3):209-49.
195. Tan S, Schubert D, Maher P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem*, 2001,1(6):497-506.
196. Tan Y, Liu W, Zhu Z, Lang L, Wang J, Huang M, Zhang M, Yang C. Selection and identification of transferrin receptor-specific peptides as recognition probes for cancer cells. *Anal Bioanal Chem*, 2018,410(3):1071-7.
197. Tasdogan A, Faubert B, Ramesh V, Ubellacker JM, Shen B, Solmonson A, Murphy MM, Gu Z, Gu W, Martin M, Kasitinon SY, Vandergriff T, Mathews TP, Zhao Z, Schadendorf D, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature*, 2020,577(7788):115-20.
198. Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, Louie RJ, Padro M, Daemen A, Hu M, Chan DA, Ethier SP, van 't Veer LJ, Polyak K, McCormick F, Gray JW. Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*, 2013,24(4):450-65.
199. Tong H, Yin H, Hossain MA, Wang Y, Wu F, Dong X, Gao S, Zhan K, He W. Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF-beta1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cell Biochem*, 2019,120(4):5118-27.
200. Torii S, Shintoku R, Kubota C, Yaegashi M, Torii R, Sasaki M, Suzuki T, Mori M, Yoshimoto Y, Takeuchi T, Yamada K. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. *Biochem J*, 2016,473(6):769-77.
201. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, Wong DJL, Atefi M, Shirazi R, Wang X, Braas D, Grasso CS, Palaskas N, Ribas A, Graeber TG. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell*, 2018,33(5):890-904 e5.
202. Turcu AL, Versini A, Khene N, Gaillet C, Caneque T, Muller S, Rodriguez R. DMT1 Inhibitors Kill Cancer Stem Cells by Blocking Lysosomal Iron Translocation. *Chemistry*, 2020,26(33):7369-73.
203. Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka Y, Yodoi J. Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol*, 1998,161(12):6689-95.

204. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, Gill S, Eichhoff OM, Seashore-Ludlow B, Kaffenberger SD, Eaton JK, Shimada K, Aguirre AJ, Viswanathan SR, Chattopadhyay S, Tamayo P, Yang WS, Rees MG, Chen S, Boskovic ZV, Javaid S, Huang C, Wu X, Tseng YY, Roider EM, Gao D, Cleary JM, Wolpin BM, Mesirov JP, Haber DA, Engelman JA, Boehm JS, Kotz JD, Hon CS, Chen Y, Hahn WC, Levesque MP, Doench JG, Berens ME, Shamji AF, Clemons PA, Stockwell BR, Schreiber SL. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature*, 2017,547(7664):453-7.
205. Waghray M, Yalamanchili M, di Magliano MP, Simeone DM. Deciphering the role of stroma in pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013,29(5):537-43.
206. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*, 2007,26(13):1932-40.
207. Wang F, Gomez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*, 2018,19(12):918-31.
208. Wang J, Yi J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 2008,7(12):1875-84.
209. Wang SJ, Li D, Ou Y, Jiang L, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression. *Cell Rep*, 2016,17(2):366-73.
210. Wangpaichitr M, Wu C, Li YY, Nguyen DJM, Kandemir H, Shah S, Chen S, Feun LG, Prince JS, Kuo MT, Savaraj N. Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. *Oncotarget*, 2017,8(30):49275-92.
211. Wenz C, Faust D, Linz B, Turmann C, Nikolova T, Dietrich C. Cell-cell contacts protect against t-BuOOH-induced cellular damage and ferroptosis in vitro. *Arch Toxicol*, 2019,93(5):1265-79.
212. White EZ, Pennant NM, Carter JR, Hawsawi O, Odero-Marah V, Hinton CV. Serum deprivation initiates adaptation and survival to oxidative stress in prostate cancer cells. *Sci Rep*, 2020,10(1):12505.
213. Win S, Than TA, Le BH, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity. *J Hepatol*, 2015,62(6):1367-74.
214. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*, 2010,35(8):427-33.

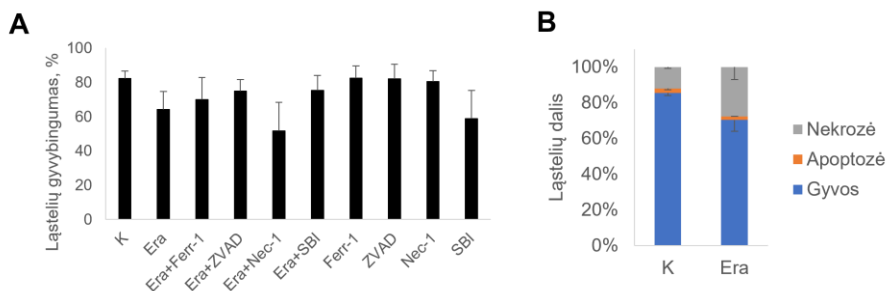
215. Wu CA, Chao Y, Shiah SG, Lin WW. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2013,1833(5):1147-56.
216. Wu J, Minikes AM, Gao M, Bian H, Li Y, Stockwell BR, Chen ZN, Jiang X. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling. *Nature*, 2019,572(7769):402-6.
217. Wu Z, Geng Y, Lu X, Shi Y, Wu G, Zhang M, Shan B, Pan H, Yuan J. Chaperone-mediated autophagy is involved in the execution of ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019,116(8):2996-3005.
218. Xiao F, Wang C, Yin H, Yu J, Chen S, Fang J, Guo F. Leucine deprivation inhibits proliferation and induces apoptosis of human breast cancer cells via fatty acid synthase. *Oncotarget*, 2016,7(39):63679-89.
219. Xie J, Wang X, Proud CG. mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res*, 2016,5.
220. Xie X, Lozano G, Siddik ZH. Heterozygous p53(V172F) mutation in cisplatin-resistant human tumor cells promotes MDM4 recruitment and decreases stability and transactivity of p53. *Oncogene*, 2016,35(36):4798-806.
221. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, Kang R, Tang D. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*, 2016,23(3):369-79.
222. Xu C, Sun S, Johnson T, Qi R, Zhang S, Zhang J, Yang K. The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity. *Cell Rep*, 2021,35(11):109235.
223. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, Wolpaw AJ, Smukste I, Peltier JM, Boniface JJ, Smith R, Lessnick SL, Sahasrabudhe S, Stockwell BR. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 2007,447(7146):864-8.
224. Yang C, Zhang Y, Lin S, Liu Y, Li W. Suppressing the KIF20A/NUAK1/Nrf2/GPX4 signaling pathway induces ferroptosis and enhances the sensitivity of colorectal cancer to oxaliplatin. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(10):13515-34.
225. Yang M, Chen P, Liu J, Zhu S, Kroemer G, Klionsky DJ, Lotze MT, Zeh HJ, Kang R, Tang D. Clockophagy is a novel selective autophagy process favoring ferroptosis. *Sci Adv*, 2019,5(7):eaaw2238.
226. Yang WH, Ding CC, Sun T, Rupprecht G, Lin CC, Hsu D, Chi JT. The Hippo Pathway Effector TAZ Regulates Ferroptosis in Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep*, 2019,28(10):2501-8 e4.



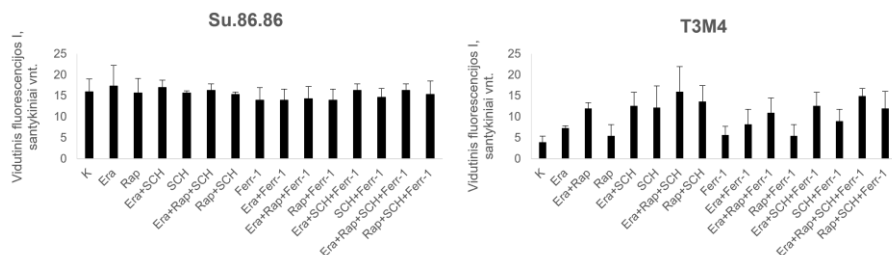
227. Yang WH, Huang Z, Wu J, Ding CC, Murphy SK, Chi JT. A TAZ-ANGPTL4-NOX2 Axis Regulates Ferroptotic Cell Death and Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer. *Mol Cancer Res*, 2020,18(1):79-90.
228. Yang WH, Lin CC, Wu J, Chao PY, Chen K, Chen PH, Chi JT. The Hippo Pathway Effector YAP Promotes Ferroptosis via the E3 Ligase SKP2. *Mol Cancer Res*, 2021,19(6):1005-14.
229. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014,156(1-2):317-31.
230. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*, 2008,15(3):234-45.
231. Yang X, Yang Y, Gao F, Wei JJ, Qian CG, Sun MJ. Biomimetic Hybrid Nanozymes with Self-Supplied H(+) and Accelerated O<sub>2</sub> Generation for Enhanced Starvation and Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumors. *Nano Lett*, 2019,19(7):4334-42.
232. Yang Y, Lin Z, Han Z, Wu Z, Hua J, Zhong R, Zhao R, Ran H, Qu K, Huang H, Tang H, Huang J, Liu Z, Hong X, Peng Z, Zhuang G. miR-539 activates the SAPK/JNK signaling pathway to promote ferroptosis in colorectal cancer by directly targeting TIPE. *Cell Death Discov*, 2021,7(1):272.
233. Ye Z, Hu Q, Zhuo Q, Zhu Y, Fan G, Liu M, Sun Q, Zhang Z, Liu W, Xu W, Ji S, Yu X, Xu X, Qin Y. Abrogation of ARF6 promotes RSL3-induced ferroptosis and mitigates gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Am J Cancer Res*, 2020,10(4):1182-93.
234. Yi J, Zhu J, Wu J, Thompson CB, Jiang X. Oncogenic activation of PI3K-AKT-mTOR signaling suppresses ferroptosis via SREBP-mediated lipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020,117(49):31189-97.
235. Yu S, Chen Z, Zeng X, Chen X, Gu Z. Advances in nanomedicine for cancer starvation therapy. *Theranostics*, 2019,9(26):8026-47.
236. Yuan Y, Li D, Li H, Wang L, Tian G, Dong Y. YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep*, 2016,13(1):237-42.
237. Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer*, 1977,19(1):128-35.
238. Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics*, 2013,92:239-47.

239. Zhang C, Liu X, Jin S, Chen Y, Guo R. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance. *Mol Cancer*, 2022,21(1):47.
240. Zhang T, Sun B, Zhong C, Xu K, Wang Z, Hofman P, Nagano T, Legras A, Breadner D, Ricciuti B, Divisi D, Schmid RA, Peng RW, Yang H, Yao F. Targeting histone deacetylase enhances the therapeutic effect of Erastin-induced ferroptosis in EGFR-activating mutant lung adenocarcinoma. *Transl Lung Cancer Res*, 2021,10(4):1857-72.
241. Zhang X, Guo Y, Li H, Han L. FIN56, a novel ferroptosis inducer, triggers lysosomal membrane permeabilization in a TFEB-dependent manner in glioblastoma. *J Cancer*, 2021,12(22):6610-9.
242. Zhang Y, Shi J, Liu X, Feng L, Gong Z, Koppula P, Sirohi K, Li X, Wei Y, Lee H, Zhuang L, Chen G, Xiao ZD, Hung MC, Chen J, Huang P, Li W, Gan B. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. *Nat Cell Biol*, 2018,20(10):1181-92.
243. Zhang Y, Tan H, Daniels JD, Zandkarimi F, Liu H, Brown LM, Uchida K, O'Connor OA, Stockwell BR. Imidazole Ketone Erastin Induces Ferroptosis and Slows Tumor Growth in a Mouse Lymphoma Model. *Cell Chem Biol*, 2019,26(5):623-33 e9.
244. Zheng J, Sato M, Mishima E, Sato H, Proneth B, Conrad M. Sorafenib fails to trigger ferroptosis across a wide range of cancer cell lines. *Cell Death Dis*, 2021,12(7):698.
245. Zhou HY, Huang SL. Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chin J Cancer*, 2012,31(1):8-18.
246. Zhou N, Bao J. FerrDb: a manually curated resource for regulators and markers of ferroptosis and ferroptosis-disease associations. *Database (Oxford)*, 2020,2020.
247. Zhu S, Zhang Q, Sun X, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Kang R, Tang D. HSPA5 Regulates Ferroptotic Cell Death in Cancer Cells. *Cancer Res*, 2017,77(8):2064-77.

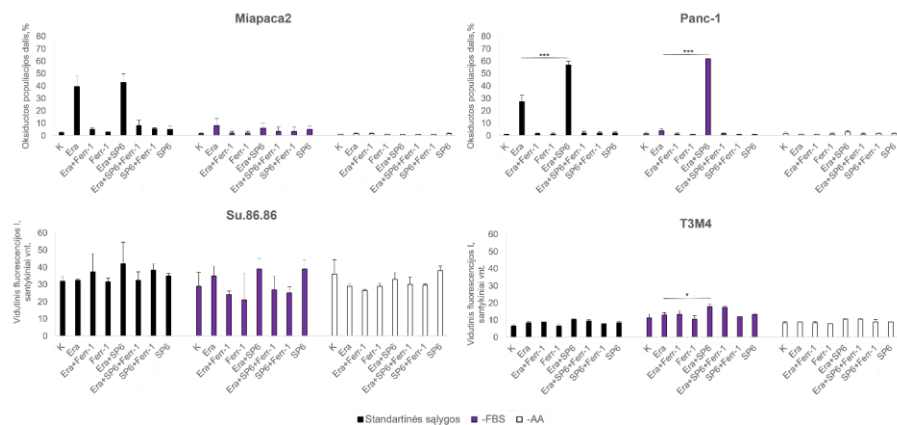
## PRIEDAI



**1 P pav.** Erastinas nesukelia apoptozės, nekrozės ir autofagijos T3M4 ląstelėse. A. T3M4 ląstelių gyvybingumo vertinimas po erastino ir skirtingų ląstelės žūties kelių slopiklių poveikio. Prieš erastino poveikį slopikliais ląstelės veiktos 1 val. B. Ląstelių žūties tipo nustatymas po erastino poveikio. K, kontrolė – standartinėmis sąlygomis (DMEM+10% FBS) auginamos ląstelės; Era, erastinas; Ferr-1, ferostatinas-1; Nec-1, nekrostatinas-1; SBI, SBI-0206965; ZVAD, Z-VAD-FMK. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3.



**2 P pav.** Oksiduotų lipido kiekio tyrimas Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse po rapamicino (0,25 nM) ir SCH772984 (1  $\mu$ M) poveikio. K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės. Ferroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatinu-1 (1  $\mu$ M). Lipidų oksidacijos tyrimui Su.86.86 ląstelės veiktos 2  $\mu$ M erastino, o T3M4 ląstelės – 10  $\mu$ M erastino. Rapamicino ir ERK1/2 slopiklio poveikis darytas 1 val. prieš erastino poveikį. Oksiduotų lipidų kiekis membranoje vertintas praėjus 48 val. po poveikio. Era, erastinas; Ferr-1, ferostatinas-1; I, intensyvumas; Rap, rapamicinas; SCH, SCH772984.



**3 P pav.** Oksiduotų lipidų kiekio tyrimas rapamicinu (0,25 nM) ir JNK slopikliu SP600125 (5  $\mu$ M) veiktose Miaapaca2, Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 ląstelėse. Visais atvejais ferroptozė indukuota erastinu ir slopinta ferostatinu-1 (1  $\mu$ M). Lipidų oksidacijos tyrimui Miaapaca2 ir Panc-1 ląstelės veiktos 1  $\mu$ M erastino, Su.86.86 ląstelės – 2,5  $\mu$ M erastino, o T3M4 ląstelės – 20  $\mu$ M erastino. Oksiduotų lipidų kiekis membranoje

vertintas praėjus 18 val. po poveikio (Miapaca2 linijos) ir 48 val. po poveikio (Panc-1, Su.86.86 ir T3M4 linijų). -AA, ląstelės, auginamos be L-glutamino, L-lizino ir L-arginino; Era, erastinas; -FBS, ląstelės, auginamos be serumo; Ferr-1, ferostatinas-1; I, intensyvumas; K, kontrolė – vaistais neveiktos ląstelės; Rap, rapamicinas; SP6, SP600125. Paklaidos:  $\pm$ SN, n=3. \*P<0,05, \*\*\*P<0,001, lyginant tokius pačius poveikius gavusias ir tomis pačiomis sąlygomis augančias ląsteles, veiktas ir neveiktas SP600125.

## SUMMARY

### LIST OF ABBREVIATIONS

-FBS – cells, cultured without fetal bovine serum  
5-FU – 5-fluorouracil  
-AA – cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine  
Afa – EGFR (epidermal growth factor receptor) inhibitor afatinib  
BG – FGFR (fibroblast growth factor receptor) inhibitor BGJ398  
CisPt – cisplatin  
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DMSO – dimethyl sulfoxide  
EGF – epidermal growth factor  
EMT – epithelial-mesenchymal transition  
Era – erastin  
ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinase 1/2  
Ferr-1 – ferrostatin-1  
FGF – fibroblast growth factor  
Gm – gemcitabine  
GPX4 – glutathione peroxidase 4  
GSH – reduced glutathione  
INK – mTORC1 and mTORC2 inhibitor INK128  
JNK – c-Jun N-terminal kinase  
cDNA – copy DNA  
MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
OxaPt – oxaliplatin  
PBS – phosphate buffer solution  
PF – FAK inhibitor PF573228  
PI – propidium iodide  
PUFA – polyunsaturated fatty acids  
PUFA-PL – PUFA-containing phospholipids (PL)  
Rap – mTORC1 inhibitor rapamycin  
ROS – reactive oxygen species  
Sar – Src inhibitor saracatinib  
SCH – ERK1/2 inhibitor SCH772984  
SD – standard deviation  
SP – JNK inhibitor SP600125  
TDG – GSK-3 inhibitor tideglusib  
TDU – YAP1 antagonist super-TDU

TPCA – IKK inhibitor TPCA-1

XAV – tankyrase inhibitor XAV939

XMU – MST 1/2 inhibitor XMU-MP-1

## INTRODUCTION

Pancreatic cancer is the seventh most common cancer in the world. However, it places fourth according to mortality rates (Sung *et al.*, 2021). Delayed diagnosis and resistance to chemotherapeutics are the main causes of such a poor outcome. Early pancreatic cancer detection is limited by an asymptomatic disease and the lack of reliable diagnostic biomarkers. Locally advanced pancreatic tumors (about 30-40% of cases) can be surgically resected, and the procedure is often combined with chemo- or radiotherapy. However, it rarely leads to full tumor eradication (Spadi *et al.*, 2016). Metastatic pancreatic cancer has the worst prognosis as it cannot be surgically removed and is highly resistant to traditional pancreatic cancer chemotherapeutics, such as gemcitabine (Amrutkar and Gladhaug, 2017). Although several novel combination therapies (gemcitabine and nab-paclitaxel, gemcitabine and FOLFIRINOX) have been proposed in recent years (Petrillo *et al.*, 2019, Sarabi *et al.*, 2017), advanced pancreatic cancer still remains highly lethal. It is estimated that by 2025 pancreatic cancer should even reach the top three of the leading cancers in Europe (Ferlay *et al.*, 2016).

In 2012, a new iron-dependent cell death form, ferroptosis, was discovered (Dixon *et al.*, 2012). Cells that undergo ferroptosis die from excessive membrane lipid peroxidation. Fenton reactions and enzymes that use iron as a cofactor, such as lipoxygenases, are constantly generating lipid peroxides as a part of a normal cellular homeostasis. To prevent membrane damage, cells activate antioxidant enzyme glutathione peroxidase 4 (GPX4). Most ferroptosis inducers inhibit activity or expression of GPX4, which leads to an oxidative membrane damage and eventual cell death (Stockwell and Jiang, 2020). In recent years, ferroptosis has been researched in the context of cardiovascular, neurodegenerative diseases and cancer (Han *et al.*, 2020). Of note, as cancer cells have more soluble iron in their cytosol than their normal counterparts, they need a milder oxidative stimulus to induce ferroptotic death. Thus, ferroptosis can be specifically targeted to malignant cells (G. Chen *et al.*, 2020). Moreover, it was shown that therapy resistant and metastatic cancer cells are especially sensitive to ferroptosis induction (Gagliardi *et al.*, 2020, Li *et al.*, 2020).

On the other hand, many types of cancer, including pancreatic, rewrite their metabolism and become dependent on certain nutrients (Son *et al.*, 2013). This vulnerability is exploited by cancer starvation therapy. Common ways to starve tumors include treatment with antiangiogenic compounds, vascular blood supply disruption and direct decomposition of intratumoral nutrients

(Yu *et al.*, 2019). In *in vitro* systems, a pseudostarvation model is commonly used, in which cells growing at standard conditions are treated with compounds that mimic starvation, such as inhibitors of mTOR pathway (Coppock *et al.*, 2016). However, the question how starvation mediates cell resistance to ferroptosis has not yet been fully answered. Thus, the works of this dissertation aimed to find the anticancer potential in the synergy of these two strategies – starvation and ferroptosis induction. Part of the dissertation was focused on a derivation of a new pancreatic cancer cell line that would be a more accurate representation of a primary tumor. Patterns of resistance to ferroptosis that were noticed in the established cell lines were also examined in this clinically relevant cancer model.

The **aim of this study** – to elucidate the mechanisms of ferroptosis resistance in pancreatic cancer cells.

The following **tasks** were raised to attain this aim:

- To establish and characterize a new pancreatic cancer cell line;
- To determine the impact of (pseudo)starvation (growth factor, L-glutamine, L-lysine and L-arginine withdrawal and mTOR inhibition) on ferroptosis inducer erastin treatment in pancreatic ductal adenocarcinoma cells;
- To evaluate the role of ERK1/2 and JNK kinases in starved pancreatic cancer cell sensitivity to erastin;
- To determine the impact of starvation on pancreatic cancer cell mesenchymal state, both in established and new cell lines;
- To evaluate the anticancer potential of the combination of EMT-modulating compounds and erastin.



## SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL VALUE

This work investigated how metabolic rewiring can be used to potentiate erastin cytotoxicity in pancreatic cancer cells. Ferroptosis is a newly discovered cell death type and not much is known about the factors that determine the sensitivity to ferroptosis inducers. The results of this dissertation showed for the first time that sensitivity to ferroptosis can be mediated by growth factor, amino acid starvation and mTOR inhibition. However, the aforementioned factors elicit different effects in pancreatic cancer cell lines: The Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells gain sensitivity, whereas Miapaca2 cells, starved for two days, acquire resistance. It was shown that in starved pancreatic cancer cells, sensitivity to ferroptosis is mediated by kinases ERK1/2 and JNK. Of note, ERK1/2 translocation to rapamycin-treated pancreatic cancer cell nucleus was detected for the first time, as other authors in similar studies investigated a prolonged rapamycin treatment and its effect on ERK1/2 translocation (Soares *et al.*, 2013). Moreover, the findings of the present study highlight a dual role of JNK in oxidative stress response regulation. In Panc-1 cells under standard conditions, JNK inhibition enhanced ROS-induced cell death; however, starvation combined with JNK inhibition protected these cells from erastin cytotoxicity. A pro-oxidant JNK role has been observed by other authors, however, mainly in the context of the regulation of normal cell apoptosis (Hanawa *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009, Win *et al.*, 2015). However, none of these results has been directly linked to metabolic reprogramming and cell starvation (Li and Leung, 2020, Y. Yang *et al.*, 2021).

Moreover, in this dissertation, a new pancreatic cancer cell line Capan-26 was established and characterized *in vitro* by assessing the doubling time, tumor and stem cell marker expression, colony forming efficiency, mutations of the *KRAS* and *TP53* genes, karyotype and sensitivity to drug treatment. This is the first pancreatic cancer cell line derived from a tumor of a Lithuanian patient. The results of the present study demonstrated that FBS starvation induces changes in cell morphology and epithelial and mesenchymal marker expression and/or increased motility of this unique cell line and also in an established cell line Miapaca2. It was shown that increased mesenchymal properties correlate to a higher sensitivity to erastin, whereas the epithelial cell state is more resistant. With this in mind, several EMT-targeting compounds were evaluated for their effects on cell sensitivity to erastin and new effective combinations of erastin and EMT-modulating compounds were discovered.

Certainly, the practical value of the Capan-26 cell line will be unveiled even more in the future research.

## STATEMENTS TO DEFEND

- A newly established pancreatic cancer cell line Capan-26 possesses cancer and stem cell properties;
- (Pseudo)starvation (growth factor, L-glutamine, L-lysine and L-arginine withdrawal and cell treatment with mTOR inhibitors) elicits contrasting effects in different pancreatic cancer cell lines;
- ERK1/2 and JNK kinases regulate (pseudo)starved pancreatic cancer cell sensitivity to erastin;
- Starvation mediates the mesenchymal state of Capan-26 and Miapaca2 cells; epithelial state corresponds to resistance to erastin, mesenchymal state increases sensitivity;
- EMT-modulating compounds can be used to increase erastin cytotoxicity in pancreatic cancer cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

All materials were purchased from *Carl Roth*, unless stated otherwise.

*Cell culture and treatments.* In the present study, five human ductal adenocarcinoma cell lines were used: Miapaca2, Panc-1, Su.86.86, T3M4 and Capan-26. The Miapaca2 cell line was a kind gift from Dr Vitalijus Karabanovas (Biomedical Physics Laboratory, National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania). The Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells were gifts from Dr Arvydas Kanopka (Department of Immunology and Cell Biology, Institute of Biotechnology, Life Sciences Center, Vilnius, Lithuania). The Capan-26 cell line was established in the present study. The Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells were cultured in DMEM (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*), supplemented with 10% FBS (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*) and 1% penicillin/streptomycin (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*). The Capan-26 cells were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*) with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For all experiments, cells were seeded at the following densities: Miapaca2, 8x10<sup>4</sup> cells/ml; Panc-1 and Su.86.86, 7x10<sup>4</sup> cells/ml; T3M4, 9x10<sup>4</sup> cells/ml. The Capan-26 cells were split 3-4 times.

Amino acid starvation was induced by cultivating the cells in DMEM medium without L-glutamine, L-Lysine and L-Arginine (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*), supplemented with % penicillin/streptomycin (*Gibco; Thermo Fisher Scientific*).

Cisplatin (CisPt, 0.1-100 µM), purchased from *Accord*, and oxaliplatin (OxaPt, 1-100 µM), purchased from *Fresenius Kabi*, were stored at +4°C. Gemcitabine hydrochloride (Gm, 0.1-100 µM) was purchased from *Sigma* and stored at -20°C or -80°C. 5-fluorouracil (5-FU, 0.1-100 µM) was purchased from *Accord* and stored at room temperature.

EGFR inhibitor, afatinib (Afa, 1 µM), FGFR inhibitor, BGJ398 (BG, 1 µM), ferroptosis inducer, erastin (Era, 0.4-20 µM), the ferroptosis inhibitor, ferrostatin-1 (Ferr-1, 1 µM), the dual mTORC1/mTORC2 inhibitor, INK128 (INK, 0.125 nM), the ERK1/2 inhibitor, SCH772984 (SCH, 1 µM), the FAK inhibitor, PF573228 (PF, 2 µM), the Src inhibitor, saracatinib (Sar, 2 µM), the YAP1 antagonist, super-TDU (TDU, 0.2 µM), the MST1/2 inhibitor, XMU-MP-1 (XMU, 5 µM), the GSK-3 inhibitor, tideglusib (TDG, 5 µM), and the

IKK inhibitor, TPCA-1 (TPCA, 5  $\mu$ M), were purchased from *Selleck Chemicals*. The tankyrase inhibitor, XAV939 (XAV, 5  $\mu$ M) and the JNK inhibitor, SP600125 (SP6, 5  $\mu$ M) were purchased from *MilliporeSigma*. The mTORC1 inhibitor, rapamycin (Rap, 0.25 nM), was obtained from *Santa Cruz Biotechnology*. All compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), stored at -20°C and diluted in growth medium to their final concentrations immediately prior to use. An appropriate volume of DMSO was used as a vehicle in control cells. The EGF and bFGF (100 ng/ml) recombinant proteins were purchased from *Invitrogen* and stored according to manufacturer's instructions.

*Cell viability assessment.* Cell viability was evaluated using MTT or propidium iodide (PI) staining. For MTT test, cells were seeded into 96-well plates (*SigmaAldrich; Merck KGaA*). Cells were exposed to treatments for 48 h. Then media with 0.5 mg/mL MTT was added to each well and plates were incubated for 1 h at 37 °C. The formazan product was dissolved by adding 50  $\mu$ L DMSO to each well. The absorbance was measured at 570 nm with Varioskan Flash Multimode Reader (*Thermo Fisher Scientific*). Results were normalized according to untreated control. For PI staining, the day before treatment, the cells were seeded into 48-well plates (*SigmaAldrich; Merck KGaA*). The cells were exposed to the treatments for 48 h. The substratum-bound and detached cells were then collected, centrifuged at 600 x g for 3 min, suspended in PBS and stained with 0.5  $\mu$ g/ml PI for 5-10 min. The proportion of cells with a permeabilized membrane was determined using the Guava easyCyte 8HT flow cytometer (*MilliporeSigma*). If the proportion of apoptotic (caspase-3/7-positive) cells was to be evaluated, the cells were simultaneously stained with Caspase-3/7 Green detection reagent (*Invitrogen; Thermo Fisher Scientific*; 0.5  $\mu$ M; 37°C for 30 min). The data were analyzed using Flowing Software 2.5.1. (University of Turku).

*Detection of membrane lipid oxidation using C11-BODIPY 581/591 staining.* To detect cells with oxidized membrane lipids, the cells were stained with 0.5  $\mu$ M C11 BODIPY 581/591 fluorescent probe (*Invitrogen; Thermo Fisher Scientific*) for 30 min at 37 °C. The cells were then collected, centrifuged at 600 x g for 3 min, resuspended in PBS and analyzed on the Guava easyCyte 8HT flow cytometer (*MilliporeSigma*). Data analysis was performed using Flowing Software 2.5.1 (University of Turku).

Oxidized membrane lipids in Capan-26 cells were visualized using confocal microscopy. Briefly, the cells were seeded on glass coverslips,

stained with 10  $\mu$ M C11 BODIPY 581/591 for 30 min at 37°C, washed with PBS, mounted in Prolong Gold Antifade reagent (*Molecular Probes; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific*) and observed immediately using a confocal laser scanning microscope (Eclipse TE2000-S; *Nikon Corporation*).

*Glutathione (GSH) assay.* GSH levels were determined in the cells using Ellman's reagent (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; *MilliporeSigma*). The cells were collected, centrifuged at 400 x g for 4 min and resuspended in PBS. Subsequently, one-tenth of the cell suspension was used for cell counting using a Guava easyCyte 8HT flow cytometer (*MilliporeSigma*). The remaining cells were centrifuged again at the same conditions as in the previous step and resuspended in 20  $\mu$ l working buffer (100 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA). To precipitate proteins, 20  $\mu$ l 5% trichloroacetic acid were added, and the samples were incubated on ice at 4°C for 15 min. Acid was neutralized with 5  $\mu$ l 2 M Tris base. The samples were then centrifuged at 12,000 x g for 5 min and 1.5 mM of DTNB was added to the supernatant. The absorbance was measured at 412 nm with Varioskan Flash Multimode Reader (*Thermo Fisher Scientific*). The GSH level was calculated according to the calibration curve prepared with pure GSH and normalized to the cell number in each sample.

*Western blot analysis.* The cells were washed with PBS and lysed on ice in EB++ lysis buffer (extraction buffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM Tris base, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 1 mM PMSF; pH 7,2-7,4). The cell lysates were centrifuged 20,000 x g for 15 min at 4°C. Protein samples (~50  $\mu$ g) were subjected to 12% SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (*Bio-Rad Laboratories*) by wet transfer and blocked in blocking buffer containing 1% milk powder (45 min, room temperature). The membranes were then incubated with primary mouse anti-vimentin (1:2,000; *BD Pharmingen*<sup>TM</sup>) and mouse anti-YAP1 (1:500; *Santa Cruz Biotechnology*) antibodies for 2 h at room temperature. In addition, the blots were probed with mouse anti-GAPDH antibody (1:1,000; *Thermo Fisher Scientific*) for the detection of GAPDH as a loading control. After washing four times for 5 min with 0.1% Tween-20 in PBS (PBS-T), membrane-bound primary antibodies were probed with IRDye<sup>®</sup> 800CW Infrared dye conjugated secondary goat anti-mouse antibody (1:10,000; *LI-COR Biosciences*) for 30 min at room temperature. After washing again for four times with PBS-T and once with PBS, the membranes were scanned on an Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System (*LI-COR*

*Biosciences*). Densitometric analysis was performed using ImageJ 1.52v software (*National Institutes of Health, USA*).

*Fluorescence/confocal microscopy.* For immunofluorescence experiments, the cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates (*MilliporeSigma*). After 24 h, the cells were treated with the corresponding compounds, washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. The cells were then washed three times with 1% BSA (*MilliporeSigma*) in PBS and permeabilized with 0.2% of Triton X-100 (*MilliporeSigma*) in PBS for 15 min. After washing, the non-specific binding sites were blocked by incubating with 1% BSA in PBS for 30 min. The coverslips were then stained with the following primary antibodies for 1 h at 37°C: Rabbit anti-ERK1/2 (1:100; produced in Proteomics Centre by rabbit immunization with a recombinant protein), rabbit anti-phospho-JNK (1:400; *Promega Corporation*), rat anti-E-cadherin (1:400; *Thermo Fisher Scientific*), mouse anti-CEACAM6 (1:400, *Santa Cruz Biotechnology*), mouse anti CA-19-9 (1:50; *Invitrogen*), mouse anti-CD44 (1:100; *Cell Signaling Technology*), mouse anti-Ki-67 (1:100; *Agilent*), mouse anti-cytokeratin5/6/18 (1:25; *Santa Cruz Biotechnology*), mouse anti-vimentin (1:200, *BD Pharmingen*). The staining was followed by washing with 1% BSA in PBS five times and 30 min of incubation at 37°C with Alexa Fluor™ 488- or 594-conjugated anti-rabbit or anti-mouse (H+L) or Alexa Fluor™ 594-conjugated anti-rat (H+L) secondary antibodies (1:250; *Thermo Fisher Scientific*). Cell nuclei were stained with 300 nM DAPI dye (*Thermo Fisher Scientific*) for 10 min at room temperature. After washing, the coverslips were mounted in Prolong Gold antifade (*Molecular Probes; Invitrogen*) and observed using a confocal laser scanning microscope (*Eclipse TE2000-S; Nikon Corporation*). Fluorescence intensity in the cell nuclei was quantified using ImageJ 1.52v software (*National Institutes of Health, USA*).

*“Wound healing” assay.* The cells were seeded in 24-well plates (*MilliporeSigma*) and cultured until they reached confluency. In one group, a scratch was made using a sterile 20 µl pipette tip, and the cells were washed with PBS and supplemented with fresh medium without FBS. In the other group, cells were FBS-starved for an additional 4 days, and a scratch was then made. In both cases, images of the same three fields were captured using an Eclipse TE2000-S microscope (*Nikon Corporation*; magnification x10) at 0 and 48 h after scratching. The width of the healed wound was calculated using

the ImageJ 1.52v plugin MRI Wound Healing Tool (*National Institutes of Health, USA*).

*Capan-26 cell line establishment.* Primary tumor tissue was obtained from a 65-years old female Lithuanian patient with pancreatic ductal adenocarcinoma, stage T2N0M0, differentiation grade 3. The patient did not have any remarkable past medical history. After pancreatic resection, the patient received adjuvant chemotherapy with FOLFIRINOX. The patient has read and signed the form of informed consent for taking part in this research, approved by Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (Protocol No. PancCa001-3). For the establishment of the cell line, tumor tissue was washed three times with PBS and homogenized. Tissue fragments were transferred to a plastic culture dish containing Iscove's Modified Dulbecco's Media (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*), 15% fetal bovine serum (FBS) (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*) and 1% penicillin/streptomycin (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*). After two days, islands of epithelial cells were observed. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and routinely passaged with 0.25% trypsin/EDTA (*Gibco*). Frozen stocks of early passages were stored in liquid nitrogen in culture medium with 8% dimethyl sulfoxide and 25% FBS. After thawing, the stored cells successfully attached and proliferated in culture. Currently, cells have undergone more than 80 passages. The established cell line was named Capan-26 (abbreviated *Cancer Pancreatic*, "26" indicating the number of the specimen).

*Cell doubling time.* Cells were seeded into a 48-well plate. Viable cells were counted with Guava easyCyte 8HT Flow Cytometer (*Merck-Millipore*) at 24-h intervals for 5 days. Cell doubling time was calculated using the formula  $v = \lg N / \lg N_0 / \lg 2 \cdot 120$ , where doubling time = 1/v, N – cell number at day 5, N<sub>0</sub> – cell number at day 1.

*Colony forming assay.* Five thousand cells per well were seeded into a 6-well plate in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (*Gibco*) supplemented with 0.3% agarose (*Thermo Fisher Scientific*) and 1% insulin-transferrin-selenium (ITS, *Life Technologies*) on top of the 0.5% agarose layer. After two weeks, formed colonies were stained with MTT dye and counted.

*RT-qPCR.* Total RNA was extracted from cells grown in a monolayer (2D) or in aggregates (3D) using GeneJET RNA Purification Kit (*Thermo Fisher Scientific*). cDNA was synthesized using RevertAid First Strand cDNA



Synthesis Kit (*Thermo Fisher Scientific*). RT-qPCR was performed on the MasterCycler RealPlex4 RT-PCR system (*Eppendorf*). For one 10  $\mu$ l PCR reaction, cDNA, synthesized from 50 ng of RNA, 2  $\mu$ M of primer mixture and Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*) was used. The reaction conditions were as follows: pre-denaturation at 95°C for 3 min followed by amplification of 40 cycles. Primer sequences were as follows: *OCT2* 5'-AATCTCTACCCGCCTCCCTT-3' and 5' CACAGAGCTGCTCG TGAACCACT-3', *OCT4* 5'CCTCCTGAGTAGCTGGGATT-3' and 5'GCTGAATACCTTCCCAAATAGAA-3', *ZEB1* 5'-CGCAATAACGCTG TTTAAGG-3' and 5'GTGCAGGAGGGACCTCTTTA-3', *NANOG* 5'-CAGCTACAAACAGGTGAAGACC-3' and 5'-CATCCCTGGTGGTAGA AGA-3', *TBP* 5'-CCACTCACAGACTCTCA CAAC-3' and 5'-CTGCGGTACAATCCCAGAACT-3'. Results were normalized to *TBP* gene expression.  $\Delta\Delta C_T$  method was used to evaluate the changes in gene expression.

*Mutational analysis.* Full length *KRAS* and *TP53* exon 5-9 cDNA was ligated into pJET1.2 vector (CloneJET PCR Cloning kit, *Thermo Fisher Scientific*) and sequenced using Macrogen sequencing service (Seoul, Republic of Korea).

*Chromosomal analysis.* Capan-26 cells were subjected to karyotyping analysis as described previously (Kundrotas et al.).

Other methods used for the Capan-26 characterization (fluorescence microscopy and cell viability tests) were already described.

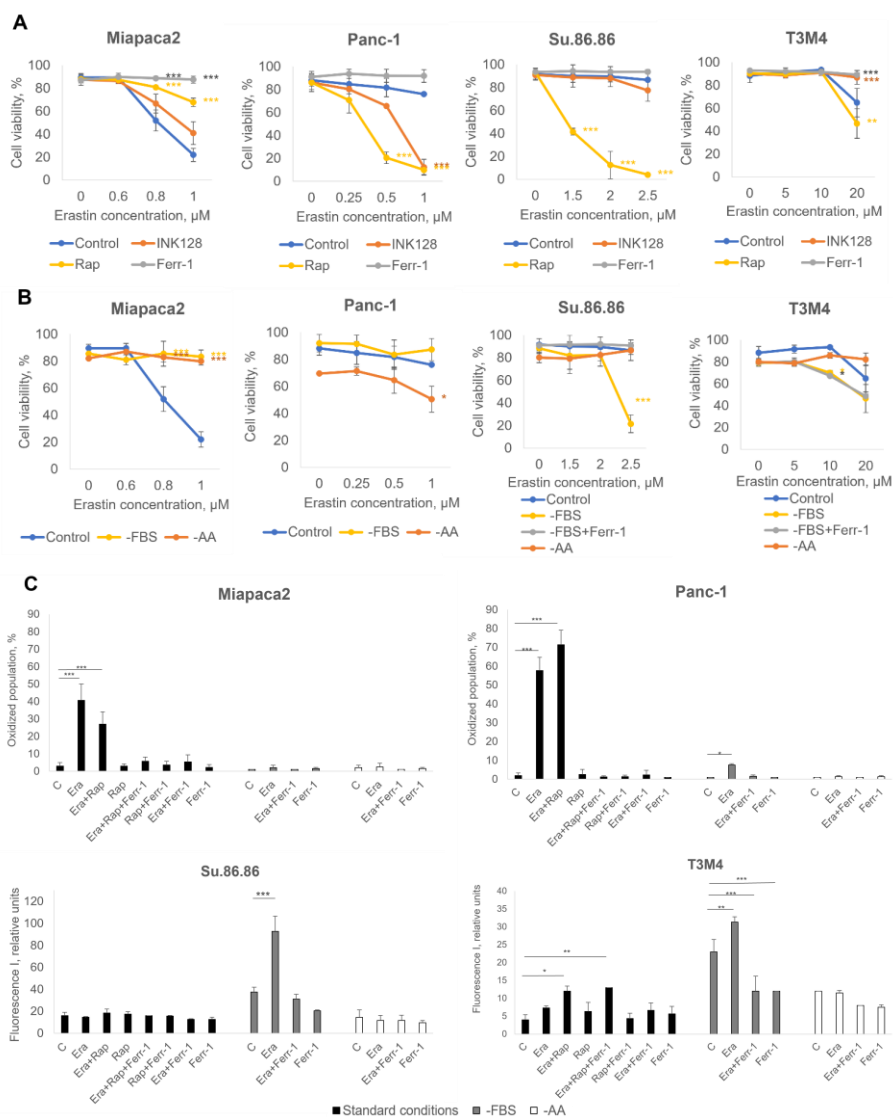
*Statistical analysis.* The data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation from at least three independent assays, each one at least in duplicate. The unpaired Student's t-test was used to compare two groups. Multiple comparisons were performed using Tukey post-hoc test, following one-way ANOVA.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## RESULTS

### *Starved pancreatic cancer cells react differently to ferroptosis induction.*

In eukaryotic cells, the main sensor of environmental conditions is mammalian target of rapamycin (mTOR) protein (Guertin and Sabatini, 2007). As mTOR signaling mediates both adaptation to nutrient/growth factor deprivation and oxidative stress, firstly the interplay between pharmacological mTOR inhibition and sensitivity to erastin-induced ferroptosis was analyzed. Cell viability after erastin treatment was compared in a panel of pancreatic cancer cell lines, cultured at standard medium (supplemented with 10% FBS) and starved without FBS (Saxton and Sabatini, 2017), without amino acids L-glutamine, L-lysine and L-arginine (Rabanal-Ruiz *et al.*, 2017) and exposed to mTOR inhibitors rapamycin and INK128 (Zhou and Huang, 2012). Starvation elicited contrasting responses of different cell lines: in mesenchymal-like Miapaca2 cells two-day FBS, amino acid starvation and rapamycin treatment prevented cell death, while in more epithelial-like Panc-1 and Su.86.86 cells ferroptosis was strongly elevated (Fig. 1, A-B). (Pseudo)starvation induced by rapamycin had the strongest effect. A dual mTORC1/mTORC2 inhibitor INK128, on the other hand, did not affect sensitivity to ferroptosis, except for Panc-1 cells and at a high erastin concentration. Lipid peroxidation detection by C11 BODIPY staining was also performed and supported cell viability results (Fig. 1 C). In T3M4 cells, FBS withdrawal increased the proportion of oxidized membrane lipids as well as cell death after erastin treatment. However, ferrostatin did not prevent erastin-induced T3M4 cell death. Such results hint on a partial cell death type change after erastin treatment and an overall stronger ROS-adaptive mechanisms in T3M4 cells. Together, these data suggest different regulation of erastin-induced ferroptosis in starved pancreatic cancer cells.

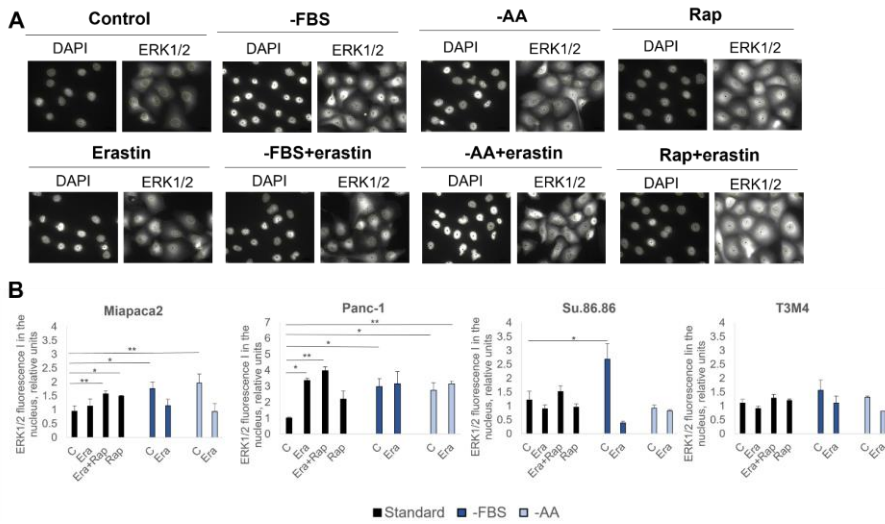
*Starvation regulates ferroptotic cell death via ERK1/2.* Inability of a selective mTORC1/mTORC2 inhibitor INK128 to induce changes in pancreatic cancer cell viability in contrast to mTORC1 inhibitor rapamycin strongly suggests the involvement of mTORC2-mediated feedback loops (Formisano *et al.*, 2020). One of the possible mTORC2 targets is ERK1/2 kinase. Although Soares *et al.* (Soares *et al.*, 2013) showed that a prolonged incubation with rapamycin does not activate ERK1/2 in pancreatic cancer cells, in cells starved for a short time or/and treated with erastin ERK1/2 was translocated to the nucleus (Fig. 2 A-B). Rapamycin and erastin synergistically promoted ERK1/2 translocation to the nucleus in Miapaca2, Panc-1, and Su.86.86 cells.



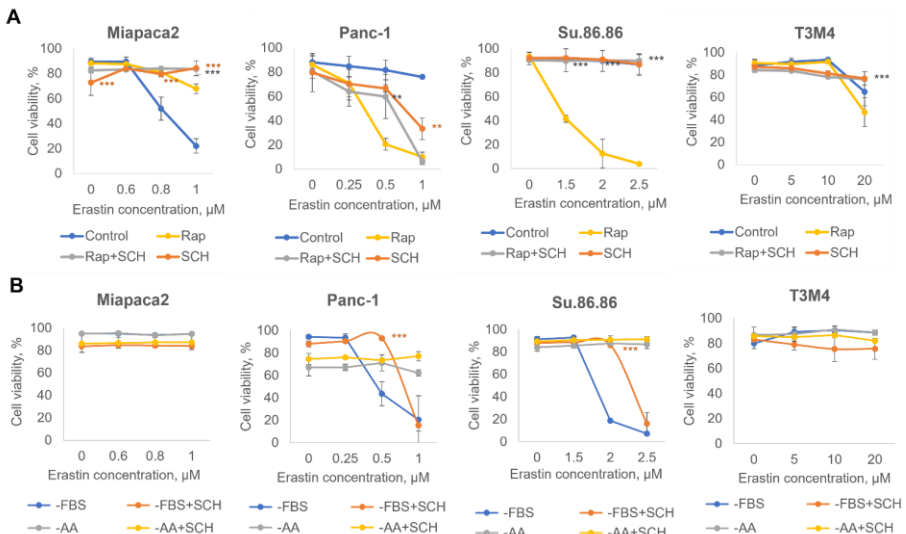
**Fig. 1.** Starved pancreatic cancer cells react differently to ferroptosis induction. **A.** Cell viability assessment of Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells, pseudostarved by treating with mTOR inhibitors rapamycin (0.25 nM) and INK128 (0.125 nM). **B.** Cell viability assessment of cells, cultured without FBS and without amino acids L-glutamine, L-lysine and L-arginine. Control – cells, cultured under standard conditions (DMEM+10% FBS). **C.** Measurement of lipid peroxidation of (pseudo)starved pancreatic cancer cells. Control – nontreated cells. In all cases, ferroptosis was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1 (1  $\mu\text{M}$ ). For the measurement of lipid oxidation, Miapaca2 and Panc-1 cells were treated with 1  $\mu\text{M}$  erastin, Su.86.86 cells – with 2.5  $\mu\text{M}$  erastin, T3M4 cells – with 20  $\mu\text{M}$  erastin. In **A**, inhibitor treatment was performed 1 h before erastin treatment. In **B**, cells were incubated without growth factors and without amino acids for 1 h before treating them with erastin. Cell viability was evaluated 48 h after the treatment. The proportion of oxidized lipids in cell membranes was evaluated 18 h after the treatment (for Miapaca2 cells) and 48 h after the treatment (for Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells). –AA, cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine; C, control; Era, erastin; -FBS, cells, cultured without fetal bovine serum; Ferr-1, ferrostatin-1; I, intensity; Rap, rapamycin. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, vs. control.

ERK1/2 was also translocated to the nucleus of FBS and amino acid-deprived control (erastin non-treated) Panc-1 cells, however, as erastin itself enhanced ERK1/2 translocation, no significant difference in fluorescence intensity in the nucleus of erastin treated control and starved cells was detected. In control Miapaca2 cells, FBS, amino acid starvation and rapamycin also mediated ERK1/2 translocation, however, erastin did not enhance the effect. To further elucidate the role of ERK1/2 in ferroptosis, this kinase was inhibited with its inhibitor SCH772984 and changes in sensitivity to erastin were examined in starved pancreatic cancer cells (Fig. 3 A-B). The results show that ERK1/2 inhibition increased the viability of rapamycin treated and FBS deprived Panc-1 and Su.86.86 cells, also, of rapamycin treated T3M4 cells. Except for T3M4 cell line, the effects were visible only at a lower erastin concentration. In Miapaca2 cells, SCH772984 treatment did not reverse starvation induced erastin resistance either. Collectively, these data indicate that ERK1/2 primes starved Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells for erastin-induced ferroptosis.

*Starvation regulates ferroptotic cell death via JNK.* Another anti-oxidative stress response regulator is c-Jun transcription factor, which is activated by JNK kinase (Cicenas *et al.*, 2017, Eferl and Wagner, 2003). However, phospho-JNK immunofluorescence (Fig. 4 A) revealed that erastin treatment activates JNK only in Miapaca2 cells. On the other hand, starvation alone induced JNK phosphorylation in all four cell lines tested. In Miapaca2 and Su.86.86 cells, JNK activation was prominent after FBS, amino acid withdrawal and rapamycin treatment, in Panc-1 cells – after FBS withdrawal and rapamycin treatment, in T3M4 cells – after amino acid starvation. The effect of JNK inhibition on starved cell resistance to erastin was also tested. Interestingly, treatment with JNK inhibitor SP600125 (Fig. 4 B-C) prevented ferroptotic cell death in cells exposed to rapamycin. Only in Panc-1 cells JNK inhibition decreased cell viability at standard conditions, although its activation was not observed in immunofluorescence experiments, which suggests a delayed JNK activation in these cells. Here, the data suggest a new JNK role in oxidative stress management: in starved pancreatic cancer cells, JNK activation elevates erastin-induced ferroptosis.



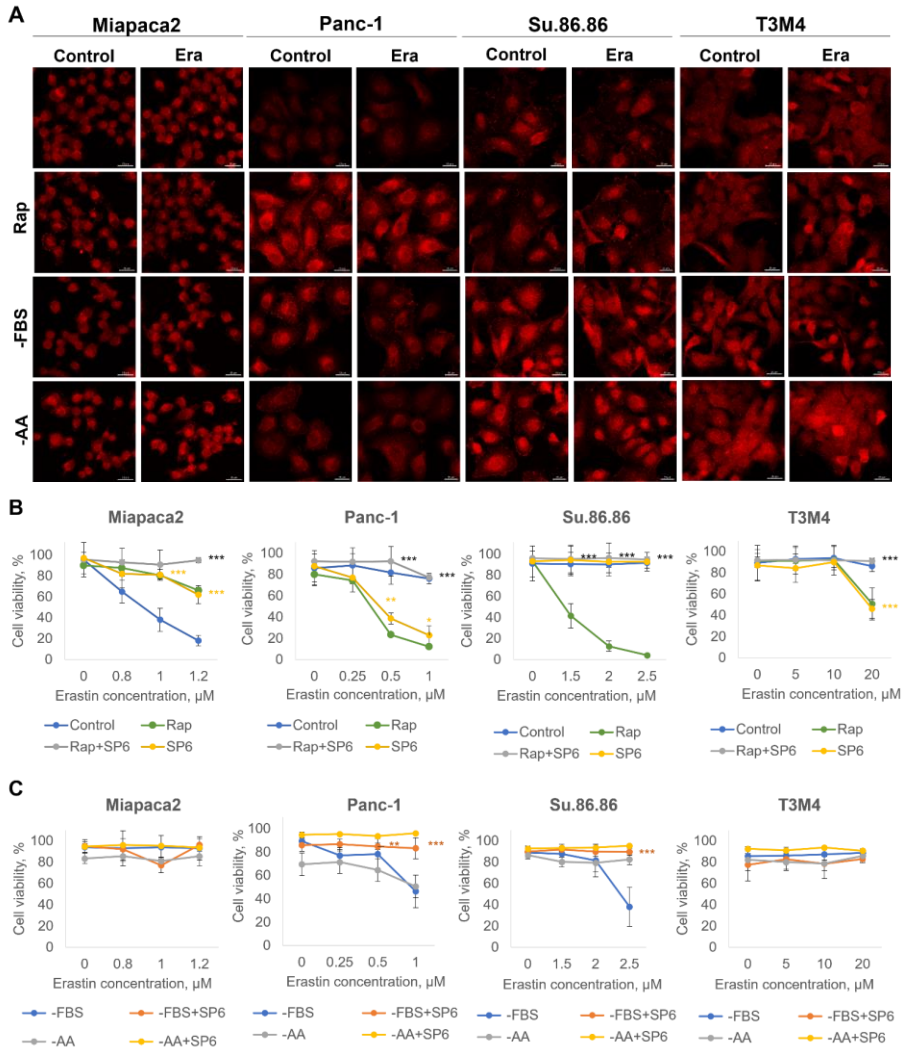
**Fig. 2.** ERK1/2 is translocated to the nucleus in starved pancreatic cancer cells. A. Representative microscopy images of (pseudo)starved (rapamycin treated) Panc-1 cells, treated or nontreated with erastin. Cell nuclei are outlined by a thin yellow line. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 20$  magnification. B. Quantification of (A). Cells were (pseudo)starved and/or treated with erastin for 1-5 h. Cells were treated with 0.25 nM rapamycin, Miapaca2 and Panc-1 were treated with 2  $\mu\text{M}$  erastin, Su.86.86 cells – with 5  $\mu\text{M}$  erastin, T3M4 cells – with 40  $\mu\text{M}$  erastin. Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Fluorescence intensity in cell nuclei was quantified with ImageJ 1.52v software (*National Institutes of Health, USA*). –AA, cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine; –FBS, cells, cultured without fetal bovine serum; C, control; Era, erastin; I, intensity; Rap, rapamycin. Data is presented as the mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . \*  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , vs. control, untreated cells, cultivated under standard conditions (DMEM+10% FBS).



**Fig. 3.** Starvation regulates ferroptotic cell death via ERK1/2. A-B. Cell viability assessment of Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells, pseudo-starved by treating with rapamycin (0.25 nM), cultured without FBS, without amino acids L-glutamine, L-lysine and L-arginine and treated with ERK1/2 inhibitor SCH (1  $\mu\text{M}$ ). Control – cells, cultivated under standard conditions (DMEM+10% FBS). Ferroptosis was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1 (1  $\mu\text{M}$ ). In A, rapamycin and ERK1/2 inhibitor treatment was performed 1 h before erastin treatment. In B, cells were incubated without growth factors, without amino

acids for 1 h and treated with ERK1/2 inhibitor 1 h before treating them with erastin. Cell viability was evaluated 48 h after the treatment.

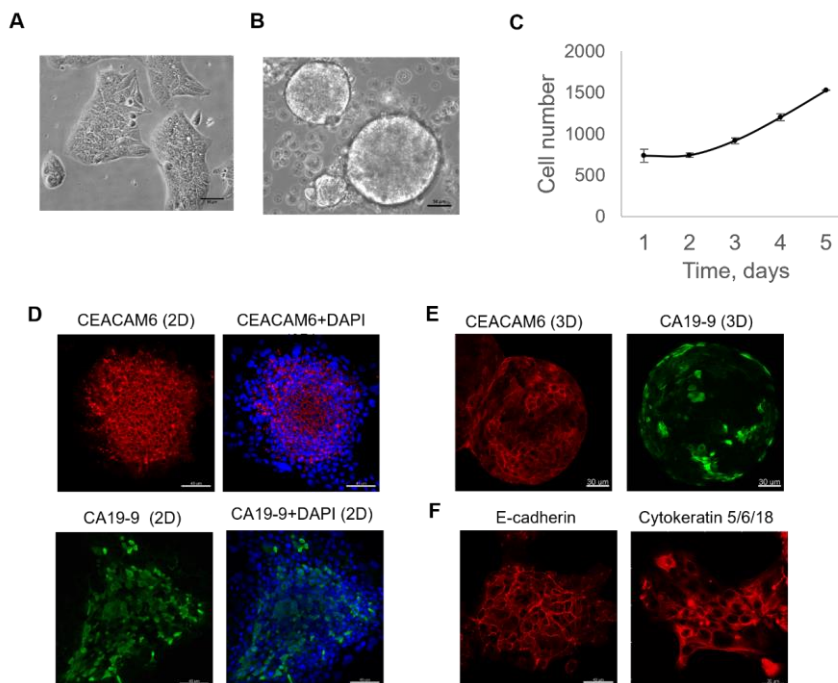
–AA, cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine; Era, erastin; –FBS, cells, cultivated without fetal bovine serum; Ferr-1, ferrostatin-1; I, intensity; Rap, rapamycin; SCH, SCH772984. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, vs. cells, nontreated with SCH772984.



**Fig. 4.** Starvation regulates ferroptotic cell death via JNK. A. Confocal microscopy images of phospho-JNK staining in (pseudo)starved Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells, treated or nontreated with erastin. Cells were (pseudo)starved for 1-5 h. Scale bar, 20  $\mu$ m. Control – cells, cultured under standard conditions (DMEM+10% FBS). B-C. Cell viability assessment of Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells, pseudostarved by treating with rapamycin (0.25 nM), cultured without FBS, without amino acids L-glutamine, L-lysine and L-arginine and treated with JNK inhibitor SP600125 (5  $\mu$ M). Ferroptosis was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1 (1  $\mu$ M). In A, Miapaca2 and Panc-1 cells were treated with 2  $\mu$ M erastin, Su.86.86 cells – with 5  $\mu$ M erastin, T3M4 cells – with 40  $\mu$ M erastin. In B, cells were treated with rapamycin and SP600125 1 h before the erastin treatment. In C, cells were incubated without growth factors, without amino acids for 1 h and treated with JNK inhibitor 1 h before treating them with erastin. Cell viability was evaluated 48 h after the treatment. –AA, cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine; –FBS, cells, cultured without fetal bovine serum; C, control; Era, erastin; Ferr-1, ferrostatin-

1; Rap, rapamycin; SP6, SP600125. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, vs. cells, nontreated with SP600125.

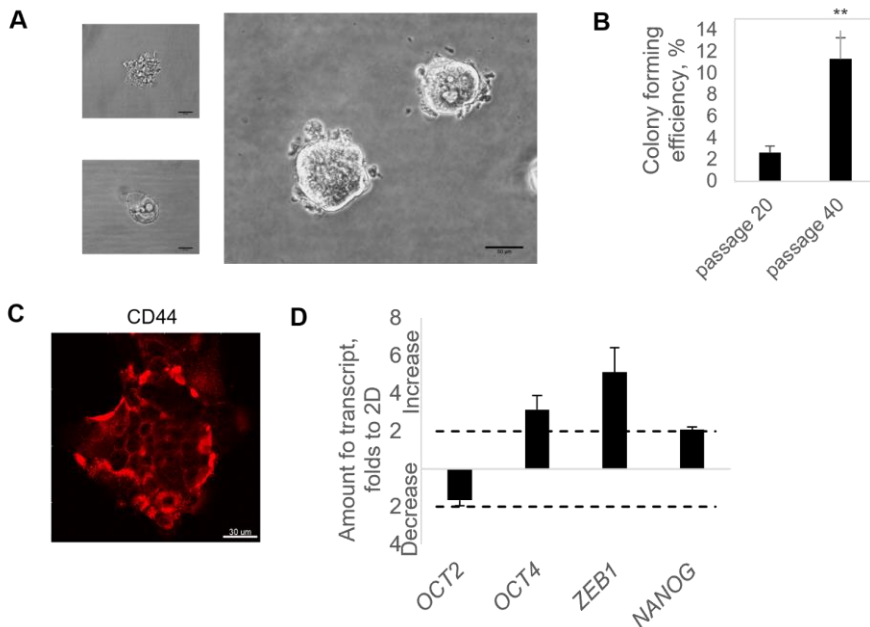
*A newly established pancreatic cancer cell line Capan-26 has cancer, stem cell properties and genetic abnormalities, characteristic to cancer cells.* For many years, cell lines have proved to be a useful *in vitro* model for cancer research and American Type Culture Collection (ATCC) provides a panel of them for different cancer types, including pancreatic. However, the strength of cell lines lies in their diversity: each cell line represents a unique cancer case. Thus, we are constantly in need of new cell lines that can recapitulate primary tumors. In this study, a new pancreatic ductal adenocarcinoma cell line Capan-26 was established and characterized *in vitro*. Primary tumor tissue was obtained from a 65-years old female Lithuanian patient with pancreatic ductal adenocarcinoma, stage T2N0M0, differentiation grade 3. In adhesive plates, Capan-26 cells grew in monolayer and formed epithelial-like islands. However, when plated on a non-adhesive surface they clustered in aggregates of irregular shape (Fig. 5 A-B). Cell doubling time of Capan-26 cells was  $74\pm 1$  h (Fig. 5 C). The cells that grew in monolayer or in 3D expressed CEACAM6 and CA19-9 (Fig. 5 D-E). Also, Capan-26 cells stained positively for E-cadherin and cytokeratin 5/6/18 (Fig. 5 F).



**Fig. 5.** Growth characteristics and cancer marker expression in Capan-26 cells. A-B. Morphology of Capan-26 cells growing in a monolayer and in aggregates/spheres on a nonadhesive surface, respectively. Scale bar – 50  $\mu$ m. C. Growth curve of Capan-26 cells. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. D. Expression of CEACAM6 and CA19-9 in cells that grow in 2D. Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-

2-phenylindole). Scale bar – 40  $\mu$ m. E. Expression of CEACAM6 and CA19-9 in cells that grow in 3D. Scale bar – 30  $\mu$ m. F. E-cadherin and cytokeratin 5/6/18 expression in Capan-26 cells. Scale bar – 40 and 30  $\mu$ m, respectively. 2D, cell monolayer; 3D, spheroid.

At an early passage (20th) Capan-26 cells formed three types of colonies in soft agar: aggregate, organ-like cystic structure and compact sphere, the latter consisting the majority. At later passages (40th) sphere morphology tended to become uniform (compact), while colony forming efficiency increased approximately 3 times (Fig. 6 A-B). Microscopy confirmed positive expression of the stem cell marker CD44 in Capan-26 cells (Fig. 6 C). Also, in comparison to monolayer, cells growing in 3D showed increased expression of *OCT4* and *ZEB1*, but the levels of *OCT2* and *NANOG* transcripts remained basal (Fig. 6 D).

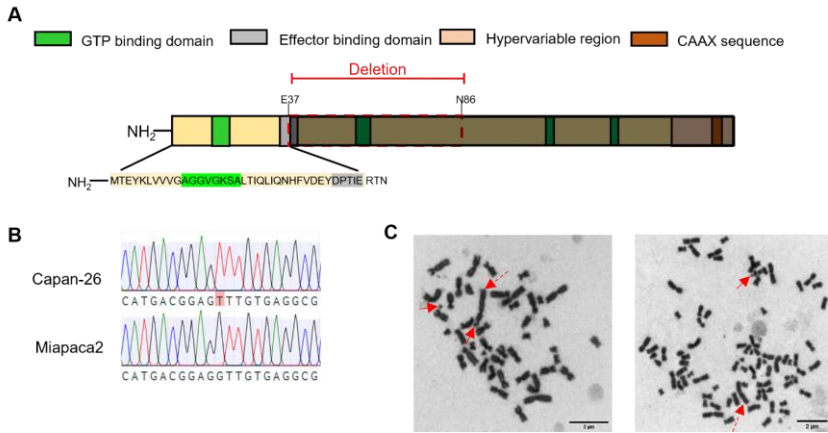


**Fig. 6.** Capan-26 cells exhibit stem cell characteristics. A. Different types of colonies formed by Capan-26 cells in soft agar. Scale bar – 50  $\mu$ m. B. Colony forming efficiency of early (20<sup>th</sup>) and late (40<sup>th</sup>) passage. C. CD44 immunofluorescence in Capan-26 cells. Scale bar – 30  $\mu$ m. D. Stem cell marker expression in 3D vs. 2D (monolayer) Capan-26 cultures, assessed by qPCR. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \*\*P<0,01, vs. cells at 20th passage.

About one sixth (3 out of 18 clones investigated) of the Capan-26 cell population was found to bear a deletion of *KRAS* exon 3 (Fig. 7 A). No point mutations in the *KRAS* gene were detected by sequencing. Also, the cells were found to have the V172F (G→T) point mutation in exon 5 of *TP53* (Fig. 7 B). The expression of pancreatic cancer related oncogene *SMAD4* was not

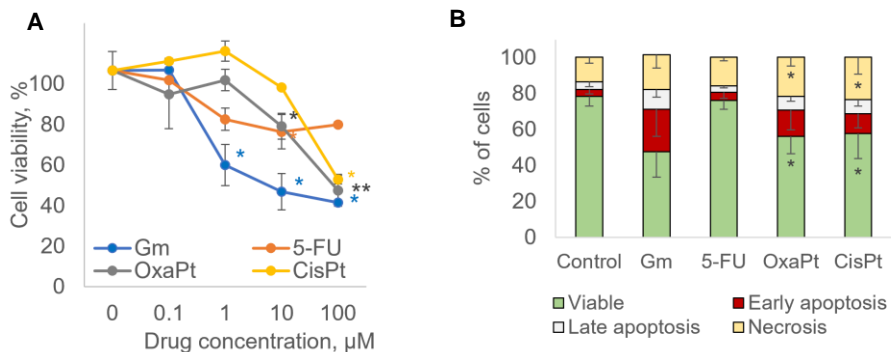


detected in Capan-26 cells. Capan-26 cells comprise a mixed population of aneuploids (approx. 44 chromosomes, 50% of cells) and pseudotetraploids (approx. 77 chromosomes, 50% of cells), with one translocation and 1-2 marker chromosomes (Fig. 7 C).



**Fig. 7.** Capan-26 cells have genetic abnormalities, characteristic to cancer cells. A. A schematic representation of *KRAS* deletion in Capan-26 cells. A translated truncated peptide is also depicted. B. *TP53* point mutation in Capan-26 cells, Miapaca2 cells were used as a negative control. C. Karyotyping of Capan-26 cells. Metaphase plates of aneuploid (left) and polyploid (right) cells are shown. Arrows depict translocation (dashed) and marker chromosomes (solid). Scale bar – 2  $\mu$ m.

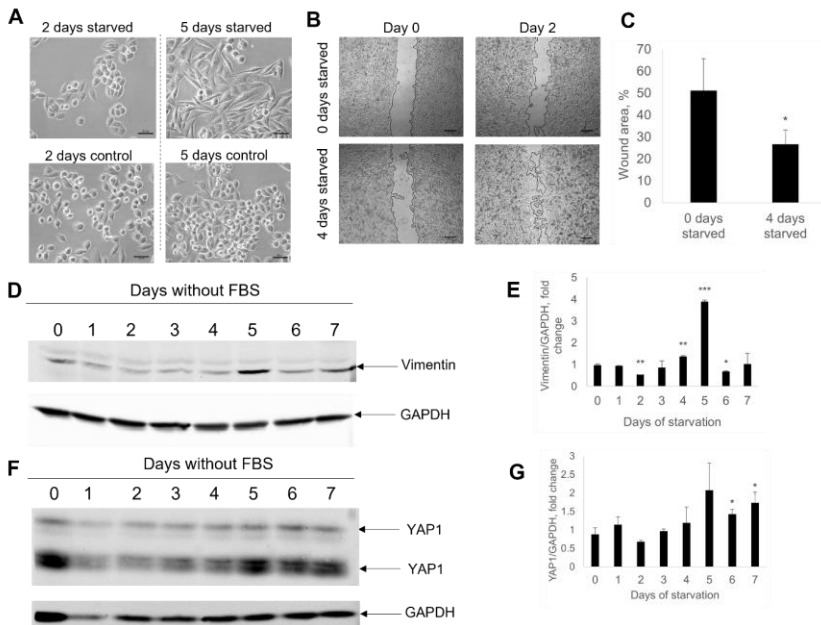
MTT cell viability test showed that Capan-26 cells were rather resistant to 5-fluorouracil, but sensitive to other anticancer drugs oxaliplatin, cisplatin and especially to gemcitabine (Fig. 8 A). On the other hand, oxaliplatin and cisplatin treatment increased the proportion of caspase 3/7 positive cells (Fig. 8 B).



**Fig. 8.** Capan-26 cells are sensitive to common anticancer compounds. A. Capan-26 viability after drug treatment, determined by MTT test. B. Cell death type assessment after drug treatment, determined by flow cytometry. Viable cells are not permeable to PI and do not express active caspase 3/7, early apoptotic cells express active caspase 3/7, but are not permeable to PI, in late apoptosis cells are permeable to PI and

express active caspase 3/7, necrotic cells are stained only with PI. Cell viability and death were evaluated 48 h after the treatment. 5-FU, 5-fluorouracil; CisPt, cisplatin; Gm, gemcitabine, OxaPt, oxaliplatin. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \*P<0,01, \*\*P<0,01, vs. untreated cells.

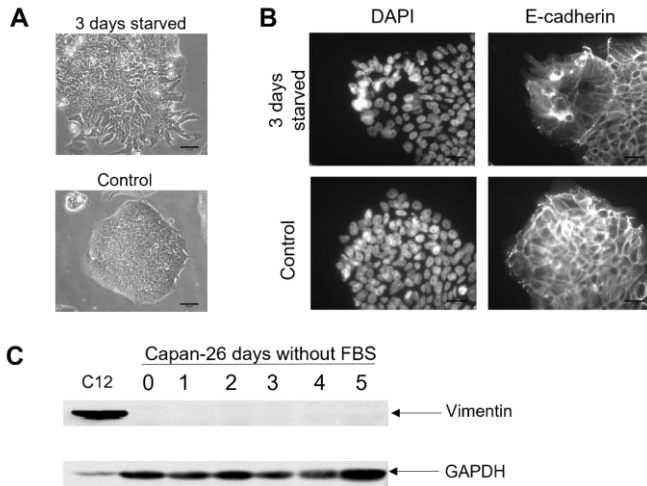
*Pancreatic cancer cells transition between different mesenchymal states during FBS starvation.* The aforementioned results indicate that starvation elicits opposing effects in Miapaca2 and in other tested cell lines Panc-1, Su.86.86 and T3M4: when starved, Miapaca2 acquire resistance to erastin instead of sensitivity. Interestingly, starvation provoked changes in Miapaca2 growth pattern and morphology: after growing without FBS for 2 days, originally mesenchymal-like Miapaca2 cells formed islands, characteristic to epithelial cells, but after a 5-day starvation period they became spindle-shaped (Fig. 9 A). These morphology changes might indicate transitioning between epithelial and mesenchymal cell states. Indeed, wound healing assay showed that during the first 2 days of starvation cells are about as twice less motile as during 4th-to-6-th day starvation period (Fig. 9 B-C). Western blot analysis revealed expression dynamics of mesenchymal markers vimentin and YAP1 (Yuan *et al.*, 2016) and confirmed that at day 2 of FBS withdrawal expression of vimentin and YAP1 is the lowest, while at day 5 – the highest (Fig. 9 D-G).



**Fig. 9.** Pancreatic cancer cells transition between different mesenchymal states during FBS starvation. A. Representative brightfield microscopy images of Miapaca2 cells, starved for 2 and 5 days without FBS. Scale bar, 50  $\mu$ m. B. Wound healing assay of non-starved and 4 days starved Miapaca2 cells. Scale bar, 200  $\mu$ m. C. Quantification of (B). D. Western blot analysis of vimentin in Miapaca2 cells, starved for 1-7 days. E. Quantification of (D). F. YAP1 expression in Miapaca2 cells, nonstarved and starved for 1-7 days. G. Quantification of (F).

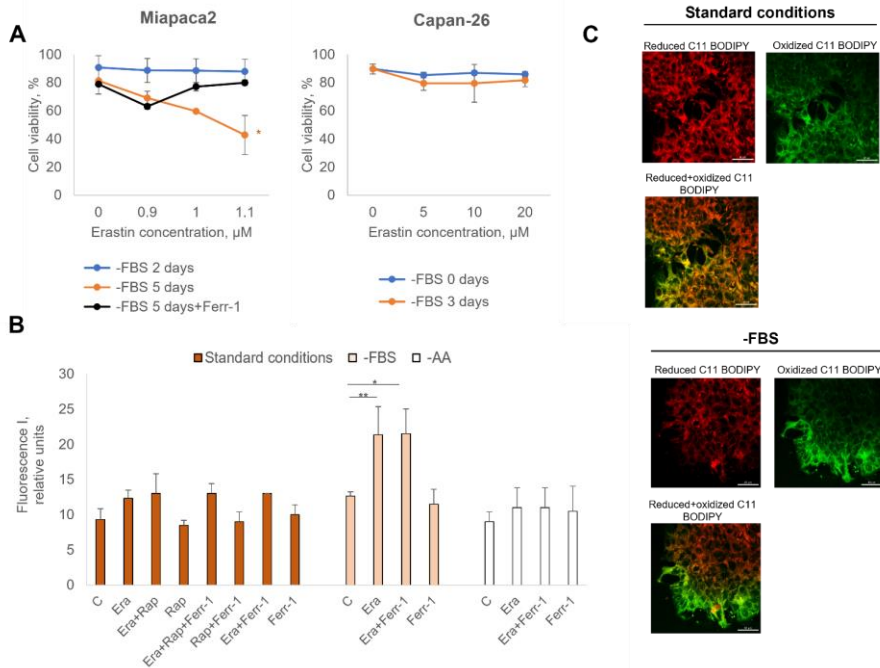
G. Quantification of (F). Control, cells growing at standard conditions (DMEM+10% FBS). Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \* P<0.05, vs. nonstarved cells.

In addition, a unique cell line Capan-26, which was established and characterized as epithelial pancreatic cancer cell line, showed similarities to Miapaca2: after 3 days of FBS starvation, cells at the edge of islands gained mesenchymal shape (Fig. 10 A) and lost membrane E-cadherin (Fig. 10 B). However, vimentin expression did not increase during starvation, maybe because only a small population of cells was affected (Fig. 10 C).



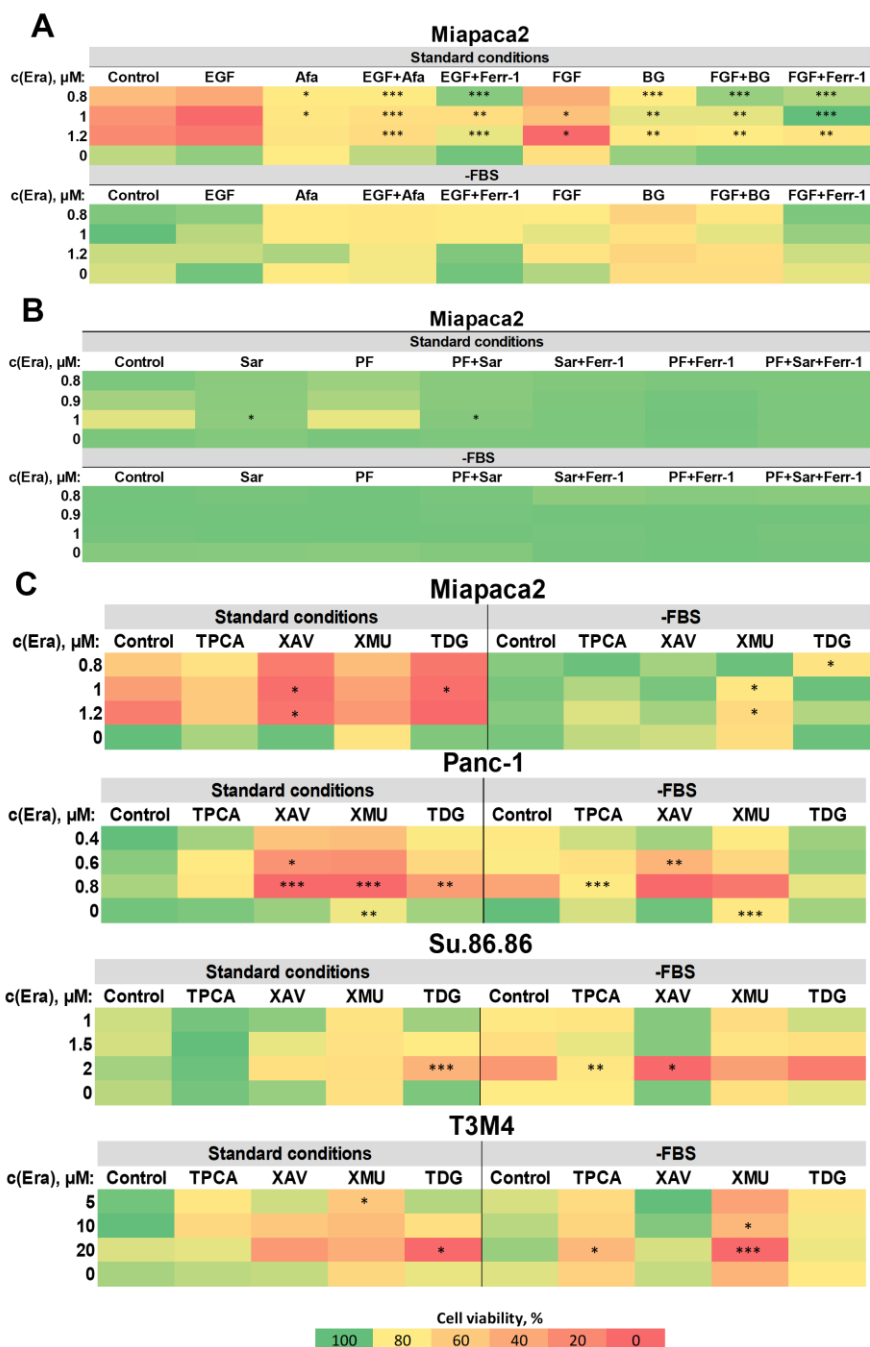
**Fig. 10.** A. Representative brightfield microscopy images of Capan-26 cells, starved for 3 days without FBS. Scale bar, 50  $\mu$ m. B. E-cadherin immunofluorescence of starved and non-starved Capan-26 cells. Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Scale bar, 50  $\mu$ m. C. Western blot analysis of vimentin expression in Capan-26 cells, starved for 1-5 days. C12 primary stromal cell culture was used as a positive control. Control, cells growing at standard conditions (IMDM+10% FBS).

In relation to sensitivity to ferroptosis, Miapaca2 cells at day 2 of FBS starvation (most epithelial-like) are about twice less sensitive to erastin than at day 5 (most mesenchymal-like) (Fig. 11 A). Capan-26 cells were overall very resistant to erastin, but erastin treatment after 3-day starvation period induced a mild lipid oxidation (Fig. 11 B). However, ferrostatin-1 failed to reduce membrane oxidation. C11 BODIPY microscopy clearly indicated oxidized lipids in the membranes of mesenchymal-shaped cells at the edges of starved cell islands, compared to a non-starved control (Fig. 11 C). Together, these data indicate that in Miapaca2 and Capan-26 cells starvation promotes transitioning between mesenchymal and epithelial states, with mesenchymal state being more sensitive to ferroptosis induction than epithelial.



**Fig. 11.** A. Transitioning between different mesenchymal states during FBS starvation alters sensitivity to ferroptosis induction. A. Miapaca2 and Capan-26 cell viability after reprogramming cells by FBS starvation and erastin treatment. B. Measurement of lipid peroxidation of erastin treated Capan-26 cells, nonstarved or starved without FBS and without amino acids. D. Confocal microscopy images of FBS starved and nonstarved Capan-26 cells, stained with C11 BODIPY. Scale bar, 40  $\mu\text{m}$ . In all cases, ferroptosis was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1 (1  $\mu\text{M}$ ). For the measurement of lipid oxidation, Capan-26 cells were treated with 20  $\mu\text{M}$  erastin. In A and B, cells were treated with ferrostatin-1 and rapamycin (0.25 nM) 1 h before the erastin treatment. Cell viability and the proportion of oxidized lipids in cell membranes was evaluated 48 h after the treatment. -AA, cells, cultured without L-glutamine, L-lysine and L-arginine; C, control, untreated cells; Era, erastin; -FBS, cells, cultured without fetal bovine serum; Ferr-1, ferrostatin-1; I, intensity; Rap, rapamycin. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. 2 days of starvation (Miapaca2 cells) or 3 days of starvation (Capan-26 cells) (A), vs. control of each group (C).

*EMT modulation can be used to increase pancreatic cancer cell sensitivity to ferroptosis.* The latter results encouraged to explore the possibilities of ferroptosis modulation in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-prone mesenchymal-like pancreatic cancer cells. A combinatorial cell viability analysis of erastin and EMT-targeted compounds was performed in FBS starved and nonstarved cells.



**Fig. 12.** EMT modulation can be used to increase pancreatic cancer cell sensitivity to ferroptosis. A. Miapaca2 cell viability after erastin and EMT-inducing growth factors EGF and FGF (100 ng/ml) combined treatment under standard (DMEM+10% FBS) and starvation conditions. Afatinib and BGJ398 inhibit EGFR and FGFR, respectively. B. Miapaca2 cell viability after simultaneous exposure to erastin and EMT inhibitors saracatinib and PF573228 under standard (DMEM+10% FBS) and starvation conditions. C. Combinatorial cell viability analysis of other EMT targeting compounds and erastin in different pancreatic cancer cell lines. In all cases, ferroptosis was induced by erastin and inhibited by ferrostatin-1 (1  $\mu$ M). Cells

were treated with inhibitors and/or exposed to starvation conditions 1 h before the erastin treatment. Cell viability was evaluated 48 h after the treatment. Afa, afatinib; BG, BGJ398; EGF, epidermal growth factor; Era, erastin; -FBS, cells, cultured without fetal bovine serum; FGF, fibroblast growth factor; Ferr-1, ferrostatin-1; PF, PF573228; Sar, saracatinib; TDG, tideglusib; TPCA, TPCA-1; XAV, XAV939; XMU, XMU-MP-1. Data is presented as the mean  $\pm$ SD, n=3. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, vs. cells, treated with a corresponding erastin concentration.

First of all, as expected, EMT-inducing growth factors EGF and bFGF (Gonzalez and Medici, 2014) sensitized Miapaca2 cells to erastin at standard conditions, and had no significant effect on cells, starved without FBS for 2 days (most epithelial-like state) (Fig. 12 A). The sensitivity inducing effect was completely abolished by treating cells with EGFR and FGFR inhibitors afatinib and BGJ398, respectively. Secondly, two anti-EMT agents, Src inhibitor saracatinib and functionally similar FAK inhibitor PF573228 (Bolos *et al.*, 2010), were tested for their impact on ferroptosis. Saracatinib completely rescued Miapaca2 cells from erastin-induced cell death, alone or in combination with PF573228, although PF573228 did not affect cell viability (Fig. 12 B). Finally, other compounds were tested, which are not conventional EMT-targeted drugs, but modulate EMT-related signaling pathways: NF $\kappa$ B (IKK inhibitor TPCA) (Huber *et al.*, 2004), Wnt (tankyrase inhibitor XAV939 and GSK-3 inhibitor tideglusib) (Gasior *et al.*, 2017), Hippo (MST 1/2 inhibitor XMU-MP-1) (Diepenbruck *et al.*, 2014) in Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells (Fig. 12 C). Wnt and Hippo signaling inhibition increased cell sensitivity to erastin, in most cases at standard conditions (especially in Miapaca2 cells) or at a high erastin concentration. Combination of erastin and tideglusib had the strongest cytotoxic effect in all cell lines tested, even in T3M4 cells, which are overall resistant to erastin. These data indicate that pancreatic cancer cell sensitivity to ferroptosis can be modulated and increased by EMT-targeted compounds.

## DISCUSSION

Oxidative stress lies in the nature of pancreatic cancer, as known triggers of pancreatic carcinogenesis such as alcohol consumption and inflammation generate ROS and promote malignant lesions in the pancreas (Liou *et al.*, 2016, Palmieri *et al.*, 2007). Generally, there are two main strategies to kill cells, which thrive on accumulating ROS: to deplete ROS or elevate oxidative stress above the bearable threshold, i. e., anti-oxidant or pro-oxidant cancer therapies (Wang and Yi, 2008). Although both have been tested for pancreatic cancer (Martinez-Useros *et al.*, 2017), this study mainly focused on the latter. In this work, new ways to improve pancreatic cancer treatment were elucidated by modulating ferroptosis, a unique cell death type based on membrane lipid oxidation due to iron overload. Ferroptotic cell death is morphologically and biochemically distinctive from apoptosis, necroptosis or autophagy and from the day of discovery it has gained a considerable attention (Y. Xie *et al.*, 2016). One of the most important recent findings is that ferroptosis induction successfully combats pancreatic cancer resistance to gemcitabine, a first-line pancreatic cancer drug (Zhu *et al.*, 2017).

Sensitivity to ferroptosis depends on a metabolic rewiring, a common trait of pancreatic cancer, which can be exemplified by glucose and glutamine addiction. Cystine-glutamate antiporter  $x_c^-$  mediates cellular cystine import by exchanging one molecule of cystine for glutamate. In the cell, cystine is rapidly reduced to cysteine and used for glutathione biosynthesis. Cystine reduction involves NADPH, which is generated from glucose (glucose-6 phosphate) in a pentose phosphate pathway. NADPH is also used to reduce oxidized glutathione. Cells overexpressing SLC711A, a reporter component of an  $x_c^-$  system, tend to be more resistant to ferroptosis inducers due to an elevated reduced glutathione level and GPX4 activity. However, to meet energy demands and supply enough glutamate for the tricarboxylic acid cycle, cells need to enhance glutamate import, commonly in a form of glutamine. In this way, ferroptosis resistance is inevitably coupled to glutamine and glucose dependency (Koppula *et al.*, 2021). Pancreatic cancer falls into a broad category of glutamine-dependent cancers, although cells use different enzymes to metabolize glutamine due to K-RAS mediated reprogramming (Son *et al.*, 2013). Thus, depleting cells from nutrients, not exceptionally glucose or glutamine, may have a therapeutic benefit in pancreatic cancer, which is sensitive to ferroptosis induction. This assumption led to the following study.

The results reveal that treatments that induce or mimic starvation (growth factor, amino acid withdrawal and exposure to mTORC1 inhibitor rapamycin) elicit contrasting effects in different pancreatic cancer cell lines: generally, Miapaca2 cells acquire resistance to ferroptosis, while Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells become more sensitive. Some previous findings shed the light on oxidative stress resistance in cells, encountering starvation. For example, it was previously reported that growth factor starvation induces quiescent phenotype and NF- $\kappa$ B activation in prostate cancer cells and protects them from ROS-induced cell death, but not specifically ferroptosis (White *et al.*, 2020). Also, recently, Lee *et al.* have showed that energy stress inhibits ferroptosis in cancer cells by AMPK activation and acceleration of fatty acid biosynthesis (Lee *et al.*, 2020). However, in some cells encountering growth factor deprivation AMPK activation requires a gradual ROS accumulation (Wu *et al.*, 2013). Contradictory to Panc-1 and Su.86.86 cells, the same time course of FBS and amino acid starvation increased the amount of reduced glutathione in Miapaca2 cells, indicating their milder antioxidant defense, which at least in part explains sensitivity differences. Also, an anti-ferroptotic effect of amino acid starvation in Miapaca2 cells was observed. Sato *et al.* showed that lysine, arginine and other amino acid deprivation increases cystine import and expression of the components of cystine-glutamate antiporter xc<sup>-</sup> (Sato *et al.*, 2004), which could elevate cell protection against ferroptosis. In Panc-1 and Su.86.86 cells, even more pronounced effects to erastin sensitivity were observed after (pseudo)starvation, induced by treating cells with rapamycin, but not a dual mTORC1/mTORC2 inhibitor INK128. This suggested the involvement of mTORC2-mediated feedback loops, as prolonged incubation with rapamycin inhibits S6K and thus indirectly activates its downstream target Rictor and consequently mTORC2 (Formisano *et al.*, 2020). Gu *et al.* showed that active mTORC2 diminish cystine import while knockout or pharmacological inhibition of this protein leads to the opposite (Gu *et al.*, 2017). This mechanism supports the observations in Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells, in which rapamycin enhances erastin cytotoxicity. In addition, an established downstream target of rapamycin-induced mTORC2 feedback signaling is ERK1/2 (Carracedo *et al.*, 2008). Results of this study confirmed ERK1/2 translocation to cell nucleus after rapamycin and erastin combined treatment in Miapaca2, Panc-1, Su.86.86 cells; pharmacological ERK1/2 inhibition protected pancreatic cancer cells from erastin-induced ferroptosis. Also, results showed that starvation-induced resistance to erastin in pancreatic cancer cells is mediated by another kinase, JNK, as JNK was also activated (phosphorylated) in (pseudo)starved



pancreatic cancer cells. Interestingly, the data highlighted a dual role of JNK in oxidative stress response regulation: in Panc-1 cells at standard conditions JNK inhibition enhanced ROS-induced cell death, but starvation combined with JNK inhibition protected these cells from erastin cytotoxicity. Antioxidant properties of JNK inhibitor SP600125 were also observed in Miapaca2 cells even at nutrient-rich conditions. Although these results seem paradoxical, some insights on a pro-oxidant JNK role have been proposed, however, mainly in the context of regulation of mitochondria function in normal cell apoptosis (Hanawa *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2009, Win *et al.*, 2015). In relation to ferroptotic cell death, it was showed that activation of JNK and P38 elevates the expression of NOX4 and enhances ferroptosis in pancreatic islet cells (Li and Leung, 2020). Also, recently Yang *et al.* revealed that JNK can downregulate GPX4 and promote ferroptosis in colorectal cancer cells (Y. Yang *et al.*, 2021). However, none of these mechanisms was directly linked to cell metabolism and starvation.

It is important to note that this study used both established pancreatic cancer cell lines Miapaca2, Panc-1, Su.86.86, T3M4, and a unique patient-derived pancreatic cancer cell line Capan-26, which closely resembles the tumor. Capan-26 is the first documented pancreatic cancer cell line, derived from a tumor of a Lithuanian patient. Scientific literature indicates that success rate of pancreatic cancer cell line establishment rarely exceeds 10% (Kim *et al.*, 2017, Ruckert *et al.*, 2012), in this case it was 4%. The main difficulties often include fibroblast outgrowth and low cell viability after tissue dissociation (Misericchi *et al.*, 2017). After the establishment, Capan-26 cell line was fully characterized *in vitro* by assessing doubling time, tumor and stem cell marker expression, colony forming efficiency, mutations of *KRAS* and *TP53* genes, karyotype and sensitivity to drug treatment. To summarize the main findings, Capan-26 expresses pancreatic cancer markers CEACAM6, CA19-9, epithelial marker E-cadherin, as well as stem cell markers CD44, OCT4 and ZEB1. An interesting observation might be drawn from the functional characterization of Capan-26: only cells that grew in aggregates expressed pancreatic cancer markers CEACAM6 and CA19-9. It is known that CEACAM6 overexpression mediate anoikis resistance in pancreatic cancer cells (Duxbury *et al.*, 2004), also, induce EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) (Chen *et al.*, 2013), that explains its expression in cells growing in 3D. Also, such cells increase the expression of ZEB1 and OCT4, established indicators of EMT and stemness (Krebs *et al.*, 2017, Mohiuddin *et al.*, 2020). CD44 and OCT4 are also known as pancreatic cancer stem cell markers (Gzil *et al.*, 2019). Anoikis resistant cell population especially expands at late

passages. Interestingly, at early passages, a minority of the spheres exhibit vacuolar morphology, typical for mucin secreting cells. In addition, Capan-26 line has a dual polyploid/aneuploid nature. Polyploidy is not uncommon for pancreatic cancer: in established cell lines (Miapaca2, Capan-2, Panc-1), modal chromosome number varies between 60-70. However, Capan-26 cells are extremely unique considering their other genetic abnormalities: they have an oncogene *KRAS* exon 3 deletion and *TP53* exon 5 point mutation V172F, none of which is documented for pancreatic cancer to date. In ovarian cancer cells, V172F mutation promotes cisplatin resistance (X. Xie *et al.*, 2016). Indeed, Capan-26 were less sensitive to cisplatin (and oxaliplatin) than to gemcitabine. Interestingly, FOLFIRINOX was administered to the patient after the surgery, although Capan-26 seem to be resistant to one of its components, 5-fluorouracil.

Nutrient withdrawal mimics conditions, which cancer cells face in larger tumors before neovascularization. Poor perfusion is a common trait of pancreatic cancer tumors and it impairs nutrient access to the deeper tumor layers (Kamphorst *et al.*, 2015). It is known that serum starvation enhances metastatic properties of cancer cells (Chen *et al.*, 2010, Conacci-Sorrell *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2013, Tong *et al.*, 2019). Indeed, FBS starvation induced changes in cell morphology, epithelial and mesenchymal marker expression and/or increased motility of two pancreatic cancer cell lines, Miapaca2 and Capan-26. While starved, Miapaca2 cells transitioned between mesenchymal-like (original) to epithelial-like to mesenchymal states. Epithelial-like state proved to be the most resistant to erastin. Part of the Capan-26 cell population gained mesenchymal properties as well. Increased mesenchymal properties under FBS starvation conditions predisposed Miapaca2 cells to erastin-induced ferroptosis and correlated with an increased proportion of oxidized membrane lipids in Capan-26 cells. One possible explanation could be that in this case mesenchymal properties and possibly cell sensitivity are mediated by an autocrine stimulation of unknown growth factors, which elicit their effect only when their concentration is below threshold, i. e. the concept of dependence receptors (Stone, 2020). From the evolutionary perspective, one can speculate that gaining more epithelial properties and enhancing cell-cell junctions could help stromal cells to form a shield and protect epithelial cancer (stem) cells from an oxidative damage in pancreatic tumors.

With this in mind, a panel of EMT-targeted compounds was tested and their impact on cell sensitivity to erastin was investigated. As expected, EMT-promoting growth factors EGF and FGF enhanced Miapaca2 cell sensitivity to erastin, whereas blocking EGF and FGF receptors diminished the effect.

Also, classical anti-EMT drug Src inhibitor saracatinib, but not functionally related FAK inhibitor PF573228, prevented erastin induced cell death. Finally, inhibitors of Wnt and Hippo signaling pathways (XAV939 and XMU-MP-1, respectively) enhanced erastin cytotoxicity. In some cases, a biphasic inhibitory effect was observed: in Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells tankyrase inhibitor XAV939 prevents cell death at low erastin concentration, but enhances its cytotoxic effect at higher erastin doses. GSK-3 inhibitor tideglusib, combined with erastin, exerted the strongest cytotoxic effect in all cell lines tested, even in T3M4 cells, which are overall resistant to erastin. From a mechanistic perspective, by inhibiting GSK-3, tideglusib indirectly activates  $\beta$ -catenin, which can promote EMT by downregulating cell-cell junctions (Kim *et al.*, 2019).

In recent years, cancer starvation therapies have gained a considerable attention. Common ways to starve tumors include treatment with antiangiogenic compounds, vascular blood supply disruption, direct decomposition of intratumoral nutrients and treatment with agents that induce pseudostarvation, such as inhibitors of growth factor receptors and mTOR pathway (Chan *et al.*, 2017, Coppock *et al.*, 2016, Demkova and Kucerova, 2018, Yu *et al.*, 2019). Combination of starvation and pro-oxidant therapies has proved to be effective both *in vitro* and *in vivo* (D'Aronzo *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2019, Ranji-Burachaloo *et al.*, 2019). The results of this study showed that in pancreatic cancer cells, including established and unique patient-derived cell lines, starvation mediates sensitivity to ferroptosis via ERK1/2, JNK kinases and induction of transitioning between epithelial and mesenchymal cell states. Therefore, there are some new avenues for further research, finding the way for the combination therapy, using kinase inhibitors and ferroptosis inducers.

## CONCLUSIONS

1. A novel pancreatic cancer cell line Capan-26 expresses pancreatic cancer markers, stemness properties and has a unique genetic profile;
2. Growth factor, L-glutamine, L-lysine and L-arginine deprivation and inhibition of mTORC1 with rapamycin elicits contrasting effects on the sensitivity to erastin in different pancreatic cancer cell lines, starved for the same period of time: Miapaca2 cells gain resistance, whereas Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells gain sensitivity;
3. In starved pancreatic cancer cells, ERK1/2 and JNK kinases mediate cell death after erastin treatment;
4. Growth factor deprivation changes Miapaca2 and Capan-26 mesenchymal properties, mesenchymal state correlates with a higher sensitivity to erastin, whereas epithelial state correlates with a higher resistance; changes in mesenchymal properties are not observed in growth factor deprived Panc-1, Su.86.86 and T3M4 cells;
5. Compounds that modulate epithelial-to-mesenchymal transition increase erastin cytotoxicity in pancreatic cancer cells.

## DEDIKACIJA

Ši disertacija skiriama visiems studentams, kurie doktorantūroje yra vieni. Jūs ne vieni – aš irgi taip pat jaučiausi.

Doktorantūros studijų pradžioje vienas žmogus man pasakė: nesvarbu, ar tavo darbai kažkam rūpi, ar ne, visada galima viską pasidaryti taip, kaip tau reikia. Tuo metu tai skambėjo neįtikėtina. Dabar, praėjus penkeriems metams, rankose laikydama savo disertaciją aiškiai žinau, kad jeigu esi savo vietoje ir turi noro, įmanoma yra viskas.

This dissertation is dedicated to all the students who are left alone in their PhD. You are not alone – I felt the same.

At the beginning of my studies, one person told me: you can always find a way to accomplish your goals, no matter other people care about it or not. Although at first it seemed unbelievable, today, when I am holding the dissertation in my hands, I know for sure that if you are in the right place, nothing is impossible.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. **Zalyte E**, Cicenas J. Starvation mediates pancreatic cancer cell sensitivity to ferroptosis via ERK1/2, JNK and changes in the cell mesenchymal state. *Int J Mol Med*, 2022,49(6). DOI: 10.3892/ijmm.2022.5140. Poveikio veiksnys (*impact factor*): 4,1, Q2.

Doktorantės indėlis: konceptualizacija, visų eksperimentų planavimas ir atlikimas, duomenų analizė, rankraščio rašymas ir publikavimas (žurnalo paieška, pridavimas, susirašinėjimas su redaktorais).

2. **Zalyte E**, Dedonyte V, Kurlinkus B, Sileikis A, Schemmer P, Valius M. Establishment and Characterization of a New Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line Capan-26. *Anticancer Research*, 2021,41(3):1401-6. DOI: 10.21873/anticancer.14897. Poveikio veiksnys (*impact factor*): 2,480, Q3.

Doktorantės indėlis: visų eksperimentų planavimas ir atlikimas, duomenų analizė, rankraščio rašymas ir publikavimas (žurnalo paieška, pridavimas, susirašinėjimas su redaktorais).

## PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE DISERTACIJOS TEMA

### **Žodinis pranešimas:**

**Zalyte E**, Cicenas J. Starvation Mediates Pancreatic Cancer Cell Sensitivity to Ferroptosis via ERK1/2, JNK and Changes in Cell Mesenchymal State. Open Readings 2022, 2022-03-15/18, Vilnius, Lietuva (nuotolinė konferencija).

### **Stendiniai pranešimai:**

1. **Zalyte E**, Cicenas J. Starvation-induced Changes in Mesenchymal State Mediate Pancreatic Cancer Cell Resistance to Ferroptosis. The COINS 2022, 2022-02-28/03-03, Vilnius, Lietuva (nuotolinė konferencija).
2. **Zalyte E**, Dedonyte V, Kurlinkus B, Sileikis A, Schemmer P, Valius M. Establishment and Characterization of a New Pancreatic Ductal

Adenocarcinoma Cell Line Capan-26. Open Readings 2021, 2021-03-15/19, Vilnius, Lietuva (nuotolinė konferencija).

3. **Žalytė E**, Valius M. Autophagy and Akt Signaling Promote Resistance to Ferroptosis in Pancreatic Cancer Cells. The COINS 2020, 2020-02-25/27, Vilnius, Lietuva.
4. **Žalytė E**, Valius M. mTORC1 Inhibition Promotes Resistance to Ferroptosis in Pancreatic Cancer Cells. Vita Scientia, 2020-01-03, Vilnius, Lietuva.

## KITOS PUBLIKACIJOS IR KONFERENCIJOS

### Publikacijos:

1. Ger M, **Žalytė E**, Kaupinis A, Kurlinkus B, Petrulionis M, Šileikis A, Strupas K, Valius, M. Primary pancreatic ductal adenocarcinoma cell cultures represent the features of native tumours. *Biologija*, 2019,65(1). DOI: 10.6001/biologija.v65i1.3983.
2. Cicenas J, **Zalyte E**, Bairoch A, Gaudet P. Kinases and Cancer. *Cancers (Basel)*, 2018,10(3). DOI: 10.3390/cancers10030063. Poveikio veiksnys (*impact factor*): 6,639 (Q1).
3. Cicenas J, **Zalyte E**, Rimkus A, Dapkus D, Noreika R, Urbonavicius S. JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2017,10(1). DOI: 10.3390/cancers10010001. Poveikio veiksnys (*impact factor*): 6,639 (Q1).

### Pranešimai konferencijose:

1. Ger M, **Zalyte E**, Andriuskevicius J, Kaupinis A, Zukas J, Kurlinkus B, Šileikis A, Schemmer P, Valius M. FLT3 receptor as a potential prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. EACR 2021 Virtual Congress: Innovative Cancer Science, 2021-06-09/12 (nuotolinė konferencija).
2. Petrulionis M, Ger M, **Žalytė E**, Cicėnas J, Kaupinis A, Kurlinkus B, Šileikis A, Valius M, Strupas K. Bioinformacinės analizės taikymo modelis efektyviam kasos duktalinės adenokarcinomos chemoterapijos pasirinkimui. Lietuvos chirurgų asociacijos suvažiavimas 2019, 2019-10-11/12, Klaipėda, Lietuva.

3. **Zalyte E**, Ger M, Kaupinis A, Kurlinkus B, Petrulionis M, Sileikis A, Strupas K, Valius M. Integrative Proteomic, Bioinformatic and Primary Cell Culture Approach Facilitates the Prediction of Anticancer Drugs. Open Readings 2019, 2019-03-19/22, Lietuva.
4. **Zalyte E**, Ger M, Kaupinis A, Kurlinkus B, Petrulionis M, Sileikis A, Strupas K, Valius M. Combining proteomic, bioinformatic and primary cell culture approach for pancreatic cancer drug discovery and evaluation. Life Sciences Baltics, 2018-09-26/27, Lietuva.
5. Ger M, **Žalytė E**, Kaupinis A, Kurlinkus B, Petrulionis M, Sileikis A, Strupas K, Cicėnas J, Valius M. Comprehensive proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma. XVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, 2018 06 26-29, Lietuva.



## CURRICULUM VITAE

<b>Vardas</b>	Eglė
<b>Pavardė</b>	Žalytė
<b>Gimimo data</b>	1992-04-24
<b>Adresas</b>	Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva Tel.: +370 5 223 4436 El. Paštas: egle.zalyte@gf.vu.lt
<b>Išsilavinimas</b>	2017-2021 m. Biochemijos krypties doktorantė, Proteomikos centras, Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilnius, Lietuva  2015-2017 m. Biochemijos magistras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva <i>Magna cum laude</i> diplomas  2011-2015 m. Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas, Vilnius, Lietuva <i>Cum laude</i> diplomas  2008-2011 m. Vilniaus Gabijos gimnazija, Vilnius, Lietuva Brandos atestatas su pagyrimu
<b>Darbo patirtis</b>	nuo 2022-05 – jaunesnioji mokslo darbuotoja, Fizinių ir technologijos mokslų centras, Vilniaus universitetas  nuo 2021-09 – jaunesnioji mokslo darbuotoja, Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas  nuo 2018-02 – jaunesnioji asistentė, Biomokslų institutas, Vilniaus universitetas  2020-2021 m. – jaunesnioji mokslo darbuotoja, Proteomikos centras, Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas

2018-2019 m. – jaunesnioji mokslo  
darbuotoja, UAB „NABELITA“

2016-2018 m. – laborantė, Biomokslų  
institutas, Gyvybės mokslų centras, Vilniaus  
universitetas

2016 m. – specialistė, Biochemijos ir  
molekulinės biologijos katedra, Gamtos  
mokslų fakultetas, Vilniaus universitetas

**Moksliniai interesai**

Vėžio molekulinė biologija, ląstelės  
biologija

## UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.